



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis del mecanismo de regulación de la expresión de genes nucleares que participan en la traducción plastídica mediado por ACS1 en *Arabidopsis thaliana* L. (Heyhn)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

LESLIE ACEVEDO SÁNCHEZ

PATRICIA LEÓN MEJÍA

Instituto de Biotecnología, UNAM

DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

Facultad de Química, UNAM

DRA. VIVIANA VALADEZ DEL CARMEN GRAHAM

Instituto de Biotecnología, UNAM

Ciudad de México. Febrero, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ABREVIACIONES

ACS1: Señal Apocarotenoide 1 (del inglés *Apocarotenoid Signal 1*)

Col: Columbia 0

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

dpg: días post germinación

ERC: Elemento Regulador que actúa en *cis*

FT: Factor transcripcional

GA: Ácido Giberélico

GFP: Proteína Verde Fluorescente (del inglés *Green Fluorescent Protein*)

GNPRP: Genes Nucleares que codifican para Proteínas Ribosomales del Plástido

GUS: enzima β -GLUCURONIDASA

Kb: kilo base

LSU: Subunidad mayor del ribosoma.

LUC: enzima LUCIFERASA

MAB: Meristemo Apical Del Brote

pb: pares de bases

PF: Primordio Foliar

PHANGS: Genes Nucleares Asociados a la Fotosíntesis (del inglés *Photosynthesis Associated Nuclear Genes*)

pre-mRNA: Transcrito naciente

PRP: Proteína Ribosomal del Plástido

PWM: Matriz de Posición de Peso.

R: Purinas (Adenina o Guanina)

REG: Grupo de elementos regulatorios

RI: Región intergénica

RLU: Unidades Relativas de Luz

RNA: Ácido Ribonucleico

RP: Proteína Ribosomal (del inglés *Ribosomal Protein*)

RPL: Proteína Ribosomal De La Subunidad Mayor (del inglés *Ribosomal Protein Large Subunit*)

RPS: Proteína Ribosomal De La Subunidad Pequeña (del inglés *Ribosomal Protein Small Subunit*)

RT-qRT-PCR: PCR cuantitativa (del inglés *Reverse Transcription - quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*)

SSU: Subunidad menor del ribosoma. (del inglés *Small Subunit*)

TFBS: Sitio de unión del Factor de Transcripción (del inglés *Transcription Factor Binding Site*)

TSS: Sitio de Inicio de la Transcripción

UTR: Región No Traducida (del inglés *Untranslated Region*)

WT: Tipo silvestre (del inglés *Wild Type*)

Y: Pirimidinas (Timina o Citosina)

ZC: Zona central del meristemo apical del brote

ZC: Zona central del Meristemo Apical del Brote

ZM: Zona medular del Meristemo Apical del Brote

ZP: Zona periférica

RESUMEN

El plástido es un organelo semiautónomo que posee un genoma propio, sin embargo, la mayoría de los genes necesarios para su funcionamiento y desarrollo se encuentran en el núcleo, por lo que se requiere de una comunicación coordinada entre el plástido y el núcleo, a través de la señalización retrógrada (cloroplasto→núcleo) y anterógrada (núcleo→cloroplasto). La traducción de las proteínas en el plástido es un proceso importante para la biogénesis del cloroplasto y también para el desarrollo de la hoja. Un número importante de elementos involucrados en la traducción del plástido se encuentran codificados en el núcleo, como lo son las proteínas ribosomales del plástido (PRP), sin embargo, se desconoce acerca de su regulación por señales retrógradas. En *Arabidopsis*, mutantes del gen ζ -CAROTENO DESATURASA (*ZDS*: *clb5-1* y *spc1-2*) parecen estar afectadas en la traducción de proteínas en el plástido, lo que causa un fenotipo de hojas en forma de dedos. Se propone que este fenotipo es consecuencia de una señal apocarotenoide (ACS1), que regula los genes nucleares que codifican para *PROTEÍNAS RIBOSOMALES DEL PLÁSTIDO* (GNPRP), por lo que el presente trabajo pretende adentrarse en el mecanismo de regulación de la expresión de los GNPRP. Mediante la cuantificación por RT-qPCR de los transcritos nacientes y maduros de GNPRP, se evidenció que la regulación por ACS1 es a nivel transcripcional. Se identificaron elementos regulatorios en *cis* (ERC) presentes en la mayoría de los GNPRP, entre los cuales se encuentran sitios de unión a factores de transcripción involucrados en el desarrollo de la hoja (MYBS1, KUA1, DIV1), además se encontró un motivo no descrito en los 28 GNPRP (TCTTYTTCYTC). Con el fin de probar experimentalmente esta hipótesis se generaron líneas transgénicas con fusiones transcripcionales de los genes *RPL4*, *RPL10*, *RPL21* y *RPL27*. La expresión del gen reportero bajo el control de la región promotora con una longitud de 466 pb para *RPL10*; 719 pb para *RPL21*; y 910 pb para *RPL27*, contienen los elementos necesarios para su expresión en plantas de tipo silvestre. Sin embargo, en la mutante *spc1-2*, las fusiones transcripcionales de estos genes no mostraron represión.

PALABRAS CLAVE: Señal Apocarotenoide 1 (ACS1), Proteínas Ribosomales del Plástido (PRP), Genes Nucleares que codifican a Proteínas Ribosomales del Plástido (GNPRP), transcrito naciente (pre-mRNA), Sitio de Unión de Factores de Transcripción (TFBS), Elementos Regulatorios en *cis* (ERC).

ABSTRACT

The plastid is a semi-autonomous organelle that has its own genome, however, most of the genes necessary for its functioning and development are found in the nucleus, therefore it is required a coordinated communication between the plastid and the nucleus, through of retrograde (chloroplast→nucleus) and anterograde (nucleus→chloroplast) signaling. Translation of proteins in the plastid is an important process for chloroplast biogenesis and for leaf development. An important number of elements involved in plastid translation are encoded in the nucleus, such as Plastid Ribosomal Proteins (PRP), however, their regulation by retrograde signals is unknown. In *Arabidopsis*, mutants of the ζ -CAROTENE DESATURASE gene (*ZDS: clb5-1* and *spc1-2*) appear to be impaired in protein translation in the plastid, causing a phenotype of finger-like leaves. It is proposed that this phenotype is a consequence of an apocarotenoid signal (ACS1), which regulates the nuclear genes that code for PLASTID RIBOSOMAL PROTEINS (GNPRP). The present work intends to delve into the mechanism of regulation of the expression of GNPRP. By RT-qPCR quantification of the nascent and mature transcripts of GNPRP, it is evident that the regulation by ACS1 is at transcriptional level. Regulatory elements in *cis* (ERC) present in most of the GNPRP were identified, among which are binding sites to transcription factors involved in leaf development (MYBS1, KUA1, DIV1), in addition, only one motif not described was found in the 28 GNPRP (TCTTYTTCYTC). To experimentally test this hypothesis, transgenic lines were generated with transcriptional fusions of the *RPL4*, *RPL10*, *RPL21* and *RPL27* genes. The expression of the reporter gene under the control of the promoter region with a length of 466 bp for *RPL10*; 719 bp for *RPL21*; and 910 bp for *RPL27*, contain the elements necessary for its expression in wild-type plants. However, in the *spc1-2* mutant, transcriptional fusions of these genes did not show transcriptional repression.

KEY WORDS: Apocarotenoid Signal 1 (ACS1), Plastid Ribosomal Proteins (PRP), Nuclear Genes encoding Plastid Ribosomal Proteins (GNPRP), pre-mRNA, Transcription Factor Binding Site (TFBS), Cis Regulatory Elements (ERC).

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Este trabajo se realizó con financiamiento de DGAPA-PAPIIT/UNAM, proyecto número IN207320.

A CONACYT por la beca otorgada durante los estudios de posgrado en el Instituto de Biotecnología, UNAM (CVU: 599841).

A Lourdes Cazadero Rocha y Patricia Jarillo López por su ayuda en la preparación de materiales y soluciones para el laboratorio.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres y hermanos por darme siempre su apoyo.

A la Dra. Patricia León Mejía por aceptarme como estudiante y permitirme ejecutar este proyecto en su laboratorio.

A Eli por su gran ayuda en el desarrollo de RT-qPCR, además de sus consejos técnicos, académicos y todo lo que me ha enseñado.

A la Dras. Tzvetanka Dinkova y Viviana Valadez por sus valiosos consejos y aportaciones en cada tutorial.

A los Dres. Martha Vázquez Laslop, Felipe Cruz, Ma. de la Paz Sánchez Jiménez, Omar Pantoja y Svetlana Shishkova por tomarse su tiempo en la revisión de mi tesis, además de sus valiosos consejos.

A Ramces por enseñarme que de las plantas no sólo aprendemos los procesos si no también estrategias de la vida.

A la Dra. Kenny Alejandra por su explicación de la metodología de cuantificación de luciferasa.

