

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**Evidencia de la función de AtGRDP1 como una  
proteína chaperona de RNA**

Tesis que presenta

**Jocelin Itzel Ramírez Alonso**

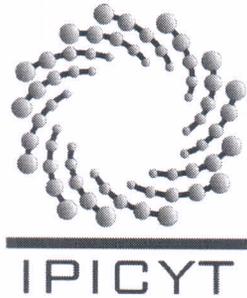
Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

Director de Tesis

**Juan Francisco Jiménez Bremont**

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre de 2015



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Evidencia de la función de AtGRDP1 como una proteína chaperona de RNA***" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Jocelin Itzel Ramírez Alonso** y aprobada el **primero de diciembre del dos mil quince** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont**  
Director de la tesis

**Dra. Irene Beatriz Catáño Navarro**  
Miembro del Comité Tutorial

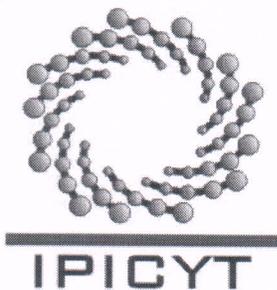
**Dra. Martha Leticia Santos Martínez**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos y Plantas, de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont y con fondos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Investigación Ciencia Básica CB-2013-221075).

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 560141 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 137 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 1 días del mes de diciembre del año 2015, se reunió a las 10:30 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Martha Leticia Santos Martínez</b>	<b>Presidenta</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Jocelin Itzel Ramírez Alonso**

sobre la Tesis intitulada:

*Evidencia de la función de AtGRDPI como una proteína chaperona de RNA*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 12:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 1 días del mes de diciembre de 2015.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

**Dr. Marcial Bohifa Marín**  
Secretario Académico



“Todo lo difícil empieza siendo fácil, y toda cosa grande  
empieza siendo pequeña...un viaje de cien millas empieza a  
nuestros pies...”  
*Lao Tse*

Dedicado a todos los que me acompañaron en este viaje...

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios de Maestría.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por el apoyo institucional.

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont por haberme admitido en su laboratorio, de lo contrario no habría sido tan emocionante.

A mi comité de sinodales, la Dra. Irene Castaño Navarro y la Dra. Leticia Santos Martínez, por su tiempo invertido en revisar la tesis, y por sus comentarios tan acertados.

A la M.C. Alicia Becerra Flora por su apoyo técnico y administrativo durante mi estancia en el laboratorio 7.

Mis más sinceros agradecimientos a Aida por todo su apoyo...

Y a todos los que conocí en el laboratorio 7: Adriana, Ana, Azucena, Edgar, Itzell, Israel, Fátima, Laura, Mago y Vladimir.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis.....	ii
Créditos Institucionales .....	iii
Acta de examen .....	iv
Dedicatorias .....	v
Agradecimientos.....	vi
Lista de tablas .....	viii
Lista de figuras.....	ix
Resumen.....	x
Abstract .....	xi
Introducción.....	1
Materiales y métodos .....	4
Evaluación de la actividad como anti-terminador de la transcripción.....	4
Clonación en el vector pINIII.....	4
Prueba de anti-terminación en <i>E. coli</i> RL211.....	4
Esterilización, germinación y condiciones de crecimiento de plántulas .....	5
Generación de plantas sobre-expresoras de ABI5 (35S:: <i>AtABI5</i> ).....	5
Análisis estadístico.....	6
Resultados .....	7
AtGRDP1 es una proteína rica en glicinas con actividad de chaperona de RNA.	7
La mutante <i>Atgrdp1</i> tiene sensibilidad a ABA reducida .....	8
Discusión.....	12
Tablas .....	17
Figuras .....	18
Bibliografía .....	25

## Lista de tablas

1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar las versiones *AtGRDP1* y *AS\_AtGRDP1* y el control *cspA*, para su clonación en el vector pINIII 17

## Lista de figuras

<b>1.</b> Actividad de la proteína AtGRDP1 como chaperona de RNA	18
<b>2.</b> Porcentaje de germinación de semillas 35S:: <i>AtGRDP1</i> , 35S:: <i>AtABI5-8</i> , <i>Atgrdp1</i> , <i>Atabi5</i> y Col-0 en medio con y sin ABA	19
<b>3.</b> Porcentaje de desarrollo de cotiledones verdes de plántulas 35S:: <i>AtGRDP1</i> , 35S:: <i>AtABI5-8</i> , <i>Atgrdp1</i> , <i>Atabi5</i> y Col-0 en medio con y sin ABA	20
<b>S1.</b> Esquema general de la metodología	21
<b>S2.</b> Esquema de las construcciones en el vector pINIII	22
<b>S3.</b> Actividad de la proteína AtGRDP1 como chaperona de RNA (Replicados)	23
<b>S4.</b> Porcentaje de germinación de semillas 35S:: <i>AtABI5</i> , <i>Atabi5</i> y Col-0 en medio con y sin ABA	24

## Resumen

### **Evidencia de la función de AtGRDP1 como una proteína chaperona de RNA**

Las proteínas ricas en glicina (GRPs) tienen una región con motivos Gly<sub>n</sub>-X contiguos, que se ubica en el extremo carboxilo terminal. Se clasifican en 5 grupos, de los cuales, las proteínas del grupo IV se caracterizan por la presencia de uno o más dominios de unión a RNA, y se han denominado proteínas de unión a RNA ricas en glicina (RB-GRPs). Estas proteínas actúan como reguladores de la expresión génica a nivel post-transcripcional durante el desarrollo y en respuesta a estrés abiótico en plantas. Recientemente, nuestro grupo reportó por primera vez al gen *AtGRDP1* (Glycine-Rich Domain Protein 1) en *Arabidopsis*, el cual codifica para una proteína de 819 aminoácidos con un dominio rico en glicinas (GRD) en el carboxilo terminal. Además del dominio GRD, contiene un dominio de función desconocida (DUF1399), y un posible motivo de unión a RNA (RNP-1). El gen *AtGRDP1* tiene 8 exones y 7 intrones, se ha reportado una variante generada por splicing alternativo sobre el transcrito primario a la que denominamos AS\_*AtGRDP1*, que en comparación con la versión *AtGRDP1* “completa”, carece del dominio GRD. A pesar de descubrir que *AtGRDP1* participa en la respuesta al estrés abiótico, y que puede jugar un papel regulatorio en la vía de señalización del ácido abscísico (ABA), la función de esta proteína no ha sido definida. Con el propósito de descubrir la función de la proteína *AtGRDP1* completa y de AS\_*AtGRDP1*, se evaluó su capacidad de evitar la terminación de la transcripción del gen de resistencia a cloranfenicol en la cepa RL211 de *Escherichia coli*. La expresión heteróloga de la versión *AtGRDP1* completa confiere resistencia a cloranfenicol a la cepa RL211, lo que sugiere la capacidad de *AtGRDP1* para unirse al terminador *trpL* y actuar como chaperona de RNA. Por el contrario, la versión AS\_*AtGRDP1* no confiere resistencia a cloranfenicol. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la aplicación exógena de ABA en bajas concentraciones sobre la línea mutante del gen *AtGRDP1* (*Atgrdp1*) durante la germinación y la formación de cotiledones. Las semillas de la línea *Atgrdp1* mostraron un retraso en la germinación y una disminución en el desarrollo de cotiledones verdes en comparación con Col-0; sin embargo, mostraron menor sensibilidad al comparar contra la línea sobre-expresora del factor de transcripción ABI5 (hipersensible a ABA). En este estudio mostramos evidencia nueva de la función de la versión *AtGRDP1* completa como chaperona de RNA, lo que da pie al estudio del mecanismo de regulación de *AtGRDP1* sobre la expresión de genes de respuesta a estrés abiótico y de la vía de señalización del ABA.

**Palabras clave:** *AtGRDP1*, AS\_*AtGRDP1*, RB-GRPs, Chaperona de RNA, Sensibilidad a ABA, Regulación de la expresión de genes

## Abstract

### Evidence of AtGRDP1 function as an RNA chaperone protein

Glycine-rich proteins (GRPs) have a region with Gly<sub>n</sub>-X motifs, located at the carboxyl terminus. The GRPs are classified in 5 groups, based on the conserved domains contained. The members of group IV have one or more RNA binding domains, and they are named RNA-Binding Glycine Rich Proteins (RB-GRPs). The RB-GRPs are regulators of gene expression at the post-transcriptional level during development and in response to abiotic stress in plants. Recently, our group reported the novel gene of Arabidopsis, *AtGRDP1* (Glycine Rich Domain Protein 1), which encodes a protein with a glycine rich domain (GRD) at the carboxyl terminus. Besides the GRD domain, *AtGRDP1* protein contains a domain of unknown function 1399 (DUF1399) and a potential RNA binding motif (RNP-1). The *AtGRDP1* gene has 8 exons and 7 introns, it has been reported a variant generated by alternative splicing of the primary transcript which lacks the GRD domain and we named AS\_*AtGRDP1*. Despite the involvement of *AtGRDP1* in the response to abiotic stress in Arabidopsis, and that *AtGRDP1* could play a regulatory role in abscisic acid (ABA) signaling pathway, the function of *AtGRDP1* protein has not been defined. In order to discover the function of *AtGRDP1* and AS\_*AtGRDP1* versions, we evaluated its ability to prevent the termination of the transcription of the chloramphenicol resistance gene in *Escherichia coli* RL211. Heterologous expression of the full *AtGRDP1* version confers chloramphenicol resistance, which suggests the ability of *AtGRDP1* to bind to the *trpL* terminator, and acts as RNA chaperone. By contrast, the AS\_*AtGRDP1* version does not confer chloramphenicol resistance. Additionally, we evaluated the effect of exogenous ABA application at low concentrations on *Atgrdp1* mutant line during germination and the cotyledon development. The seeds of the *Atgrdp1* mutant showed a delayed germination and a reduction in the green cotyledons development compared to Col-0 seeds. However, when we compared with an ABA hypersensitive line, as *ABI5* over-expressing line, the *Atgrdp1* mutant is less sensitive. In this study, we show evidence that suggests that the complete *AtGRDP1* protein functions as an RNA chaperone. This opens the door to study the mechanism of regulation of gene expression in response to abiotic stress and ABA signaling pathway.