A Joselyn Chávez por su guía en la búsqueda de motivos sobrerrepresentados.

Tabla de contenido

ABREVIACIONES	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT	4
AGRADECIMIENTOS	5
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. ANTECEDENTES.....	19
3. HIPÓTESIS.....	32
4. OBJETIVOS.....	32
4.1 Objetivo general.....	32
4.2 Objetivos particulares	32
6. RESULTADOS.....	33
6.1 La expresión de genes de proteínas ribosomales plásticas codificadas en el núcleo es regulada a nivel transcripcional en las mutantes de <i>ZDS</i>	33
6.2 Análisis del mecanismo de la regulación transcripcional de los GNPRP por ACS1.....	36
6.3 Las mutantes <i>clb5-1</i> y <i>spc1-2</i> están afectadas en la acumulación de RNA ribosomal del plástido.....	56
7. DISCUSIÓN.....	58
7.1 Nivel de regulación de GNPRP en presencia de ACS1.....	58
7.2 Las líneas con las fusiones de <i>pRPL10</i> , <i>pRPL21</i> , <i>pRPL27</i> muestran una fuerte expresión en hojas jóvenes.....	60

7.3	Los ERC requeridos para la represión de <i>RPL10</i> , <i>RPL21</i> , <i>RPL27</i> en respuesta a <i>ACS1</i>	62
7.4	Mutantes de <i>ZDS</i> tienen afectada la acumulación de rRNA del plástido.....	63
8.	CONCLUSIONES.....	65
9.	PERSPECTIVAS.....	66
10.	METODOLOGÍA.....	67
10.1	Condiciones de crecimiento.....	67
10.2	Análisis de expresión por RT-qPCR.....	67
10.3	Análisis de la actividad de luciferasa.....	68
10.4	Análisis del patrón de expresión de GUS.....	68
10.5	Construcciones transcripcionales y transformación genética de <i>A. thaliana</i>	69
10.6	Análisis <i>in silico</i> para la identificación de elementos regulatorios en <i>cis</i> comunes en los promotores de GNPRP afectados por <i>ACS1</i>	72
11.	ANEXOS.....	74
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	87

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos fotosintéticos debido a que poseen cloroplastos lo cuales son organelos de doble membrana, capaces de realizar la fotosíntesis, además de que participan en la biosíntesis de diversos metabolitos esenciales, como carotenoides, clorofilas, aminoácidos, ácidos grasos y hormonas; como las giberelinas y el ácido abscísico (Jarvis y Lopez-Juez et al., 2013).

Los cloroplastos se pueden diferenciar a partir de un plástido no diferenciado denominado proplástido, que se encuentra en nichos de células indiferenciadas, éstas son zonas denominadas meristemas que se encargan de proveer células para el crecimiento y desarrollo de la planta. Conforme se da la diferenciación celular y especialización de tejidos, en paralelo también ocurre la diferenciación de los proplástidos, la cual resulta en distintos tipos de plástidos según el tipo de tejido. Por ejemplo, los cromoplastos, son plástidos que realizan específicamente la síntesis y acumulación de carotenoides y/o antocianos; los amiloplastos, almidón; los elaioplastos, lípidos (**Fig 1.1**). En las hojas, en ausencia de luz, los proplástidos se diferencian a etioplastos, que forman una estructura membranosa denominada cuerpos pro-lamelares (PLB) y tras la exposición a la luz éstos se transforman en tilacoides, que son las membranas internas donde suceden las reacciones de luz de la fotosíntesis, y de esta forma se diferencian a cloroplastos (Vothknecht y Westhoff, 2001, **Fig 1.1**).

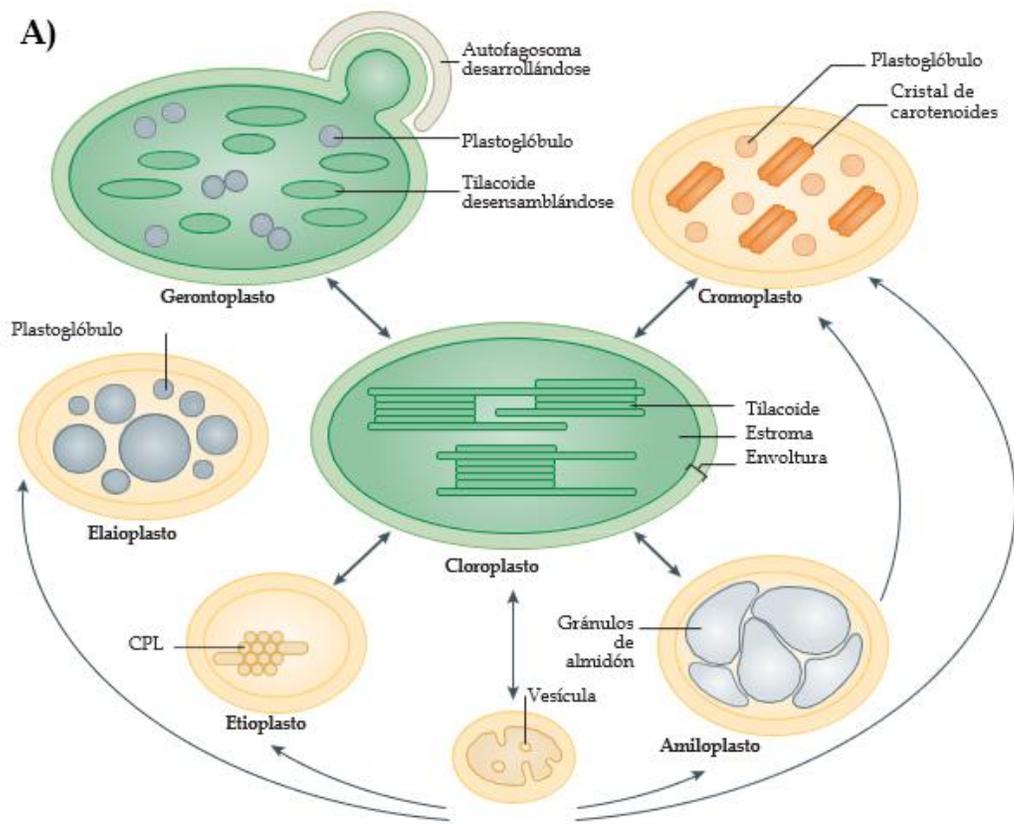


Figura 1.1 Diferentes tipos de plástidos y su diferenciación. A) Tipos de plástidos, cloroplasto, elaioplasto, cromoplasto y gerontoplasto. Tomado de Jarvis y López-Juez (2013).

La diferenciación de proplástido a cloroplasto se lleva a cabo en el ápice del brote, que consiste en el meristemo apical del brote (MAB) y los primordios foliares que lo flanquean. Esta diferenciación ocurre en paralelo con el desarrollo del primordio foliar (Charuvi et al., 2013, **Fig.1.2A-D**). El desarrollo del cloroplasto implica grandes cambios estructurales, en un inicio el proplástido consiste de un estroma indiferenciado rodeado de una doble membrana, la presencia de luz desencadena el agrandamiento del proplástido y la formación de membranas tubulares que se proyectan desde la membrana interna hacia al estroma, luego, las membranas tubulares se extienden en láminas planas que se alinean en paralelo a los tilacoides, al mismo tiempo que la clorofila, componentes de la maquinaria fotosintética, y polisomas se sintetizan e incorporan a los tilacoides (Liang et al., 2018, **Fig. 1.2E-F**).