**Key words:** *AtGRDP1*, AS\_*AtGRDP1*, RB-GRPs, RNA chaperone, ABA sensitivity, Regulation of gene expression

## Introducción

Las proteínas ricas en glicina (GRPs, por sus siglas en inglés) son un grupo diverso de proteínas caracterizado por tener regiones con secuencias de residuos de glicina (motivos Gly<sub>n</sub>-X) (Sachetto-Martins *et al.* 2000). Están clasificadas en 5 grupos según el arreglo de los repetidos de glicina y la presencia de otros motivos o dominios adicionales conservados (Sachetto-Martins *et al.* 2000, Mangeon *et al.* 2010). De manera particular a las GRPs de la clase IV se les ha denominado RB-GRPs (del inglés RNA-Binding Glycine-Rich Proteins) debido a que presentan uno o más dominios de unión a RNA (Mangeon *et al.* 2010). Las proteínas de unión a RNA juegan un papel muy importante en el metabolismo del RNA, ya que están involucradas en diversos procesos de regulación de la expresión de genes, como la poliadenilación, el splicing, la estabilidad y el transporte de mensajeros, entre otros (Lorković, 2009). Las evidencias sugieren que éstas proteínas desempeñan un papel clave en la adaptación de las plantas a cambios ambientales, y que son reguladas por el ácido abscísico (ABA, por sus siglas en inglés) (revisado por Jung *et al.* 2013, Ciuzan *et al.* 2015a). El ABA regula una amplia variedad de procesos fisiológicos a través del ciclo de vida de la planta, como la maduración del embrión, la latencia de la semilla y el arresto del desarrollo post-germinativo (Koornneef *et al.* 2002; Holdsworth *et al.* 2008). Asimismo, la síntesis de ABA se estimula en hojas bajo condiciones de sequía, su concentración elevada funciona como señal para el cierre estomático (Davies *et al.* 1994, Leung y Giraudat 1998). También la aplicación exógena de ABA induce la síntesis de solutos compatibles, como prolina, durante el control del balance osmótico (Stewart y Voetberg 1985, Ober y Sharp 1994). Los efectos de esta hormona en la planta se realizan a través de la ruta de señalización de ABA, la cual regula una gran cantidad de genes de respuesta a estrés abiótico (Yoshida *et al.* 2014). Los niveles de ABA son controlados estrictamente, ya que su incremento puede evitar la germinación y frenar el desarrollo de la planta (Finkelstein *et al.* 2002). Recientemente, nuestro grupo de investigación reportó un gen de función desconocida denominado *AtGRDP1* (del inglés *Arabidopsis thaliana* Glycine-Rich Domain Protein 1), el cual está involucrado en la respuesta al estrés

abiótico (Rodríguez-Hernández *et al.* 2014). El gen *AtGRDP1* codifica para una proteína de 819 aminoácidos con un dominio rico en glicina localizado en el carboxilo terminal; además se identificaron dominios adicionales como: Un dominio de función desconocida 1399 (DUF1399, por sus siglas en inglés) y un posible motivo de unión a RNA (KGSCFFPI) equivalente al motivo RNP-1 (del inglés ribonucleoprotein-1) (Rodríguez-Hernández *et al.* 2014) presente en las RBPs del tipo RRM y CSD (Lorković y Barta, 2002). El estudio de la germinación y desarrollo de cotiledones verdes, mostró que las líneas sobre-expresoras 35S::*AtGRDP1* tienen tolerancia a estrés osmótico y salino, mientras que la mutante por inserción de T-DNA, *Atgrdp1* es sensible. Además las semillas 35S::*AtGRDP1* exhiben un fenotipo de insensibilidad a ABA, es decir, son capaces de germinar y desarrollarse en presencia de ABA (Rodríguez-Hernández *et al.* 2014). A principios de 1990, se identificaron en *Arabidopsis* mutantes insensibles a ABA (ABI, por sus siglas en inglés) (Finkelstein 1990, Finkelstein 1994). ABI3 y ABI5 son factores de transcripción que intervienen durante la maduración de la semilla y la germinación. ABI3 es el regulador central de la vía de señalización de ABA y controla la transición entre el embrión y plántula; ABI5 es regulado positivamente por ABI3 y es capaz de arrestar la germinación de manera dependiente de ABA (López-Molina *et al.* 2002). De forma interesante, los niveles de transcritos de los genes *ABI3* y *ABI5* se ven abatidos en la línea sobre-expresora, mientras que en la línea mutante *Atgrdp1* se encontró una alta expresión del gen *ABI3* lo que podría explicar los fenotipos encontrados. Además, identificamos que el gen *AtGRDP1* presenta otra versión de transcrito generada por splicing alternativo, en la cual se retiene el sexto intrón (TAIR, The Arabidopsis Information Resource, <https://www.arabidopsis.org/>). El intrón retenido contiene un codón de paro en fase con el exón 6, lo que generaría una versión más corta que no tendría el dominio rico en glicinas.

Existen diversas herramientas moleculares para analizar la función de las RBPs, una de las técnicas se basa en evitar la terminación de la transcripción. La cepa RL211 de *Escherichia coli* tiene integrada una construcción en el genoma que incluye el terminador de la transcripción *trpL* río arriba del gen cloranfenicol acetil transferasa (*cat*). La formación de una estructura tipo tallo-asa en el mensajero

sintetizado impide que la RNA polimerasa continúe con la transcripción, por lo que no se producirá el mensajero correspondiente al gen *cat* y las células son sensibles a cloranfenicol. Sin embargo, la expresión de proteínas que desdoblén el tallo-asa del terminador, como las proteínas chaperonas de RNA, hace posible la transcripción del gen *cat* y convierten a las bacterias en resistentes al cloranfenicol (Landick *et al.* 1990). Para analizar la actividad como chaperona de RNA existe otro sistema que está basado en la complementación de la mutante cuádruple BX04, a la cual se deletaron 4 de los 9 genes que codifican para proteínas chaperonas de RNA que actúan durante la aclimatación al frío (*cspA*, *cspB*, *cspE* y *cspG*). La cepa BX04 es muy sensible a temperaturas bajas, dicha sensibilidad puede revertirse si se complementa con un gen codificante para una chaperona de RNA (Xia *et al.* 2001).

El objetivo de este estudio fue demostrar si la proteína AtGRDP1 y la versión de splicing alternativo (AS\_AtGRDP1) tienen actividad como chaperona de RNA a través del sistema de anti-terminación de la transcripción en la cepa RL211. Adicionalmente, se llevó a cabo el estudio del efecto de la aplicación exógena de ABA en bajas concentraciones en la línea mutante del gen *AtGRDP1* y la línea sobre-expresante 35S::*AtGRDP1-6* durante la germinación y desarrollo de cotiledones de la plántulas con el propósito de conocer a detalle el nivel de sensibilidad a ABA de la mutante *Atgrp1*. Los resultados anteriores apoyan la idea de que la proteína AtGRDP1 actúa como una chaperona de RNA, y que la ausencia del gen provoca sensibilidad a ABA durante la germinación y desarrollo de cotiledones verdes aún en bajas concentraciones de esta fitohormona.

# Materiales y métodos

## Evaluación de la actividad como anti-terminador de la transcripción

### Clonación en el vector pNIII

El marco abierto de lectura del gen *AtGRDP1* y el de la versión de splicing alternativo (*AS\_AtGRDP1*) se amplificaron a partir de una biblioteca de cDNA de *Arabidopsis* empleando ACTaq® Blue High Fidelity Mastermix (ACTGene). Se utilizó el par de oligonucleótidos Fw22Ec/Rv22Bam (Tabla 1) para amplificar la versión *AtGRDP1*, y el par Fw22Ec/Rv22spHi (Tabla 1) para obtener el amplicón de *AS\_AtGRDP1*. Posteriormente, el producto de la versión *AtGRDP1* se clonó en el sitio EcoRI/BamHI, y el de la versión *AS\_AtGRDP1* en el sitio EcoRI/HindIII del vector pNIII, donado amablemente por el Dr. Masayori Inouye (Robert Wood Johnson Medical School). De manera similar, el gen *cspA* se obtuvo utilizando el par FwcspAEc/RvcspAHi (Tabla 1) a partir de un lisado de *E. coli*. Subsecuentemente, el producto se clonó en el sitio EcoRI/HindIII del vector pNIII. Todas las construcciones fueron verificadas por secuenciación.

### Prueba de anti-terminación en *E. coli* RL211

Para probar la actividad anti-terminación de la transcripción (Landick *et al.* 1990), se transformaron las construcciones generadas y el vector pNIII vacío en células electrocompetentes de *E. coli* RL211 proporcionadas amablemente por la Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles (Instituto de Biotecnología de la UNAM). Las clonas transformadas se crecieron cada una en LB líquido con ampicilina 100 mg/L y tetraciclina 10 mg/L por una noche y al día siguiente inoculó medio LB líquido con éstas. Los cultivos se siguieron hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 1.0. Después, se diluyeron de manera seriada en medio LB ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ ). Se probaron diferentes concentraciones de cloranfenicol (12, 16 y 18 mg/L) en placas de LB con ampicilina 100 mg/L, tetraciclina 12.5 mg/L e isopropil-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 500  $\mu$ M. Se mantuvieron a 37°C hasta observar crecimiento.

## **Evaluación de la sensibilidad a ABA de la línea mutante *Atgrdp1* comparado con la línea hipersensible 35S::*AtABI5***

### **Esterilización, germinación y condiciones de crecimiento de plántulas**

La línea 35S::*AtGRDP1* número 6 (OE6) utilizada en éste trabajo fue generada previamente, mientras que la línea mutante *Atgrdp1* fue adquirida (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, <http://signal.salk.edu>; Alonso *et al.* 2003), ambas líneas se estudiaron previamente en el trabajo de Rodríguez-Hernández *et al.* 2014. La línea *Atabi5* fue donada amablemente por el Dr. Nam-Hai Chua (Rockefeller University). La línea 35S::*AtABI5-8* fue generada de acuerdo a la sección de generación de plantas sobre-expresoras (ver punto 3 de esta sección).

Todas las semillas empleadas fueron cosechadas al mismo tiempo y almacenadas por no más de 6 meses antes de su uso. Las semillas se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 20% (v/v) por 6 min, posteriormente 3 min con agua destilada estéril 5 veces. Para su germinación y análisis, las semillas se colocaron en placas con medio MS 0.5x (Murashige y Skoog 1962), pH de 5.7, suplementado con 0.5% (p/v) de sacarosa y 0.7% (p/v) de phytigel. Se incluyeron medios con distintas concentraciones de ácido abscísico (ABA) de 0.25 a 1.0  $\mu$ M de ABA para evaluar el comportamiento de las líneas. Las placas con las semillas se mantuvieron a 4°C en oscuridad por 48 h y después se trasladaron a una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad a una temperatura de 22 $\pm$ 2°C.

### **Generación de plantas sobre-expresoras de ABI5 (35S::*AtABI5*)**

Se adquirió el plásmido pENTR-sfi223.1 con la región codificante del gen *AtABI5* (AT2G36270) (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, <http://signal.salk.edu>). Se realizó una recombinación sitio específica del plásmido con el vector destino pMDC32 (Curtis y Grossniklaus 2003) por medio de la enzima LR Clonasa II (Invitrogen). El vector de expresión en plantas pMDC32 contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y el terminador *nos*; además cuenta con el gen higromicina fosfotransferasa (*hptII*) que confiere resistencia al antibiótico

higromicina para la selección de transformantes. La construcción pMDC32+*AtABI5*, fue transformada en células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV2260 por electroporación y posteriormente, se transformaron plantas de *Arabidopsis Col-0* por el método de floral dip (Zhang *et al.* 2006). Las posibles semillas transgénicas 35S::*AtABI5* (F0) fueron seleccionadas en medio MS 0.5 x con higromicina (50 mg/L). Las plantas de la generación F1 fueron pasadas a maceta y crecieron en condiciones controladas (22°C, 16 h luz/8 h oscuridad) hasta producir semillas, las cuales se pasaron nuevamente por selección en higromicina. Las líneas transgénicas homocigas (F3) fueron utilizadas para los análisis de germinación y desarrollo de cotiledones verdes.

### **Análisis estadístico**

Los datos presentados en este trabajo fueron examinados mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de Tukey utilizando el software GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Los datos representan la desviación estándar ( $n=5$ ). Los datos que difieren de  $p=0.05$  fueron considerados como significativos.

## Resultados

### **AtGRDP1 es una proteína rica en glicinas con actividad de chaperona de RNA**

En un estudio anterior, nuestro grupo de trabajo realizó un análisis *in silico* de los posibles motivos en la secuencia de la proteína AtGRDP1 (Rodríguez-Hernández *et al.* 2014), en el cual, identificaron un posible motivo RNP-1, también denominado motivo de reconocimiento de RNA (Varani y Nagai, 1998). Para determinar la funcionalidad de dicho motivo, se realizó la prueba de la anti-terminación de la transcripción en la cepa RL211 descrita en 1990 por Landick y colaboradores (Figura 1A). Este sistema se utilizó para comprobar si ambas versiones de las proteínas, AtGRDP1 y AS\_AtGRDP1 eran capaces de unirse al RNA y de evitar la formación de la horquilla de terminación *trpL* que precede al gen de resistencia a cloranfenicol. El marco abierto de lectura de *AtGRDP1* y de *AS\_AtGRDP1* fueron clonados en el vector de expresión pNIII para *E. coli* (Figura suplementaria 2A). Este vector cuenta con un promotor derivado del promotor de la lipoproteína de *E. coli* controlado por el operador *lac* UV5, de manera que el gen clonado se expresa en presencia de IPTG (Masui *et al.* 1984). Se evaluó el crecimiento de las cepas de *E. coli* RL211 transformadas con las construcciones que contienen la versión de *AtGRDP1* que codifica para la proteína completa y para la versión de la proteína sin glicinas; como control positivo se utilizó la construcción que contiene el gen *cspA* de *E. coli* que codifica para una chaperona de RNA (Figura suplementaria 2B, C, D). Las transformantes se crecieron en medio sin cloranfenicol como control, o en medios con diferentes concentraciones de cloranfenicol. Además se incluyó la cepa transformada con el vector vacío pNIII como control negativo. Cuando todas las transformantes crecieron sobre LB sólido sin cloranfenicol no mostraron diferencias en su capacidad de formar colonias y lograron crecer en todas las diluciones. Sin embargo, cuando fueron goteadas en placas con concentraciones crecientes de cloranfenicol, las células que expresan el gen *AtGRDP1* o las que sobre-expresan el gen *cspA* mostraron mayor crecimiento (Figura 1B).

En la concentración más baja probada de cloranfenicol (12 mg/L), las células transformadas con el gen *AtGRDP1* inducidas con IPTG fueron capaces de formar colonias hasta la dilución  $10^{-3}$  de manera comparable al control positivo (*cspA*), mientras que la cepa que expresa la versión *AS\_AtGRDP1* mostró crecimiento hasta la dilución  $10^{-2}$ . A pesar de lo anterior, las células que expresan la versión *AS\_AtGRDP1* formaron un mayor número de colonias que las células que sólo contienen el vector vacío (Figura 1C).

En las figuras 1D y 1E se observa que al aumentar la concentración de cloranfenicol (16 y 18 mg/L), ni las células transformadas con el vector vacío, ni con el gen *AS\_AtGRDP1* formaron colonias en los goteos más diluidos, excepto en el primero ( $10^{-1}$ ). Si bien, las células que expresan el gen *AtGRDP1* o las que sobre-expresan *cspA* mostraron mayor formación de colonias en 16 y 18 mg/L de cloranfenicol, únicamente las células sobre-expresoras de *cspA* pudieron formar colonias en la segunda dilución ( $10^{-2}$ ) en las placas con cloranfenicol 18 mg/L (Figura 1E). Los experimentos fueron repetidos por triplicado para verificar si había reproducibilidad; sin embargo, todas las réplicas mostraron resultados similares (Figura suplementaria 3).

La expresión de la proteína AtGDRP1 completa confiere resistencia a cloranfenicol a la cepa sensible RL211, lo cual es un indicio de su capacidad de unirse a RNA y de evitar la formación de la horquilla del terminador *trpL* en *E. coli*.

### **La mutante *Atgrdp1* tiene sensibilidad a ABA reducida**

En 2014, Rodríguez-Hernández *et al.* reportaron el efecto de la fitohormona ABA a altas concentraciones (5, 7 y 9  $\mu$ M) en las líneas que sobre-expresoras (35S::*AtGRDP1*) y sobre la línea mutante (*Atgrdp1*). La línea mutante *Atgrdp1* mostró sensibilidad a ABA, mientras que las líneas 35S::*AtGRDP1* exhibieron el fenotipo contrario. En este estudio, nos planteamos estudiar el nivel de sensibilidad

de la línea mutante del gen *Atgrdp1* a bajas concentraciones de ABA. Para ello, se compararon los porcentajes de germinación entre las semillas de la línea mutante *Atgrdp1*, la sobre-expresora 35S::*AtGRDP1-6*, y la parental (Col-0) en medio con 0.25, 0.75 y 1.0  $\mu\text{M}$  de ABA. Adicionalmente incluimos en este estudio la línea mutante del factor transcripcional ABI5 (*Atabi5*), cuyas semillas no presentan inhibición de la germinación ni del desarrollo de los germinados bajo la aplicación exógena de ABA, es decir, son insensibles a ABA (Lopez-Molina *et al.* 2002). Para tener un control de hipersensibilidad a ABA, en esta tesis generamos líneas sobre-expresoras del gen *AtABI5* bajo el control del promotor 2x35S del virus del mosaico de la coliflor (35S::*AtABI5*) (ver sección de generación de sobre-expresoras en Materiales y métodos); el nivel de hipersensibilidad a ABA de las líneas generadas se analizó de manera similar al reporte de Lopez-Molina *et al.* 2002. Para ello se evaluó en 4 líneas 35S::*AtABI5* obtenidas el efecto de la aplicación exógena de ABA a bajas concentraciones (0.25, 0.75 y 1.0  $\mu\text{M}$ ). Todas las líneas sobre-expresoras presentaron un menor porcentaje de germinación y desarrollo de cotiledones verdes comparado con Col-0 en presencia de ABA. En medios con ABA 0.25  $\mu\text{M}$  (día 3) (Figura suplementaria 4B), todas las líneas 35S::*AtABI5* tuvieron una disminución del 50% en el porcentaje de germinación comparando contra Col-0; asimismo, en ABA 0.75  $\mu\text{M}$  y 1.0  $\mu\text{M}$  (día 5) (Figura suplementaria 4C y 4D), las líneas 35S::*AtABI5* mostraron una disminución de cerca del 60% con respecto de Col-0. De las 4 líneas 35S::*AtABI5* se seleccionó la línea 35S::*AtABI5-8* como control para los análisis posteriores.