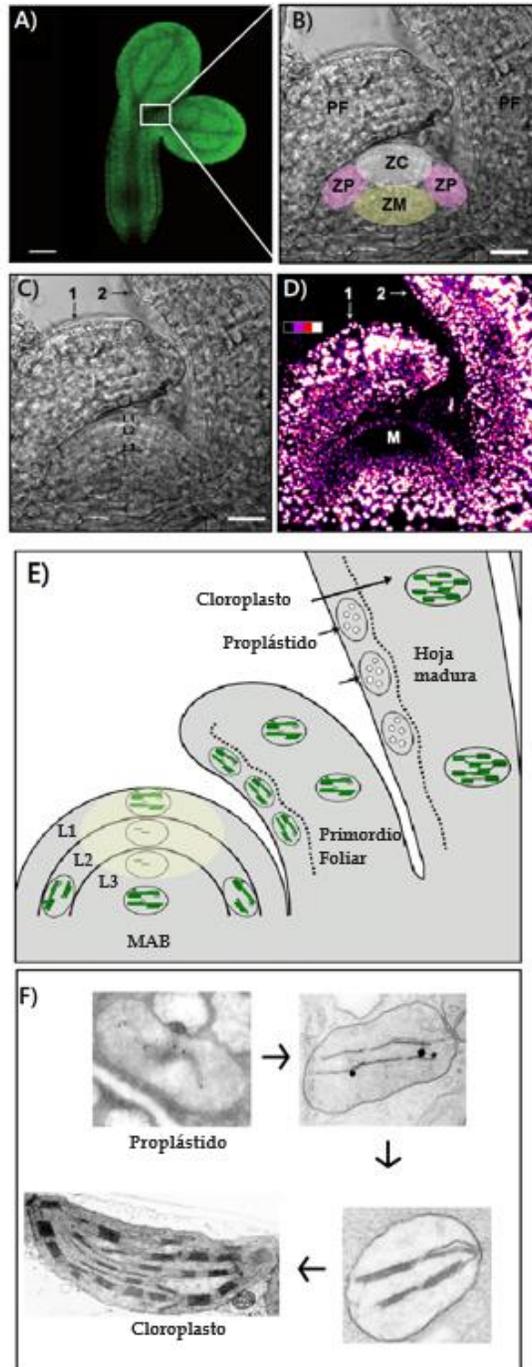


Figura 1.2. La diferenciación de los proplástidos a cloroplastos toma lugar en el Meristemo Apical del Brote. A) Plántula de *Arabidopsis*, señalado en recuadro blanco la amplificación en B. B) las partes que conforman el MAB, Zona central ZC; Zona medular ZM y la zona periférica ZP, de donde surgen los primordios foliares (PF). C) el MAB consta de tres capas denominadas L1, L2, y L3. 1 y 2 son los primordios foliares. D) Fluorescencia de la clorofila en el meristemo, de negro (bajo) a blanco (alto), donde se distingue que en la zona meristemática hay ausencia de clorofila, mientras que en la parte periférica se observa alta fluorescencia, lo que indica cloroplastos diferenciados, con un máximo en

la parte abaxial en los primordios foliares. E) Modelo de la diferenciación de los plástidos en el ápice del brote. Modificado de Charuvi et al. (2012). F) Fotografías de microscopía electrónica de transmisión del cloroplasto en sus diferentes estadios de desarrollo. Modificado de Vothknecht y Westhoff, 2001.

Los plástidos se adquirieron a través de un proceso evolutivo endosimbiótico, con un origen monofilético a partir de procariontes de vida libre relacionados con las cianobacterias, por lo cual conservan un genoma propio (Dyall, 2004; Reyes-Prieto, 2007). En plantas vasculares el genoma del plástido, también denominado como plastoma, contiene alrededor de 128 genes que codifican para proteínas fotosintéticas y de mantenimiento, además de sus RNA ribosomales y la mayoría de los RNA de transferencia (Sugiura, 1992; Martin et al., 1998; Sato et al., 1999).

A pesar de conservar un genoma propio, este organelo a lo largo de su evolución ha perdido la mayoría de los genes que se requieren para su función y desarrollo. Se sabe que el funcionamiento del plástido requiere de aproximadamente 3000 proteínas, lo que indica que más del 90% de estas proteínas se encuentran codificadas en el núcleo y que deben ser importadas al organelo (Sugiura, 1995; Martin et al., 1998; Li y Chiu 2010; Maier et al., 2013).

Debido a que la mayoría de las proteínas necesarias para el desarrollo y funcionamiento del plástido están codificadas en el genoma nuclear, el desarrollo adecuado de plástidos requiere de una comunicación coordinada entre el genoma nuclear y el genoma del plástido y esto se logra a través de la señalización recíproca entre el núcleo y el plástido. El núcleo a través de la señalización anterógrada controla la expresión de muchas proteínas del cloroplasto, incluidas las responsables de la regulación de la transcripción y traducción del genoma plastídico. A su vez, la información sobre el estado y desarrollo del plástido puede regular la expresión de genes nucleares a través de la señalización retrógrada (Nott et al., 2006; Jarvis y López-Juez, 2013; **Fig. 1.3**).

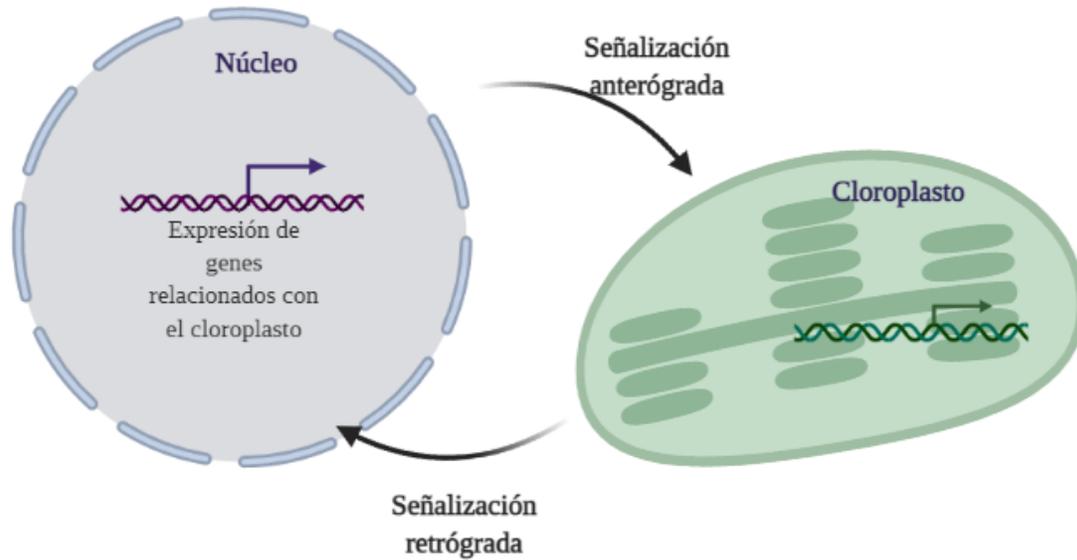


Figura 1.3. La comunicación entre el núcleo y el plástido. La señalización retrógrada consiste en las señales que se translocan del cloroplasto al núcleo, que influyen en la transcripción de los genes nucleares relacionados con el desarrollo y función del plástido. La señalización anterógrada consiste en las señales que se translocan del núcleo al cloroplasto para coordinar su desarrollo y mantener su funcionamiento.

Las vías de señalización retrógrada se agrupan en dos tipos: 1) las de control biogénico, que ocurren durante el desarrollo del plástido y 2) las de control operacional, las cuales implican señales que se generan en respuesta al estado funcional del cloroplasto diferenciado para mantener su funcionamiento (**Fig. 1.4**).