No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de germinación entre las líneas en el medio control (Figura 2A). En la Figura 2B, en el medio con ABA 0.25  $\mu\text{M}$ , se observa que en el día 3 aproximadamente el 71% de las semillas de Col-0 lograron germinar, mientras que el 50% de las semillas de la mutante *Atgrdp1* y el 25% de las semillas de la línea 35S::*AtABI5-8* germinaron, lo cual equivale a una reducción del 28 y 64%, con respecto a la línea Col-0. Por otro lado, las líneas 35S::*AtGRDP1-6* y *Atabi5* exhibieron un fenotipo de insensibilidad a ABA, ya que tuvieron un incremento en la germinación del 26 y 30% respectivamente,

comparando con las semillas de la línea Col-0. Al cuarto día y quinto, ya no se observaron diferencias entre los porcentajes de germinación de las líneas *Atgrdp1*, *35S::AtGRDP1-6*, *Atabi5* o Col-0, no obstante, las semillas de la *35S::AtABI5-8* mantuvieron una baja tasa de germinación: 47% en el día 3 y 76% en el día 4.

Se observó un comportamiento similar en medio con ABA 0.75  $\mu$ M (Figura 2C). En el día 3, alrededor del 50% de las semillas de Col-0, cerca de un tercio de las semillas (32%) de la mutante *Atgrdp1* y menos de una décima parte (9.4%) de las semillas *35S::AtABI5-8* germinaron, lo anterior representa una disminución del 36% en la germinación de las semillas *Atgrdp1* y del 81% de las semillas *35S::AtABI5-8* con respecto a Col-0. De manera contraria, la tasa de germinación de las líneas *35S::AtGRDP1-6* y *abi5* tuvo un incremento del 70 y 100% respectivamente, sobre Col-0. Al día 4, se observa el mismo comportamiento; sin embargo, en el día 5 no se observaron diferencias entre la germinación de las líneas a excepción de *35S::AtABI5-8*, cuya germinación se redujo casi el 60% comparando con Col-0.

En la Figura 2D, se muestran los resultados de la prueba en medio con 1.0  $\mu$ M de ABA. En el día 3, las semillas Col-0 alcanzaron el 43% de germinación, mientras que el 29% de las semillas de la línea *Atgrdp1* y el 5% de las semillas de la línea *35S::AtABI5-8* germinaron, lo que representa una disminución del 31 y 87.5% comparando con la germinación de Col-0. Las líneas *35S::AtGRDP1-6* y *abi5* alcanzaron el 51 y 77% de germinación en las mismas condiciones (18 y 81% respectivamente, por encima de la parental). En el día 4 se observaron resultados similares, las semillas *Atgrdp1* y *35S::AtABI5-8* germinaron 69 y 21% respectivamente, lo cual significa una disminución del 15% (*Atgrdp1*) y 74% (*35S::AtABI5-8*) con respecto a la línea Col-0. De forma contraria, las semillas de las líneas *35S::AtGRDP1-6* y *abi5*, que tuvieron un incremento en la tasa de germinación de 11.5 y 20% respectivamente al comparar con la de la línea parental. Al día 5, la línea *35S::AtABI5-8* mostró una disminución del 59% en la tasa de germinación comparando contra Col-0, mientras que no se observó diferencia entre las otras líneas.

Los resultados anteriores mostraron que la línea *Atgrdp1* es una línea sensible a ABA comparándola con Col-0, pero menos sensible que la línea 35S::*AtABI5-8*. A los 10 días del experimento se tomó el registro del desarrollo de los cotiledones verdes (Figura 3). No se observaron diferencias significativas en los porcentajes entre las líneas en el medio control, ni en los medios con ABA 0.25 y 0.75  $\mu\text{M}$ . No obstante en el medio con ABA 1.0  $\mu\text{M}$ , alrededor del 50% de las plántulas Col-0 y de las mutantes *Atgrdp1* lograron desarrollar cotiledones verdes, mientras que las plántulas de la línea 35S::*AtABI5-8* el 27%, lo que representa una disminución del 47% con respecto de Col-0. Las líneas 35S::*AtGRDP1-6* y *Atabi5* alcanzaron el 69 y 97% respectivamente, lo que significa un aumento del 35 y del 94% comparando contra Col-0.

Los resultados de este estudio indican que la mutante *Atgrdp1* tiene un retraso en el desarrollo durante la germinación en presencia de las concentraciones de ABA probadas en comparación con Col-0, pero no frena su desarrollo, ni el desarrollo de cotiledones verdes a las concentraciones de ABA utilizadas en este estudio.

## Discusión

A pesar de los avances que ha tenido la biología molecular hoy en día, un porcentaje importante de genes de genomas eucariotas están anotados como genes que codifican para proteínas de función desconocida. En 2013, Luhua *et al.* reportaron que cerca del 13% de las proteínas predichas en el genoma de *Arabidopsis* están clasificadas como proteínas de función desconocida, y más del 30% como proteínas poco caracterizadas, dentro de esas clasificaciones podrían encontrarse genes con funciones importantes durante la respuesta a estrés abiótico. En 2014, nuestro grupo de trabajo reportó por primera vez el gen *AtGRDP1* de *Arabidopsis*, un gen de función desconocida. Los estudios iniciales se basaron en el análisis de las líneas sobre-expresoras y de la mutante en presencia de agentes inductores de estrés abiótico durante la germinación y el desarrollo de cotiledones verdes. Este gen mostró ser de gran importancia durante la respuesta a estrés abiótico en *Arabidopsis*, ya que las líneas sobre-expresoras del gen *AtGRDP1* germinan y se desarrollan mejor que la línea parental (Col-0) en presencia de sorbitol, manitol, NaCl y LiCl, mientras que la línea mutante se afecta severamente en presencia de estos inductores de estrés (Rodríguez-Hernández *et al.* 2014). A pesar de conocer la relevancia biológica del gen *AtGRDP1* en respuesta al estrés abiótico de *Arabidopsis*, la actividad que realiza la proteína *AtGRDP1* es desconocida, por lo que en este estudio nos propusimos descubrirla (Figura suplementaria 1). La hipótesis fue saber si *AtGRDP1* es una proteína con actividad de chaperona de RNA y fue planteada con base en dos puntos: 1) La presencia de dominios y motivos en la secuencia de aminoácidos de *AtGRDP1*, como el dominio rico en glicinas, el dominio DUF1399 y el motivo posible de unión a RNA (RNP-1); 2) El antecedente de la existencia de otras proteínas ricas en glicina con actividad chaperona de RNA (RB-GRPs, Mangeon *et al.* 2010). Otro dato interesante fue encontrado en la base de datos TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource, <https://www.arabidopsis.org/>), a partir del gen *AtGRDP1* podría generarse una variante de splicing alternativo como consecuencia de la retención del sexto intrón. Esta variante fue denominada AS\_*AtGRDP1* y es una proteína más corta hacia el

carboxilo terminal, sin el dominio rico en glicinas.

Para analizar la funcionalidad del motivo RNP-1 en ambas versiones del gen *AtGRDP1*, se realizó la prueba de anti-terminación de la transcripción en la cepa de *E. coli* RL211. Esta cepa tiene integrado en su genoma un cassette con el gen de resistencia a cloranfenicol río abajo del terminador de la transcripción *trpL*. Los terminadores bacterianos independientes de  $\sigma$  forman una estructura tipo horquilla para terminar la transcripción; las interacciones proteína-RNA pueden prevenir la formación de la estructura terminadora. Cuando se expresa alguna proteína de unión a RNA con actividad de chaperona, como por ejemplo la CspA de *E. coli*, la RNA polimerasa no se detiene y es capaz de seguir transcribiendo río abajo del terminador. Fundamentado en lo anterior, si se transforma la cepa RL211 con una proteína con actividad de chaperona de RNA se logra transcribir el gen de resistencia al cloranfenicol. Una chaperona de RNA es una proteína de unión a RNA que interactúa con estructuras secundarias del mensajero que cuando se forman, impiden su traducción en ciertas condiciones desfavorables para los organismos, por ejemplo durante la aclimatación y el estrés a frío. Estas chaperonas estabilizan la conformación correcta de los mensajeros para su traducción (Rajkowitsch *et al.* 2007). Los resultados mostraron que la expresión heteróloga de la versión *AtGRDP1* hace posible el crecimiento de células RL211 en medio con cloranfenicol de manera similar a las células sobre-expresoras de la chaperona de RNA CspA. Este estudio sugiere que la proteína *AtGRDP1* tiene capacidad para unirse a la estructura generada por el terminador *trpL*, y de esta manera evita la terminación de la transcripción del mensajero que incluye el gen de resistencia a cloranfenicol. La expresión de la versión *AS\_AtGRDP1* no brinda resistencia a cloranfenicol de la misma forma que la versión completa que tiene el dominio rico en glicinas. Recientemente, se ha reportado que el dominio rico en glicina de las RB-GRPs podría funcionar como una región de interacción con los dominios ricos en glicina de otras RB-GRPs (Khan *et al.* 2014, Ciuzan *et al.* 2015a). La siguiente incógnita es descubrir si la proteína *AtGRDP1* puede interactuar consigo misma a través de los dominios ricos en glicina formando dímeros o multímeros, es una pregunta que

pronto contestaremos en nuestro grupo de investigación. Sin embargo, hasta el momento los resultados apuntan a que la versión completa de la proteína AtGRDP1 podría estar actuando de manera cooperativa sobre la estructura tipo horquilla del terminador en el RNA, en comparación con la versión AS\_AtGRDP1, que al carecer del dominio rico en glicinas, no puede deshacer la estructura de terminación.