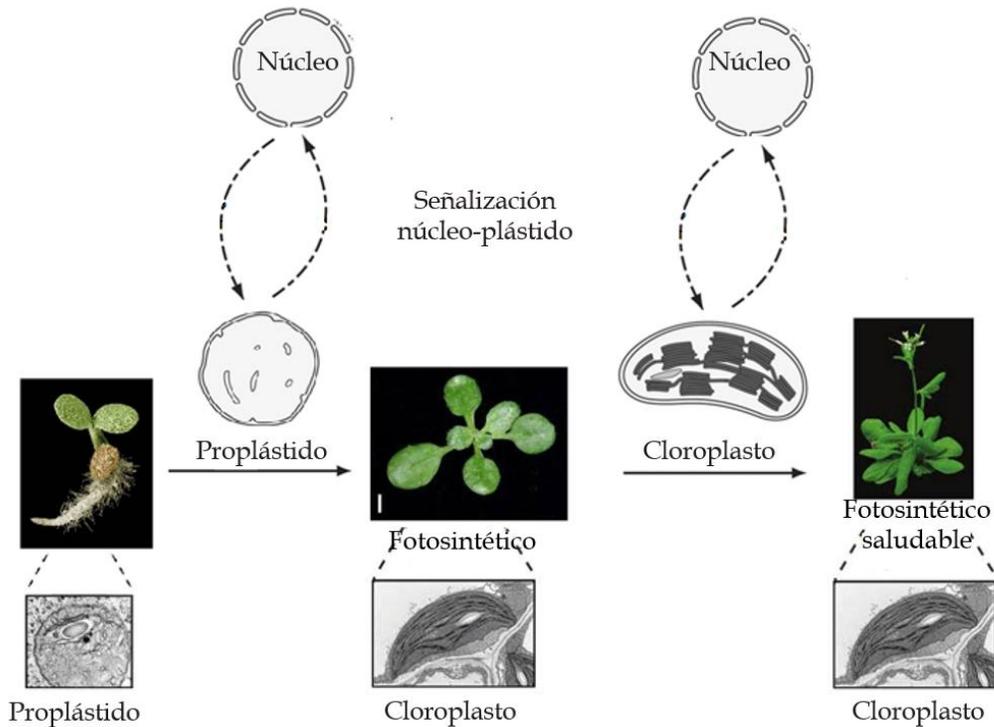


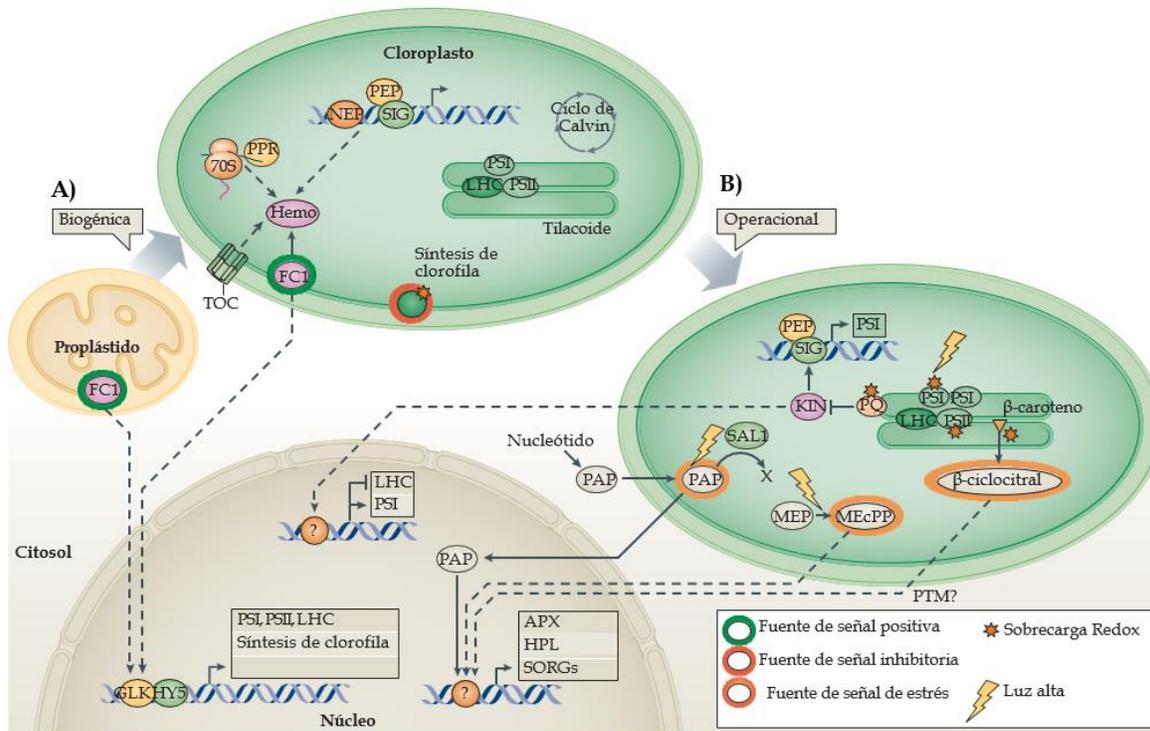
Figura 1.4. Los dos tipos de señales retrógradas operan en diferentes tiempos. Las señales retrógradas de control biogénico: son aquellas que se translocan cuando se encuentra el proplástido en zonas meristemáticas para diferenciarse en cloroplasto. Las señales operacionales: son aquellas que se traslocan una vez que se encuentra el plástido totalmente diferenciado para mantener el funcionamiento del cloroplasto.

La señalización retrógrada es un proceso complejo que involucra diversas señales y vías de señalización, de las cuales aún se conoce poco. La identificación de las señales retrógradas y su caracterización se ha basado predominantemente en el aislamiento de mutantes afectadas en estas respuestas que experimentan una afectación en el desarrollo del plástido, como lo puede ser la inhibición de la traducción o inhibiendo la biosíntesis de carotenoides, como consecuencia de un mayor daño foto oxidativo (Mochiziku et al., 2001; Strand et al., 2003; Xiao et al., 2006). Un ejemplo de esto son las mutantes “*genomes uncoupled*” (*gun*: *gun1*, *gun2*, *gun3*, *gun4*, *gun5*, y *gun6*), las cuales muestran un defecto de la comunicación entre el cloroplasto y el núcleo. Normalmente cuando se afecta el desarrollo del plástido con tratamientos con lincomicina (inhibidor específico de la traducción del plástido), se reprime la expresión de los genes nucleares asociados a la fotosíntesis (*PhANGs*, *Photosynthesis Associated Nuclear Genes*), mientras que en estas mutantes

esto no sucede. Las mutantes *gun2*, *gun3*, *gun4*, *gun5*, y *gun6* están afectadas en el metabolismo de tetrapirroles, por lo cual se ha propuesto al metabolito hemo y a la protoporfirina IX como señales retrógradas que promueven la expresión de *PhANGs* (revisado en De Souza et al. 2017).

La mutante *gun1*, a diferencia de las otras mutantes *gun* caracterizadas, no está afectada en un gen que codifica para una enzima involucrada en el metabolismo de tetrapirroles (clorofilas y hemo). GUN1 es una proteína de la familia PPR (*Pentatricopeptide Repeat*), que interactúa con algunas proteínas involucradas en la traducción en el plástido (PRPS1, FUG1), transcripción en el plástido (NEP), edición de RNA (MORF2) y chaperonas del plástidos (ClpC1, cpHSC70-1) (Tadini et al., 2016; Wu et al., 2019; Wu y Bock 2021). Se ha observado que GUN1 se requiere para la señalización retrógrada cuando hay defectos en la transcripción, traducción e importe de proteínas al plástido, por lo cual se ha propuesto que actúa como integrador de múltiples señales del plástido que se dirigen al núcleo (Koussevitzky et al., 2007, Tameshigue et al., 2013; Tadini et al., 2016; Wu y Bock, 2021).

Además, se han identificado otras señales retrógradas entre las que se encuentran metabolitos como el β -ciclocitral, producto de la oxidación de carotenoides. Este metabolito, el cual funciona como señal de estrés oxidativo en el cloroplasto afecta la expresión de genes nucleares asociados a la respuesta a estrés, frente a la acumulación del ion superóxido (Ramel et al., 2012; D'Alessandro et al., 2018; Mitra et al., 2021). Otro metabolito identificado que actúa como señal retrógrada, es el 3'-fosfoadenosina 5'fosfato (PAP), que induce la expresión de genes nucleares como el gen *ASCORBATO PEROXIDASA* (Estavillo et al., 2011). También se sabe que el metileritritol ciclodifosfato (MeCPP), un intermediario de la vía MEP para la síntesis de isoprenoides, actúa como señal retrógrada, ya que induce la expresión del gen nuclear *HIDROXIPERÓXIDO LIASA* (Xiao et al., 2012). Todos estos son metabolitos provenientes del cloroplasto que funcionan como moléculas en la señalización retrógrada de la vía operacional, de tal manera que sirven y son necesarias para detectar el estado funcional del cloroplasto (**Fig. 1.6**).



De las vías de señalización retrógrada de categoría biogénica se sabe menos que las de la vía operacional. A pesar de lo conocido, el principal desafío en el campo de la señalización retrógrada de plástidos sigue siendo obtener un modelo completo de las vías de señalización individuales. En la actualidad, nuestra comprensión de la señalización retrógrada está bastante fragmentada. Está claro que existen varias vías y se han identificado algunos de sus componentes. Lo que falta en todos los casos es una cadena lógica completa que conecte el generador de señales en el cloroplasto con el receptor de señales en el núcleo, ya que

por lo general se ha propuesto que esta regulación es a nivel transcripcional.

La principal regulación que sucede en las células es a nivel transcripcional, este proceso es fundamental para los mecanismos reguladores de expresión génica. La transcripción está determinada por las interacciones entre FT que se unen a elementos regulatorios en *cis* (ERC) en el DNA, cofactores adicionales y de la estructura de la cromatina (**Fig. 1.7**). Las proteínas de acción en *trans* que controlan la tasa de transcripción a nivel del gen individual, algunas poseen dominios de unión a DNA, y éstas se unen a secuencias regulatorias en *cis* que son cruciales para la expresión correcta temporal y espacial de un gen específico (Wasserman y Sandelin, 2004). Una comprensión completa de la interacción entre los factores en *trans* y los ERC necesarios para la señalización retrógrada proporcionaría los medios para entender las vías de señalización de manera más completa.