El papel de las GRPs como chaperonas de RNA fue sugerido debido a que su dominio de unión a RNA (RRM) tiene características estructurales similares al dominio CSD (del inglés Cold Shock Domain) de las proteínas de unión a RNA de las bacterias. Los sistemas para demostrar la actividad tipo chaperona en *E. coli*, como el de la cepa RL211 y de la BX04 muestran que las proteínas con el dominio RRM pueden sustituir la función de las proteínas con CSD de las bacterias (Graumann y Marahiel 1998, Maruyama *et al.* 1999). La proteína AtGRP7 es una RB-GRP ampliamente estudiada en Arabidopsis, está conformada por 176 aminoácidos y contiene un dominio RRM. Su función ha sido estudiada en respuesta a estrés biótico y abiótico (Kim *et al.* 2008, Kwak *et al.* 2011, Ciuzan *et al.* 2015a). Además se sabe que regula las oscilaciones circadianas de su propio transcrito (Schöning *et al.* 2007). Se ha confirmado su función como chaperona de RNA mediante los sistemas de expresión en *E. coli* RL211 y BX04 (Kim *et al.* 2007). La proteína AtGRP7 regula su propia expresión negativamente a nivel post-transcripcional por medio del splicing alternativo. Cuando la producción de la proteína se incrementa, esta es capaz de reconocer su propio pre-mRNA y de provocar la retención de la mitad del primer intrón que incluye un codón de paro prematuro, haciendo que el transcrito se degrade rápidamente vía “nonsense-mediated decay” (NMD, por sus siglas en inglés) (Schöning *et al.* 2008).

En plantas, las RB-GRPs actúan durante los cambios ambientales, se inducen tanto en respuesta a estrés biótico como abiótico, y algunas se regulan su expresión en presencia de la fitohormona ABA (revisado por Jung *et al.* 2013). El ABA participa en procesos de crecimiento y desarrollo así como en la respuesta a estrés abiótico por medio de una vía compleja de transducción de señales que activan genes de

respuesta a estrés abiótico (Yoshida *et al.* 2014). A pesar de que los niveles de ABA endógenos son necesarios para inducir la latencia en el proceso de maduración de la semilla de *Arabidopsis*, la germinación puede ser inhibida por la aplicación de ABA exógena en concentraciones superiores a 3  $\mu\text{M}$  (Finkelstein *et al.* 2002). La de aplicación exógena de ABA en diferentes concentraciones ha servido para identificar líneas sensibles o insensibles a ABA, y así descubrir genes involucrados en la vía de señalización del ABA. Las líneas 35S::*AtGRDP1* son capaces de germinar y desarrollarse bajo concentraciones altas de ABA (insensibles), debido a que tienen reprimidos a los factores de transcripción *ABI3* y *ABI5*, actores clave en la vía de señalización de ABA (Rodríguez-Hernández *et al.* 2014), mientras que la línea mutante tiene inducidos dichos factores y es sensible a ABA en las mismas condiciones. Debido a que el estudio pasado fue enfocado principalmente a la insensibilidad de las líneas sobre-expresoras, en este estudio nos planteamos evaluar el nivel de sensibilidad a ABA de la línea mutante *Atgrdp1* en bajas concentraciones de ABA. Los resultados mostraron que la mutante *Atgrdp1* presenta una mayor sensibilidad a ABA en comparación con la parental (Col-0), pero una menor comparando con una línea transgénica 35S::*AtABI5*, la cual es hipersensible al ABA. Esto podría deberse a que bajo la aplicación exógena de ABA, la mutante *Atgrdp1* tiene una mayor inducción en la expresión del factor de transcripción *AtABI5* en comparación a Col-0 (Rodríguez-Hernández *et al.* 2014); sin embargo, la línea sobre-expresora del gen del gen *AtABI5*, la cual está bajo el promotor viral 35S, tiene una expresión mucho mayor que la línea mutante *Atgrdp1*, por lo que las líneas 35S::*AtABI5* son más sensibles al ABA. Las RB-GRPs regulan genes involucrados durante cambios ambientales a lo largo del ciclo de vida de las plantas. Los estudios de Cao *et al.* 2006 y de Ciuzan *et al.* 2015b, muestran que la interrupción por inserción de T-DNA del gen *AtGRP7*, provoca una hipersensibilidad a ABA en concentraciones de 0.2  $\mu\text{M}$  durante la germinación; además, la mutante del gen *AtGRP7* presenta sensibilidad en condiciones de estrés osmótico y salino durante la germinación y el desarrollo de planta.

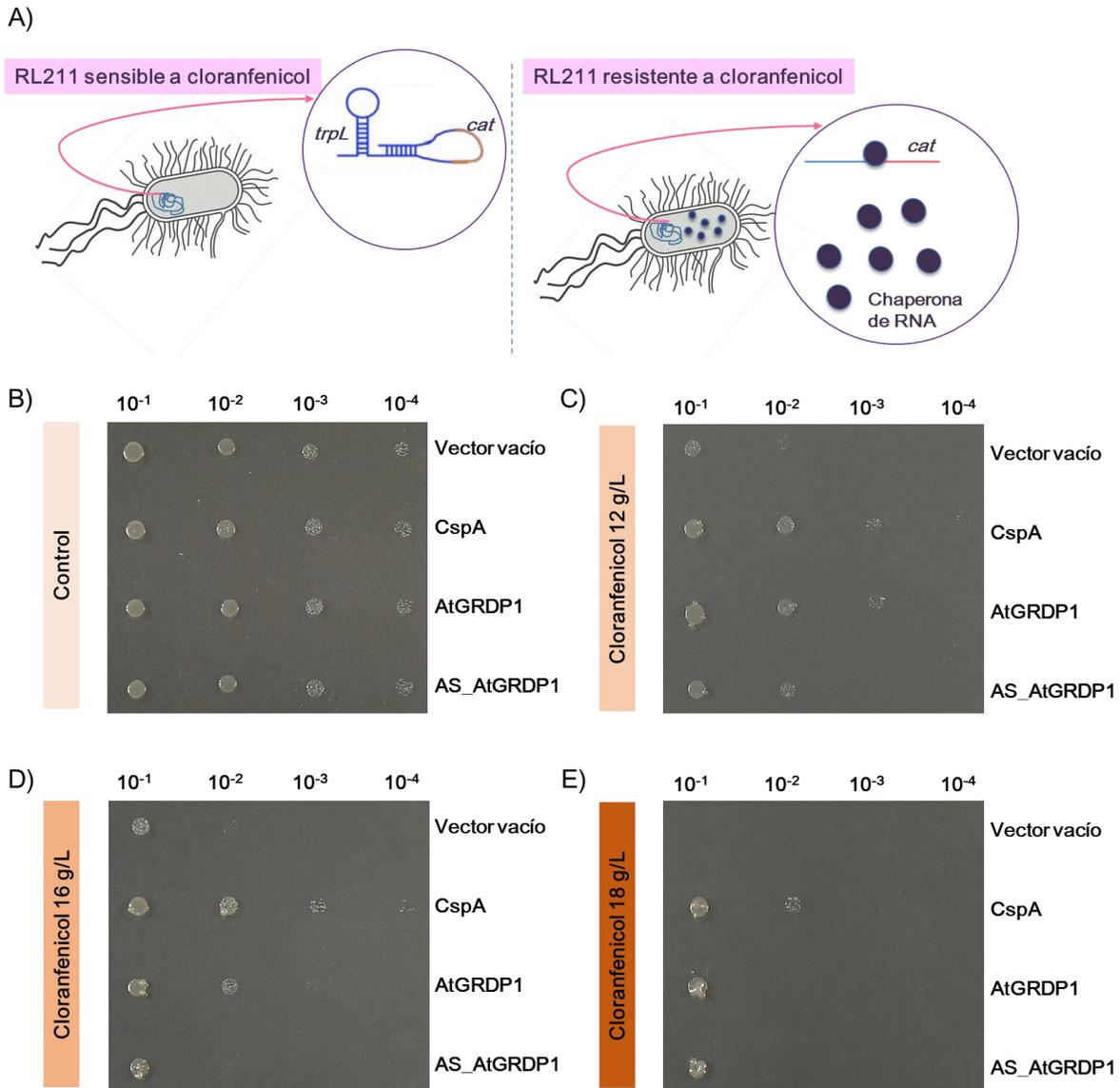
En nuestro esfuerzo para caracterizar al gen *AtGRDP1*, los resultados obtenidos en esta tesis son trascendentales, ya que muestran que la versión completa de la proteína AtGRDP1 presenta actividad como chaperona de RNA. Actualmente estamos realizando secuenciación masiva de la línea mutante y sobre-expresora de AtGRDP1 bajo la aplicación exógena de ABA, para determinar si existen diferencias en splicing alternativo de los transcriptomas, o en la expresión diferencial entre la mutante y la sobre-expresora. También, la identificación de RNAs blanco *in planta*, y conocer las proteínas con las cuales pudiera interactuar sería de gran utilidad para explicar su papel a nivel molecular durante condiciones de estrés abiótico.