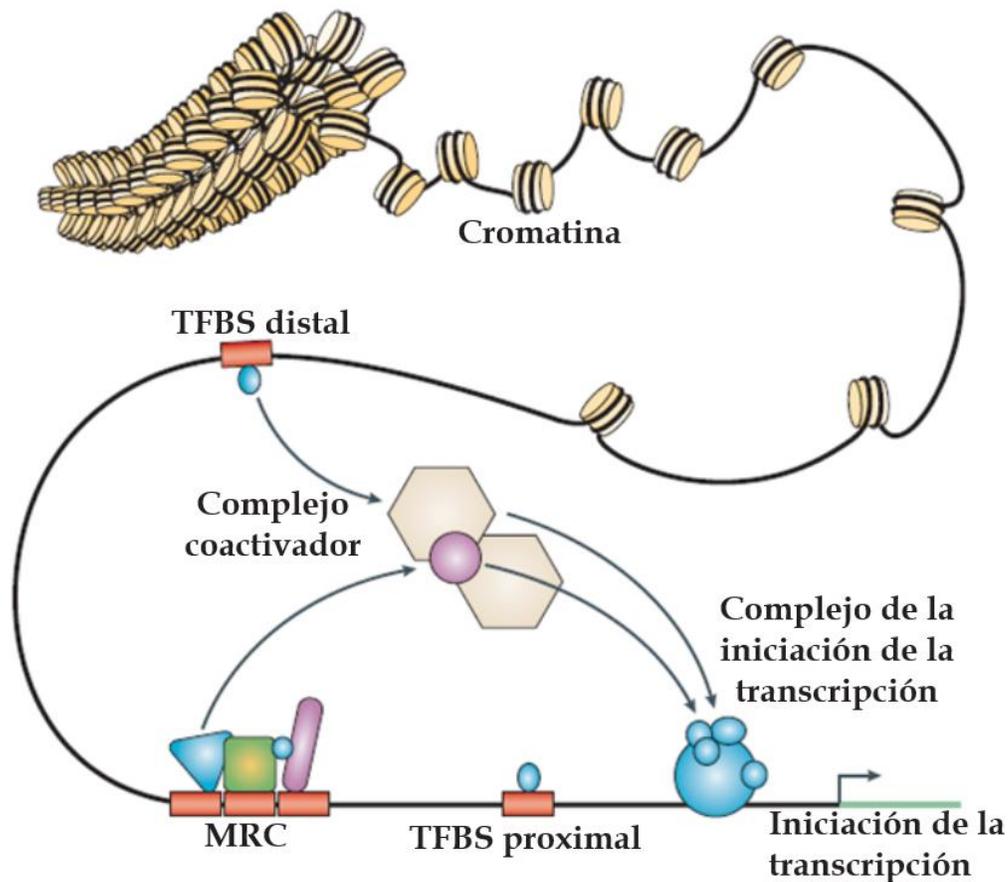


Figura 1.7. Componentes de la regulación transcripcional. Los FT se unen a sitios específicos (sitios de unión al factor de transcripción; TFBS o ERC, que son proximales o distales a un sitio de inicio de la transcripción. Los conjuntos de FT pueden operar en módulos reguladores en *cis* funcionales (MRC), para lograr propiedades reguladoras específicas. Las interacciones entre los FT unidos y los cofactores estabilizan la maquinaria de inicio de la transcripción para permitir la expresión génica. La regulación que confieren los TF de unión a secuencias específicas depende en gran medida de la estructura tridimensional de la cromatina. Tomado de Wasserman y Sandelin (2004).

Una vez que se empieza la transcripción se genera una copia de RNA (Ácido Ribonucleico) a partir de la secuencia de un gen, a esta molécula se le denomina como transcrito inmaduro, los cuales pueden comprender tanto moléculas precursoras de mRNA de longitud completa o transcritos nacientes (pre-mRNA) en los que la RNA polimerasa aún no ha alcanzado el extremo 3' del gen (Ameur et al., 2011). Una vez completada la transcripción de todo el gen, el RNA inmaduro sufre modificaciones, como la adición de un *cap* en el extremo 5', una cola de poli A (Adeninas) además de la eliminación de los intrones, para dar como producto un mRNA maduro.

2. ANTECEDENTES

Como se puede observar, se conoce muy poco acerca de las señales y de las vías de señalización retrógrada involucradas en la biogénesis del cloroplasto y de los factores de transcripción y elementos de respuesta que están involucrados en la regulación de varios de los genes nucleares que codifican para proteínas del cloroplasto. Con la ayuda de plantas mutantes se han logrado identificar algunas vías de señalización retrógrada.

Plantas con la mutación en el gen ζ -CAROTENO DESATURASA (*ZDS*), están afectadas en la biogénesis del cloroplasto, denominadas como *clb5-1* (*chloroplast biogenesis5-1*) y *spc1-2* (*spontaneous cell death 1-2*). La enzima *ZDS*, está codificada en el núcleo, pero la proteína se localiza en el plástido, esta enzima participa en la síntesis de carotenos, ya que realiza dos desaturaciones al fitoflueno para producir pro-licopeno (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012; Avendaño-Vazquez et al., 2014). Estas mutantes presentan un fenotipo albino, debido a que el desarrollo del cloroplasto es detenido en estadios tempranos, además, algo a resaltar, es que muestran un desarrollo alterado de la hoja, ya que sus hojas se desarrollan en forma de dedos (Avendaño-Vazquez et al., 2014, **Fig. 2.1**). De manera interesante, el fenotipo de hoja en forma de dedos es exclusivo de las mutantes de *ZDS*. Otras mutantes también afectadas en la síntesis de carotenos (como *psy*, *phytoene synthase* y *pds3*, *phytoene desaturase3*) o de la vía que provee las unidades precursoras de carotenos (como *cla1* y *clb6*), están afectadas en el desarrollo del plástido, sin embargo, éstas no presentan los mismos defectos en el desarrollo de la hoja como las mutantes de *ZDS* (*clb5-1* y *spc1-2*, **Fig. 2.1, Tabla de alelos 2.1**).

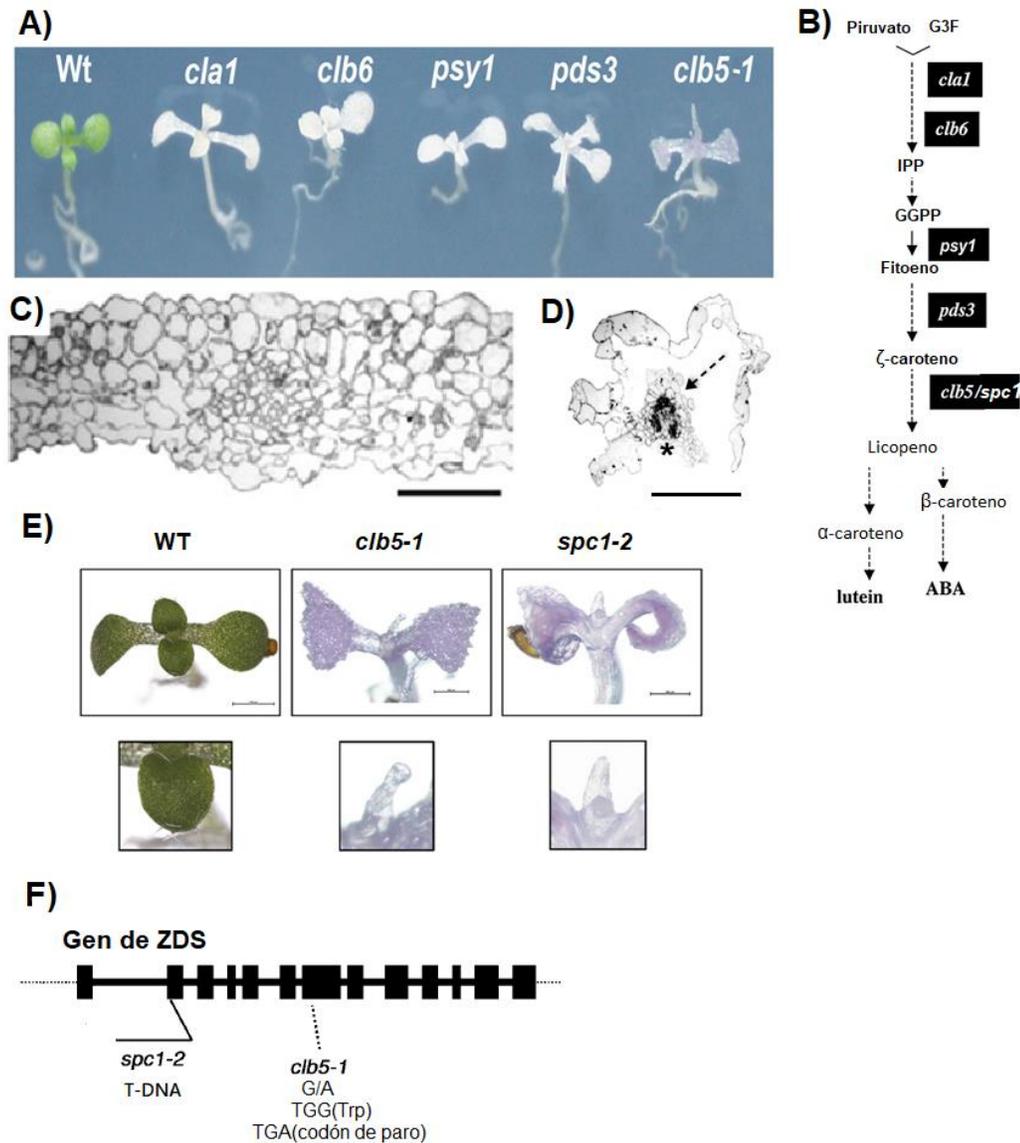
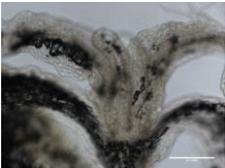
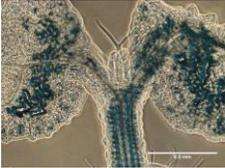
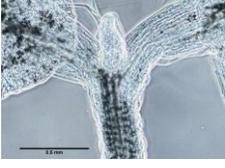