## Tablas

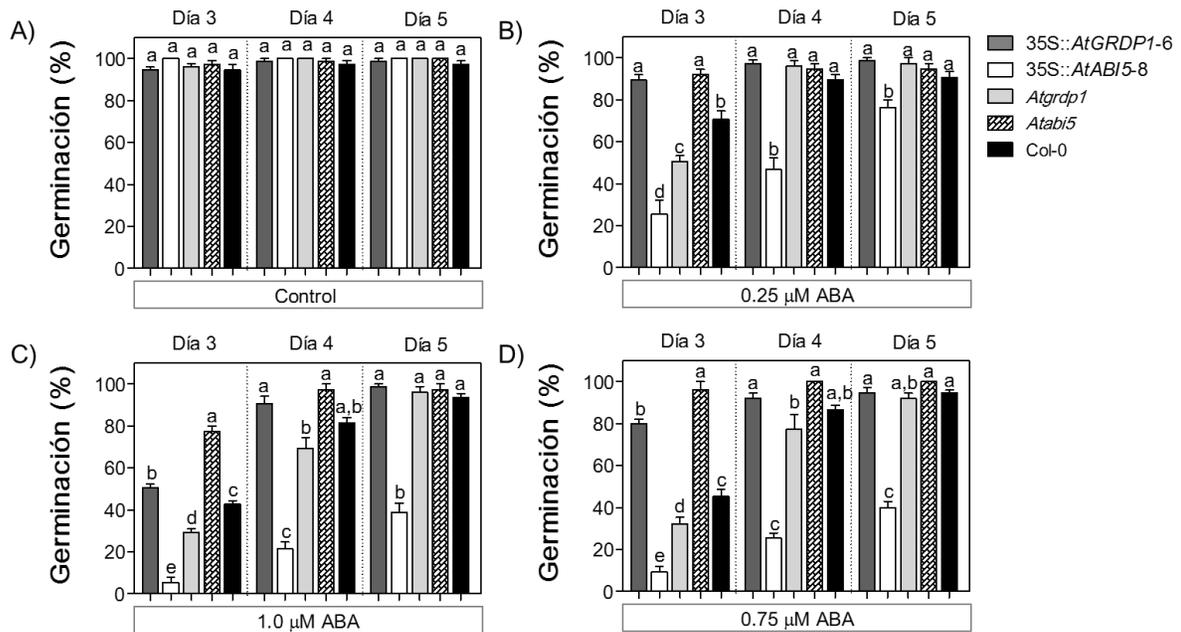
**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar las versiones *AtGRDP1* y *AS\_AtGRDP1* y el control *cspA*, para su clonación en el vector pINIII.

Oligonucleótido	Secuencia
Fw22Ec	5'-CGGAATTCATGGATAAGGGAGAAGGATCATG-3'
Rv22Bam	5'-CGCGGATCCTTATGCTGCTTTCACCATGTTCC-3'
Rv22spHi	5'-GGGAAGCTTTTACTGGAATAAAATGGTGGAAATATAC-3'
FwcspAEc	5'-CGGAATTCATGTCCGGTAAAAATGACTGG-3'
RvcspAHi	5'-GGGAAGCTTTTACAGGCTGGTTACGTTA-3'

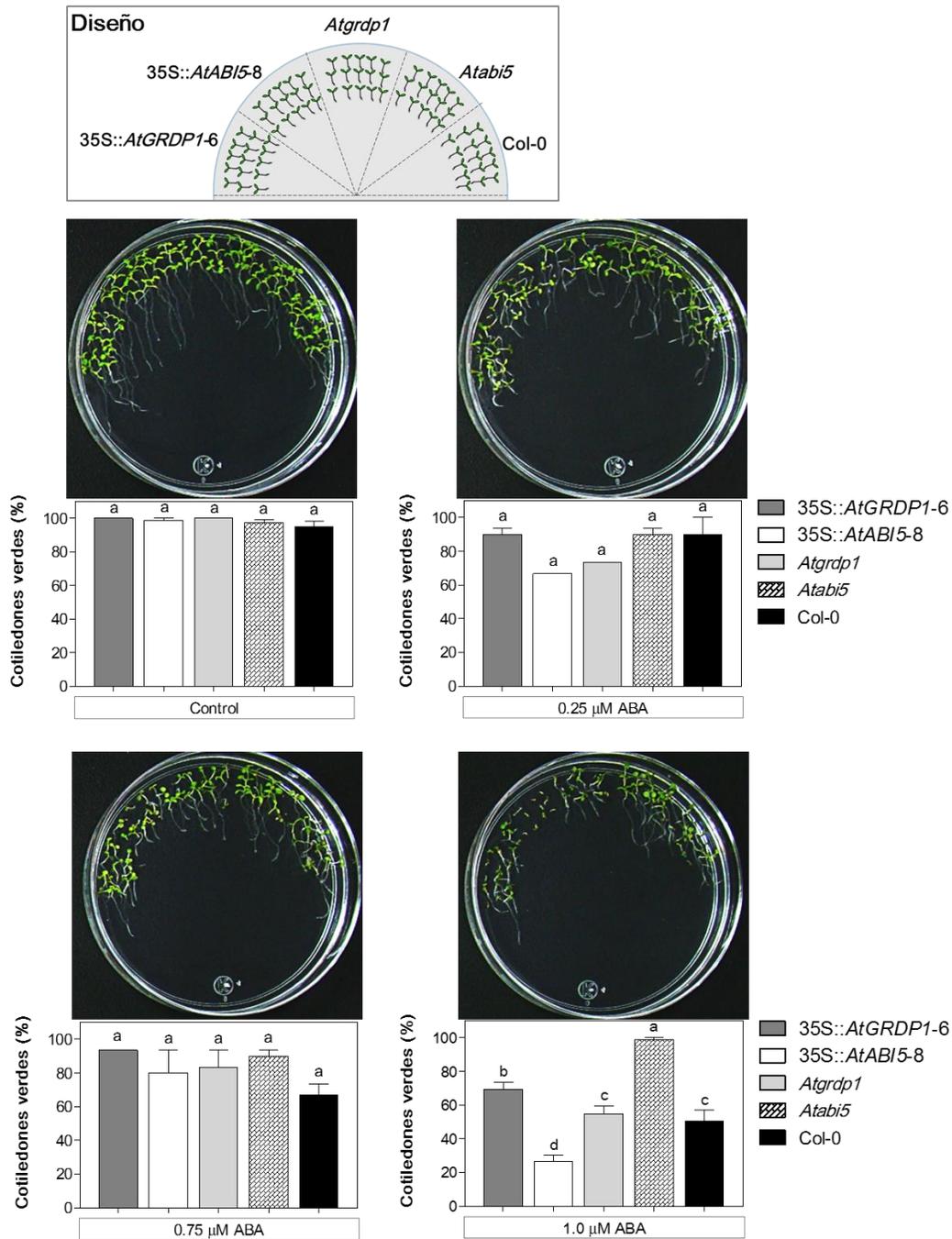
## Figuras



**Figura 1.** Actividad de la proteína AtGRDP1 como chaperona de RNA. A) Prueba de anti-terminación de la transcripción en la cepa RL211 de *E. coli*. Las células que contienen al vector vacío pINIII, pINIII+*AtGRDP1*, pINIII+*AS\_AtGRDP1* o pINIII+*cspA* (control positivo) se crecieron hasta una OD<sub>600</sub>=1 y se diluyeron de forma serial (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup>). Para evaluar la actividad, las diluciones se gotearon en medio selectivo con IPTG 500 μM: B) Control (sin cloranfenicol), con cloranfenicol C) 12 mg/L, D) 16 mg/L y E) 18 mg/L. Las placas fueron incubadas a 37°C, 1 día para el control y 4 días para aquellas con cloranfenicol.

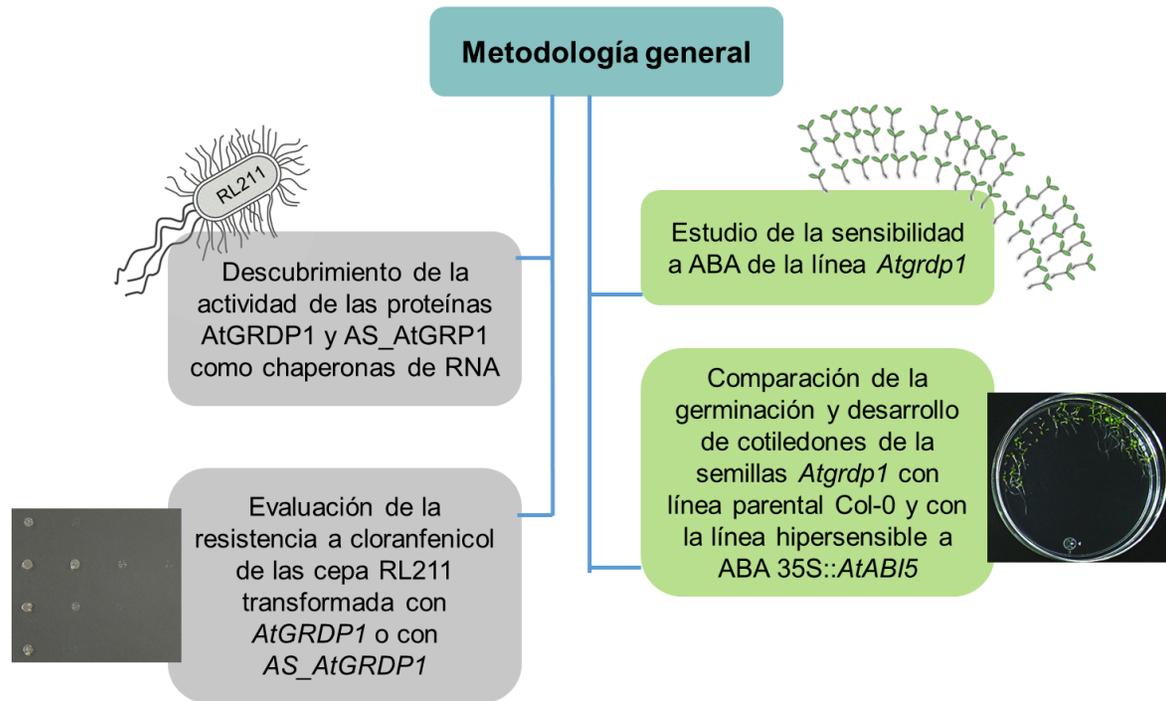


**Figura 2.** Porcentaje de germinación de semillas 35S::AtGRDP1, 35S::AtABI5-8, Atgrdp1, Atabi5 y Col-0 en medio con y sin ABA. Las semillas de cada línea fueron germinadas en medio MS 0.5x Control (A), MS 0.5x con ABA 0.25 μM (B), MS 0.5x con ABA 0.75 μM (C) y MS 0.5x con ABA 1.0 μM (D). El registro de los porcentajes se llevó a cabo del día 3 al 5 después del periodo de vernalización (4°C/48h). Las barras representan la media ± desviación estándar ( $n=15$ ) de 5 réplicas. Las letras indican la diferencia significativa entre las líneas 35S::AtGRDP1, 35S::AtABI5-8, Atgrdp1, Atabi5 y Col-0, mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey ( $p<0.05$ ).