Figura 2.1. Sólo la mutante de *ZDS* tiene el desarrollo de las hojas afectado a diferencia de mutantes afectadas en la síntesis de carotenos y sus precursores. A) Mutantes afectadas en genes involucrados en la síntesis de precursores de carotenos (*cla1* y *clb6*), o en la síntesis de carotenos (*psy1*, *pds3*, *clb5-1*), todas con lámina foliar normal, excepto *clb5-1* y *spc1-2*. B) Vía de síntesis de carotenos, en recuadros negros se muestran las mutantes de cada gen. C) Corte transversal de la hoja de Col-0, tipo silvestre y D) de la mutante *clb5-1*, el tejido vascular está marcado con un asterisco y el tejido del mesófilo está marcado con una flecha discontinua. E) Acercamiento al fenotipo de la hoja en Col, *clb5-1* y *spc1-2*. F) diagrama del gen *ZDS*, con los sitios de las mutaciones de *clb5-1* y *spc1-2*. Imágenes tomadas y modificadas de Avendaño-Vázquez et al., 2014 y Escobar-Tovar et al., 2020.

Tabla 2.1. Alelos utilizados. ¹ se refiere al fondo genético (ecotipo).

Alelos utilizados

Nombre	Acceso ¹	Gen mutado	Tipo de mutación	Descripción	fenotipo	
Col	Columbia 0	-	-	Tipo silvestre	Fenotipo silvestre, plantas verdes con hoja normal	
<i>pds3-1</i>	Columbia 0	<i>FITOENO DESATURASA (PDS)</i>	T-DNA en el segundo intrón del gen	Involucrado en la biosíntesis de carotenos. Enzima que cataliza la desaturación de fitoeno a ζ-caroteno.	Albina con hoja normal	
<i>clb5-1</i>	Lansberg erecta	<i>ζ-CAROTENO DESATURASA (ZDS)</i>	Transición G-A en el séptimo intrón, cambio a codón de paro	Involucrado en la biosíntesis de carotenos, realiza dos desaturaciones al ζ-caroteno para producir pro-licopeno.	Albina con hoja en forma de dedos	
<i>spc1-2</i>	Columbia 0	<i>ζ-CAROTENO DESATURASA (ZDS)</i>	T-DNA en el segundo exón del gen	Involucrado en la biosíntesis de carotenos, realiza dos desaturaciones al ζ-caroteno para producir pro-licopeno	Fenotipo albino con hoja en forma de dedos	

El hecho de que el fenotipo de hoja en forma de dedos sea exclusivo de *clb5-1* sugirió que la acumulación de fitoflueno o ζ-caroteno era la causa específica de este fenotipo (Avendaño-Vázquez et al., 2014). La caracterización del impacto de la acumulación de fitoflueno o ζ-caroteno

en *clb5-1*, mostró que ésta se recupera al impedir la acumulación de fitoflueno o ζ -caroteno, ya que en ausencia de la enzima previa FITOENO DESATURASA (PDS), mediante el análisis de la mutante nula (*pds3*) o por el uso del inhibidor flouridona, se recupera el fenotipo de la hoja, esto demostró que la acumulación de fitoflueno o ζ -caroteno es la causa del fenotipo de las hojas en forma de dedos en *clb5-1* (Avendaño-Vázquez et al., 2014, Fig. 2.2).

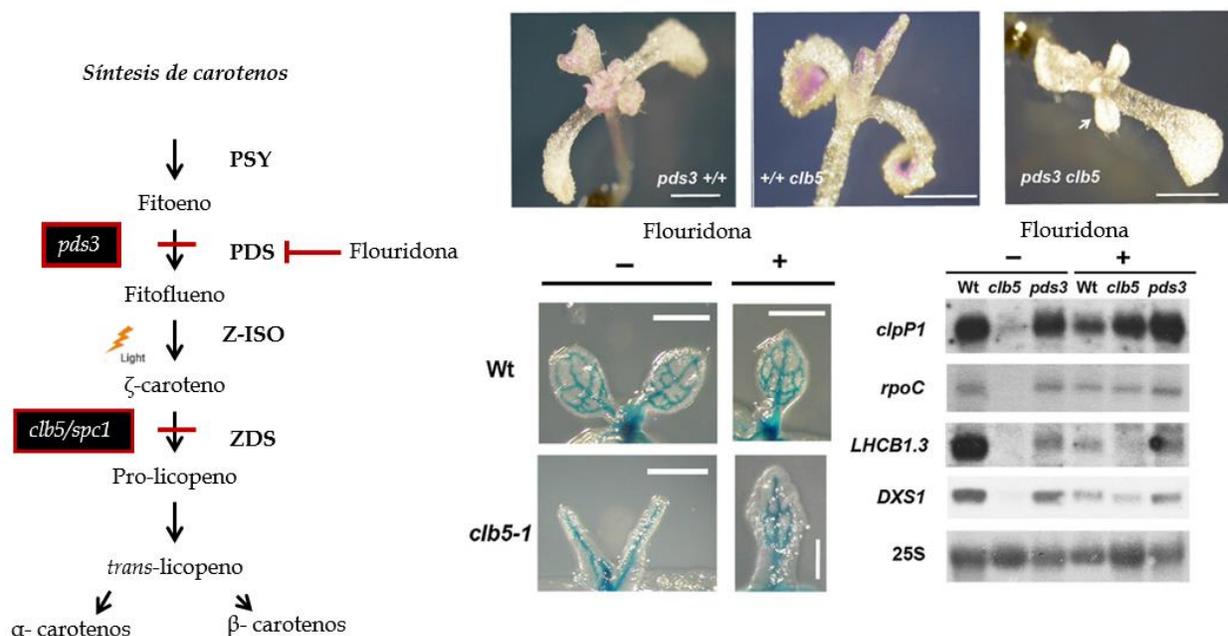


Figura 2.2. La ausencia o inhibición de la enzima PDS revierte el fenotipo de la hoja de *clb5-1*. A) Vía de síntesis de carotenos. PSY; FITOENO SINTASA; PDS; FITOENO DESATURASA; Z-ISO; Z CAROTENO ISOMERASA; ZDS; ZETA CAROTENO DESATURASA. En cuadros negros se muestran las mutantes correspondientes a las enzimas, línea en rojo muestra donde se trunca la vía. B) Fenotipo de las mutantes *pds3*, *clb5* y la doble mutante *pds3 clb5*. C) Plantas tratadas con flouridona recuperan parcialmente su morfología y expresión génica (D), Modificado de Avendaño-Vázquez et al. (2014).

Debido a que la acumulación de ζ -caroteno es necesaria para que se presente el fenotipo de la hoja en la mutante *clb5-1*, se cuestionó si los carotenoides fungían como moléculas señal. Sin embargo, los carotenoides son moléculas grandes de naturaleza hidrofóbica de 40

carbonos (Nisar et al., 2015), por lo tanto resulta difícil que estas moléculas puedan salir del plástido, lugar donde son sintetizados, y así funcionar como señales. La escisión de carotenos da como productos moléculas denominadas **apocarotenos** o apocarotenoides, que son moléculas más pequeñas, lo que les facilita su transporte o difusión a través de la membrana (Nisar et al., 2015). Se ha demostrado que algunos apocarotenos como el β -ciclocitral participan como moléculas señal y también otros que son hormonas como el ácido abscísico (ABA) y las estrigolactonas (SL), que afectan la expresión genética nuclear (Hirayama y Shinozaki, 2007 ; Waters et al., 2017).

Los apocarotenos son producidos de forma no enzimática y enzimática, ésta última mediante enzimas dioxigenasas CCDs (CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASES), que escinden a los carotenoides a través de una oxidorreducción con la ayuda de un dioxígeno (Booker et al., 2004; Auldrige et al., 2006). En la mutante *clb5-1* se demostró que en ausencia de la enzima CCD4, se recupera el desarrollo de la hoja tanto a nivel morfológico como de expresión génica, lo que demuestra que no sólo la acumulación de ζ -caroteno es necesaria para que se afecte el desarrollo de la hoja, sino que además se requiere que sea escindido por la enzima CCD4 (**Fig. 2.3**).

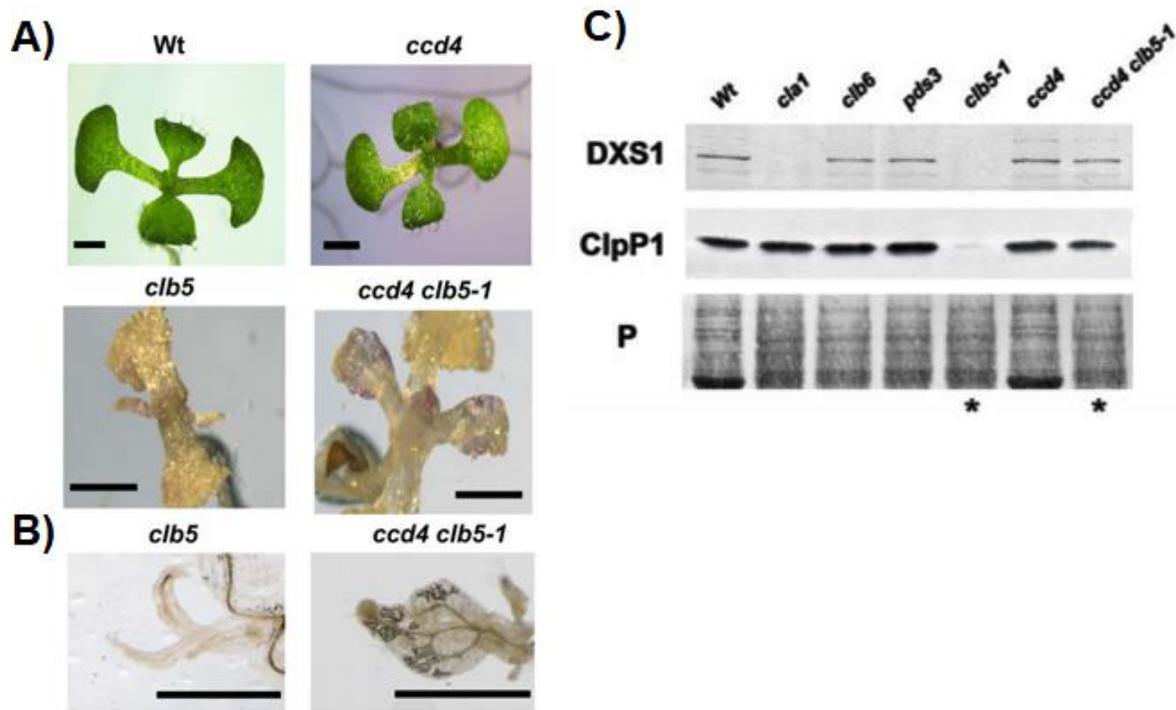


Figura 2.3. El fenotipo de la hoja de la mutante *clb5-1* requiere la presencia de **CCD4**. A) Fenotipo de la hoja de la planta tipo silvestre (WT), de las mutantes *ccd4*, *clb5* y la recuperación de la lámina foliar en la doble mutante *clb5 ccd4*. B) plantas clareadas de *clb5* y *clb5 ccd4*. C) Western blot donde se muestra la recuperación de la expresión génica, mostrando la enzima codificada en núcleo DXS y de la proteína codificada en plástido ClpP1, en la doble mutante *clb5 ccd4* (modificado de Avendaño et al., 2014).

Esto demuestra que la molécula responsable del fenotipo de las hojas en forma de dedos en *clb5-1*, es un apocaroteno derivado del fitoflueno o ζ -caroteno. A esta señal que probablemente sale del plástido y que su acumulación resulta en la afectación del desarrollo de la hoja, se le ha denominado **ACS1** (del inglés *Apocarotenoid Signal 1*) (Avendaño-Vázquez et al., 2014; Hou et al., 2016).

El análisis por RNAseq de la mutante *clb5-1* y de la doble mutante *clb5-1ccd4* comparadas con la mutante *pds3*, mostró que existe una alteración en la acumulación de más de 2,000 transcritos nucleares (625 sobre acumulados y 1568 disminuidos). Entre las categorías GO (*Gene Ontology*) de componentes celulares más afectadas, incluyen a los transcritos relacionados a componentes del ribosoma (Escobar-Tovar et al., 2020) **Fig. 2.4**.

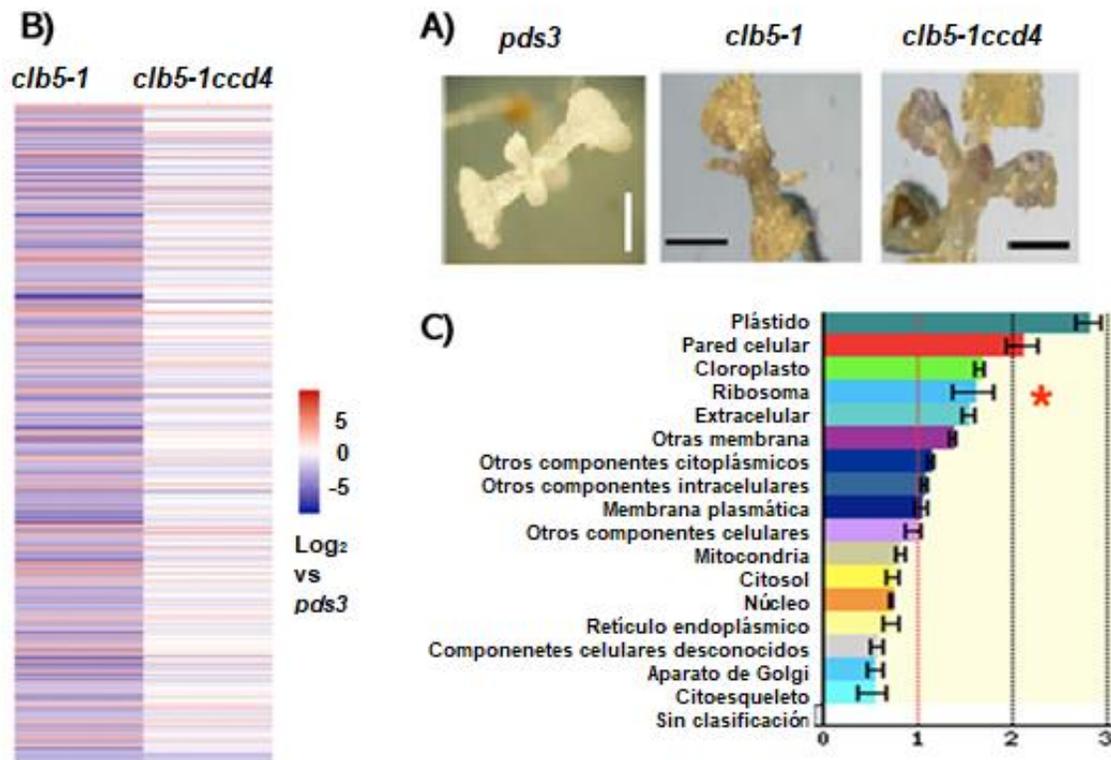


Figura 2.4. Acumulación de transcritos afectados en la mutante *clb5-1*. A) Fenotipo de las líneas utilizadas para el RNA-seq, *pds3* (como control), *clb5-1* y la doble mutante *clb5-1ccd4* donde se recupera el desarrollo de la hoja. B) Mapa de calor de los genes afectados en las mutantes *clb5* y *clb5-1ccd4*, donde se muestra la recuperación en la acumulación para la mayoría de los transcritos en la doble mutante. C) Categorías *Gene Ontology*, de los componentes celulares más afectados de acuerdo con el RNA-seq. Tomado de Escobar-Tovar et al. (2020).

En el trabajo mencionado, se encontró que más del 50% de los transcritos de genes que codifican para Proteínas Ribosomales del Plástido (*PRP*), presentaron una disminución significativa en su expresión de más de cuatro veces (31 genes *PRP* disminuidos de un total de 57 distribuidos en ambos genomas, nuclear y del plástido), de los cuales 28 se encuentran codificados en el núcleo, y para la mayoría se observó una recuperación de su acumulación en la doble mutante *clb5-1 ccd4* que también recupera la lámina foliar (Fig. 2.5 y Tabla A2 de anexos).