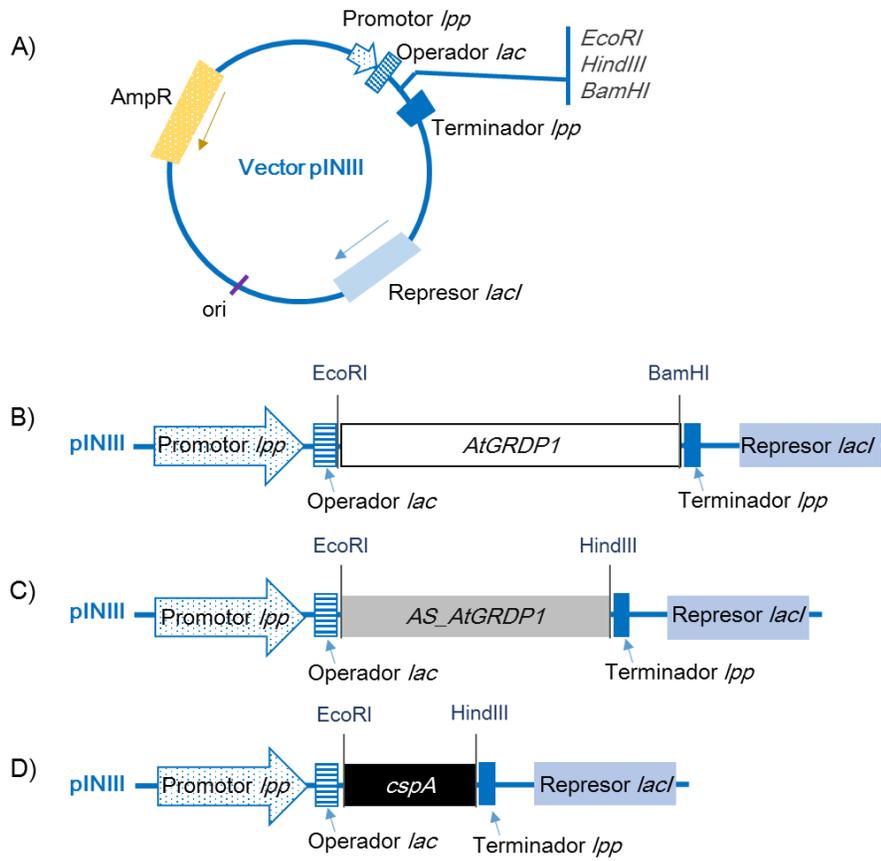


**Figura 3.** Porcentaje de desarrollo de cotiledones verdes de plántulas 35S::*AtGRDP1*, 35S::*AtABI5-8*, *Atgrdp1*, *Atabi5* y Col-0 en medio con y sin ABA. Las semillas de cada línea fueron germinadas en medio MS 0.5x Control, MS 0.5x con ABA 0.25  $\mu$ M, MS 0.5x con ABA 0.75  $\mu$ M y MS 0.5x con ABA 1.0  $\mu$ M. El registro de los porcentajes se llevó a cabo al día 10 después del periodo de vernalización (4°C/48h). Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=15$ ) de 5 réplicas. Las letras indican la diferencia significativa entre las líneas 35S::*AtGRDP1*, 35S::*AtABI5-8*, *Atgrdp1*, *Atabi5* y Col-0, mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey ( $p<0.05$ ).

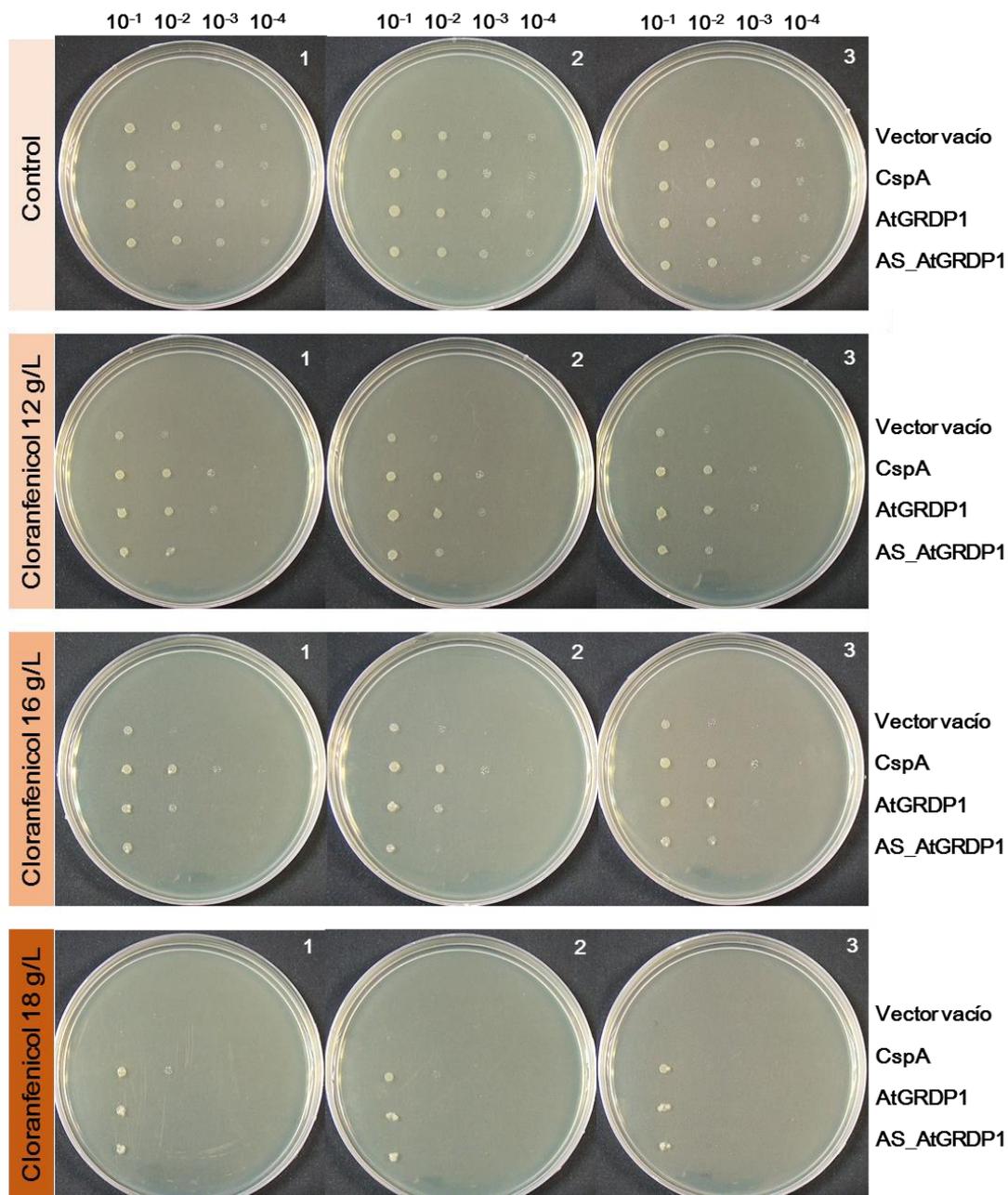
## Buscando evidencia de función de AtGRDP1



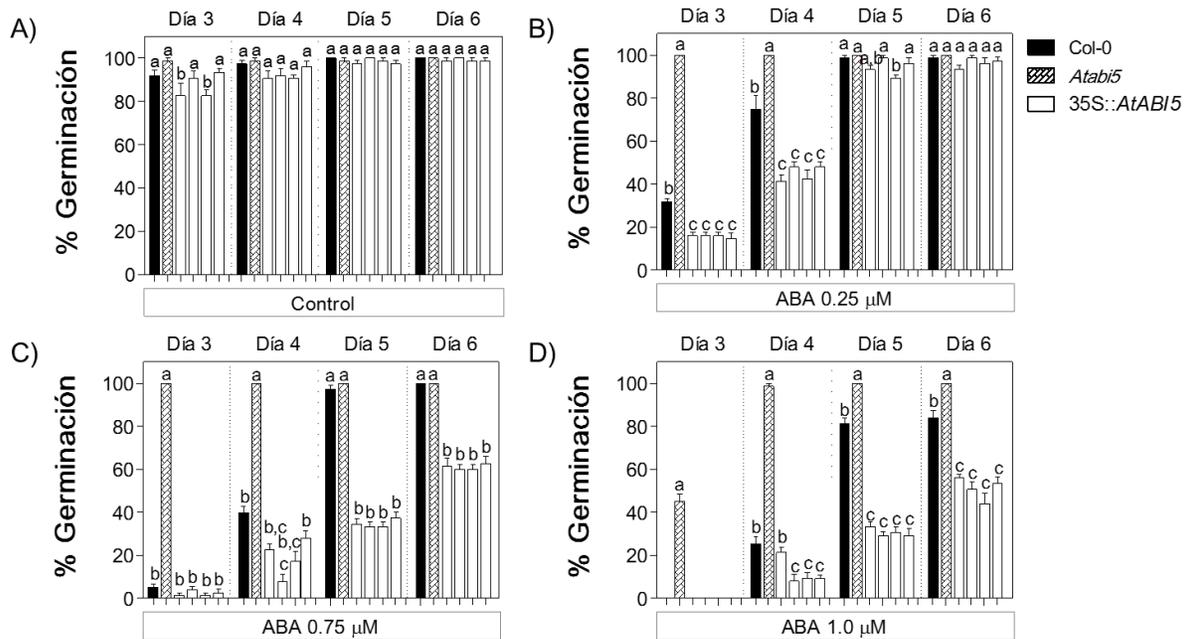
**Figura suplementaria 1.** Esquema general de la metodología. Descripción general la metodología lleva a cabo durante el trabajo de tesis utilizado para descubrir la función de la proteína AtGRDP1. La parte de evaluación de función fue llevada a cabo en el sistema de *E. coli* RL211. Adicionalmente se estudió la sensibilidad de la línea mutante *Atgrdp1* durante la germinación y el desarrollo de cotiledones verdes.



**Figura suplementaria 2.** Esquema de las construcciones en el vector pINIII. A) El vector pINIII contiene el promotor de la lipoproteína (*lpp*) modificado (Flecha con puntos azules), río abajo tiene insertado el operador *lac* UV5 (Caja con rayas azules); enseguida se encuentra el sitio de clonación, y el terminador *lpp* (Caja índigo). El gen del represor *lacI* está insertado en el plásmido (Caja azul grisáceo); además el plásmido cuenta con el gen  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina (AmpR, Caja amarilla). B) El ORF del gen *AtGRDP1* (Caja blanca) fue clonado en los sitios *EcoRI/BamHI*, C) el ORF de la versión *AS\_AtGRDP1* (Caja gris) en los sitios *EcoRI/HindIII* y D) el gen *cspA* (Caja negra) en los sitios *EcoRI/HindIII*.



**Figura suplementaria 3.** Actividad de la proteína AtGRDP1 como chaperona de RNA (Replicados). Prueba de anti-terminación de la transcripción en la cepa RL211 de *E. coli*. Las células que contienen al vector vacío pINIII, pINIII+*AtGRDP1*, pINIII+*AS\_AtGRDP1* o pINIII+*cspA* (control positivo) se crecieron hasta una  $OD_{600}=1$  y se diluyeron de forma serial ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ). Para evaluar la actividad, las diluciones se gotearon en medio selectivo con IPTG 500  $\mu$ M: A) Control (sin cloranfenicol), con cloranfenicol B) 12 mg/L, C) 16 mg/L y D) 18 mg/L. Las placas fueron incubadas a 37°C, 1 día para el control y 4 días para aquellas con cloranfenicol. Los números 1, 2 y 3 de cada fila corresponden a goteos en placas independientes (triplicado) para cada condición evaluada. Todas las réplicas muestran resultados similares.



**Figura suplementaria 4.** Porcentaje de germinación de semillas 35S::*AtABI5*, *Atabi5* y Col-0 en medio con y sin ABA. Las semillas de cada línea fueron germinadas en medio MS 0.5x Control (A), MS 0.5x con ABA 0.25 μM (B), MS 0.5x con ABA 0.75 μM (C) y MS 0.5x con ABA 1.0 μM (D). El registro de los porcentajes se llevó a cabo del día 3 al 6 después del periodo de vernalización (4°C/48h). Las barras representan la media ± desviación estándar ( $n=15$ ) de 5 réplicas. Las letras indican la diferencia significativa entre las líneas 35S::*AtABI5* (3, 6, 8 y 13), *Atabi5* y Col-0, mediante un análisis de varianza de ANOVA de una vía y una prueba de comparación múltiple Tukey ( $p<0.05$ ).

## Bibliografía

- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653-657.
- Cao S, Jiang L, Song S, Jing R, Xu G. (2006). AtGRP7 is involved in the regulation of abscisic acid and stress responses in *Arabidopsis*. *Cellular and Molecular Biology Letters* 11, 526-535.
- Ciuzan O, Hancock J, Pamfil D, Wilson I, Ladomery M. (2015a). The evolutionarily conserved multifunctional glycine-rich RNA-binding proteins play key roles in development and stress adaptation. *Physiologia Plantarum* 153, 1-11.
- Ciuzan O, Lazar SL, Lung ML, Pop OL, Pamfil D. (2015b). Involvement of the glycine-rich RNA-binding proteins (GRP) in osmotic stress response during seed germination: a comparison between GRP 2 and GRP 7. *Bulletin UASVM Horticulture* 72, 61-67.
- Curtis MD, Grossniklaus U. (2003). A gateway cloning vector set for highthroughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology* 133, 462-469.
- Davies WJ, Tardieu F, Trejo CL. (1994). How do chemical signals work in plants that grow in drying soil? *Plant Physiology* 104, 309-314.
- Finkelstein RR, Somerville CR. (1990). Three Classes of Abscisic Acid (ABA)-Insensitive Mutations of *Arabidopsis* Define Genes that Control Overlapping Subsets of ABA Responses. *Plant Physiology* 94, 1172-1179.
- Finkelstein RR. (1994). Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant Journal* 5, 765-771.
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings 14, S15-S45.

- Graumann PL, Marahiel MA. (1998). A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends in Biochemical Science* 23, 286-290.
- Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJ. (2008). Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist* 1796, 33-54.
- Jung HJ, Park SJ, Kang H. (2013). Regulation of RNA metabolism in plant development and stress responses. *Journal of Plant Biology* 56, 123-129.
- Khan K, Daniëls MA, Folkers GE, Boelens R, Saqlan Naqvi SM, van Ingen H. (2014). Structural basis of nucleic acid binding by *Nicotiana tabacum* glycine-rich RNA-binding protein: implications for its RNA chaperone function. *Nucleic Acids Research* 42, 8705-8718.
- Kim JS, Park SJ, Kwak KJ, Kim YO, Kim JY, Song J, Jang B, Jung CH, Kang H. (2007). Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote the cold adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 35, 506-516.
- Kim SJ, Jung HJ, Lee HJ, Kim KA, Goh CH, Woo Y, Oh SH, Han YS, Kang H. (2008). Glycine-rich RNA-binding protein 7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 55, 455-466.
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H. (2002). Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 33-36.
- Kwak KJ, Park SJ, Han JH, Kim MK, Oh SH, Han YS, Kang H. (2005). Structural determinants crucial to the RNA chaperone activity of glycine-rich RNA-binding proteins 4 and 7 in *Arabidopsis thaliana* during the cold adaptation process. *Journal of Experimental Botany* 62, 4003-4011.
- Landick R, Stewart J, Lee DN. (1990). Amino acid changes in conserved regions of the beta-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase alter transcription pausing and termination. *Genes & Development* 4, 1623-1636.
- Leung J, Giraudat J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 199-222.

- Lopez-Molina L, Mongrand S, Kinoshita N, Chua NH. (2002). AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. *Genes and development* 17, 410-418.
- Lorković ZJ, Barta A. (2002). Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* 30, 623-35.
- Lorković ZJ. (2009). Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization. *Trends in Plant Science* 14,229-36.
- Luhua S, Hegie A, Suzuki N, Shulaev E, Luo X, Cenariu D, Ma V, Kao S, Lim J, Gunay MB, Oosumi T, Lee SC, Harper J, Cushman J, Gollery M, Girke T, Bailey-Serres J, Stevenson RA, Zhu JK, Mittler R. (2013). Linking genes of unknown function with abiotic stress responses by high-throughput phenotype screening. *Physiologia Plantarum* 148, 322-333.
- Mangeon A, Junqueira RM, Sachetto-Martins G. (2010). Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signaling & Behavior* 5, 99-104.
- Maruyama K, Sato N, Ohta N. (1999). Conservation of structure and cold-regulation of RNA-binding proteins in cyanobacteria: probable convergent evolution with eukaryotic glycine-rich RNA-binding proteins. *Nucleic Acid Research* 27, 2029-2036.
- Masui Y, Mizuno T, Inouye M. (1984). Novel high-level expression cloning vehicles: 104-fold amplification of *Escherichia coli* minor protein. *Bio/Technology* 2, 81-85.
- Murashige T, Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15, 473-497.
- Ober ES, Sharp RE. (1994). Proline Accumulation in Maize (*Zea mays L.*) Primary Roots at Low Water Potentials (I. Requirement for Increased Levels of Abscisic Acid). *Plant Physiology* 105, 981-987.
- Rajkowitsch L, Chen D, Stampfl S, Semrad K, Waldsich C, Mayer O, Jantsch MF, Konrat R, Bläsi U, Schroeder R. (2007). RNA Chaperones, RNA Annealers and RNA Helicases. *RNA Biology* 4, 118-130.

- Rodríguez-Hernández AA, Ortega-Amaro MA, Delgado-Sanchez P, Salinas J, Jimenez-Bremont JF. (2014). *AtGRDP1* gene encoding a Glycine-Rich Domain protein is involved in germination and responds to ABA signaling. *Plant Molecular Biology Reporter* 32, 303-616.
- Sachetto-Martins G, Franco LO, de Oliveira DE. (2000). Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochimica et Biophysica Acta* 1492, 1-14.
- Schöning JC, Streitner C, Page DR, Hennig S, Uchida K, Wolf E, Furuya M, Staiger D. (2007). Auto-regulation of the circadian slave oscillator component AtGRP7 and regulation of its targets is impaired by a single RNA recognition motif point mutation. *The Plant Journal* 52, 1119-1130.
- Schöning JC, Streitner C, Meyer IM, Gao Y, Staiger D. (2008). Reciprocal regulation of glycine-rich RNA-binding proteins via an interlocked feedback loop coupling alternative splicing to nonsense-mediated decay in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* 36, 6977-6987.
- Stewart CR, Voetberg G. (1985). Relationship between salt-induced ABA and proline accumulations and ABA-induced proline accumulation in excised barley leaves. *Plant Physiology* 79, 24-27.
- Varani G, Nagai K. (1998). RNA recognition by RNP proteins during RNA processing. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 27, 407-445.
- Xia B, Ke H, Inouye M. (2001). Acquisition of cold sensitivity by quadruple deletion of the *cspA* family and its suppression by PNPase S1 domain in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 40, 179-188.
- Yoshida T, Mogami J, Yamaguchi-Shinozaki K. (2014). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 21, 133-139.
- Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH. (2006). *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols* 1, 641-646.