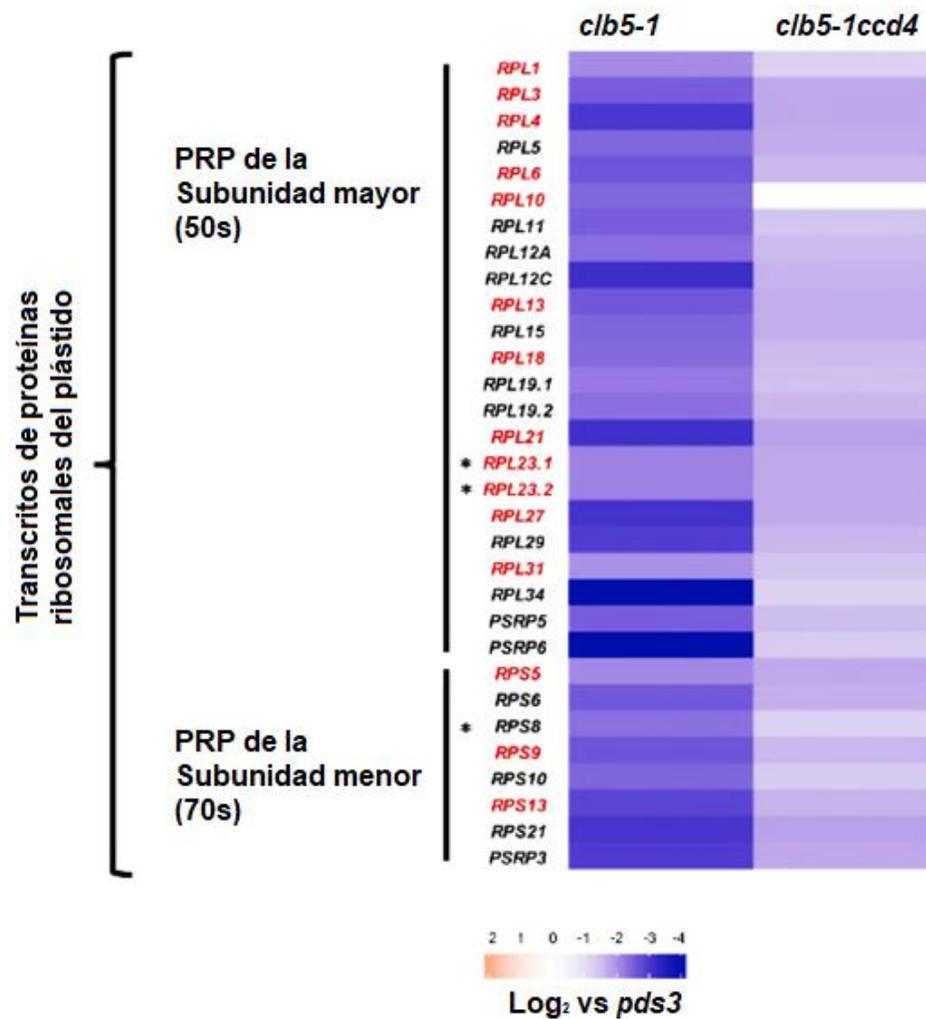


Figura 2.5. Los niveles de transcritos de genes que codifican para proteínas ribosomales del plástido se encuentran drásticamente disminuidos en la mutante *clb5-1*. A) Disminución de la acumulación de transcritos de genes que codifican para PRP en la mutante *clb5* y la doble mutante *clb5 ccd4* donde se aprecia la recuperación de la acumulación del transcritos para la mayoría de los genes. Los genes marcados en rojo son genes esenciales para la traducción en el plástido, genes marcados con asterisco son aquellos que están codificados en el plástido. Tomado de Escobar-Tovar et al. (2020).

Por otro lado, se había reportado que la inhibición de la traducción en el plástido con lincomicina y espectinomocina, los cuales son inhibidores específicos de la traducción plastídica (Ellis, 1970; Mulo et al., 2003), fenocopian el defecto de las hojas de *clb5-1*, lo cual apoya que la

inhibición de la traducción en el cloroplasto es responsable del fenotipo de hoja en forma de dedos observada en *clb5-1*. El análisis de microarreglos de transcritos de plantas tratadas con lincomicina (Koussevitzky et al., 2007) reveló que la inhibición de la traducción plastídica afecta 151 transcritos, de los cuales 78 también están afectados en *clb5-1*, estos transcritos están involucrados en el desarrollo de la hoja y la función de los plástidos. Sin embargo, ninguno de los que se comparten incluye a los transcritos de los genes que codifican para *Proteínas Ribosomales del Plástido (PRP)* (**Fig. 2.6**). Estos datos apuntan a que la señal ACS1 presente en *clb5-1*, afecta a los transcritos de genes nucleares que participan en la traducción de proteínas en el cloroplasto como blancos principales.

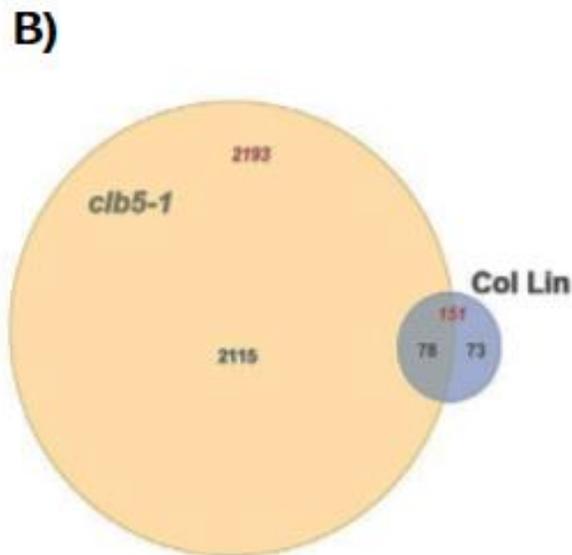
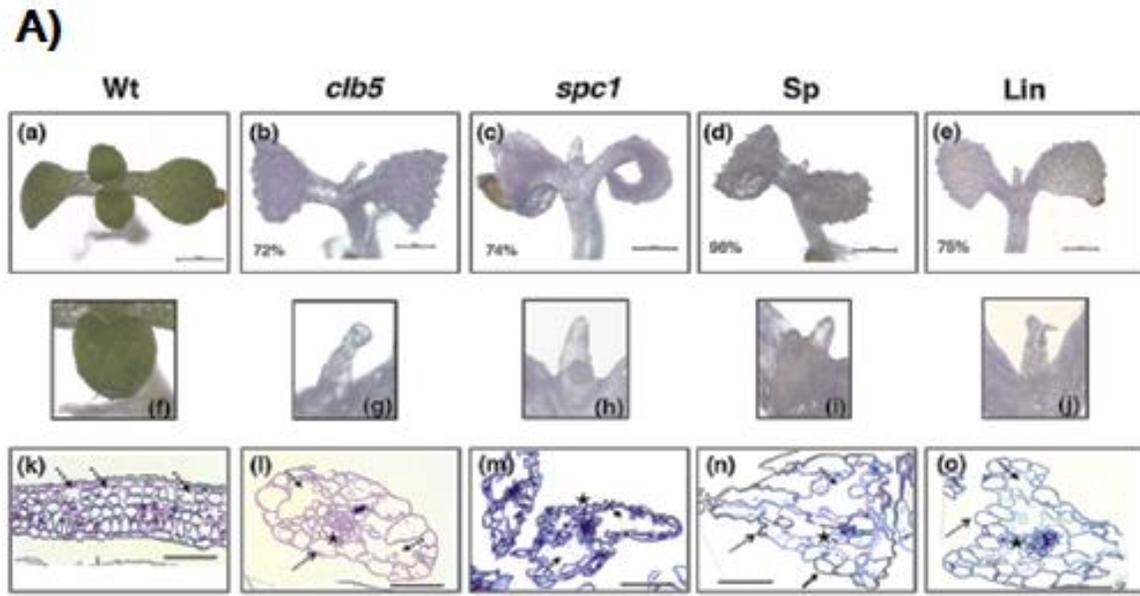


Figura 2.6. La acumulación de transcritos de GNPRP está afectada por ACS1. A) Morfología de las hojas de las plantas de a) tipo silvestre, las mutantes b) *clb5-1*, c) *spc1-2*, y d) plantas de tipo silvestre tratadas con espectinomicina (70 μ M), e) lincomicina (300 μ M), f-j) acercamiento a las hojas de cada genotipo, k-o) cortes transversales de las hojas. B) Diagrama de Venn que muestra el número de genes afectados con FC \geq 2 en *clb5-1* (Escobar-Tovar et al., 2020), vs. plantas tratadas con lincomicina, Lin (Koussevitzky et al., 2007; número de acceso de GEO: GSE5770). Imagen modificada de Escobar-Tovar et al. (2020). El tejido vascular está marcado con un asterisco y el tejido del mesófilo está marcado con una flecha. Los números en rojo corresponden al total de genes afectados en cada condición y los números en negro indican aquellos específicos o compartidos en cada análisis.

El análisis mediante RT-qPCR de los transcritos de genes nucleares de proteínas ribosomales del plástido (GNPRP) de *clb5-1* y su mutante alélica *spc1-2*, comparado con plantas de tipo silvestre tratadas con lincomicina o espectinomomicina, indica que a pesar de que ambas tienen el mismo fenotipo, la disminución de los transcritos de GNPRP (*RPL4*, *RPL10*, *RPL21*, *RPL27*) es exclusiva de las mutantes *clb5-1* y *spc1-2* (Fig. 2.7; Escobar-Tovar et al., 2020). Estos datos sugieren que ACS1 es una señal retrógrada que afecta la traducción del plástido, probablemente a través de inhibir la expresión de los genes nucleares que codifican a componentes del ribosoma del plástido.

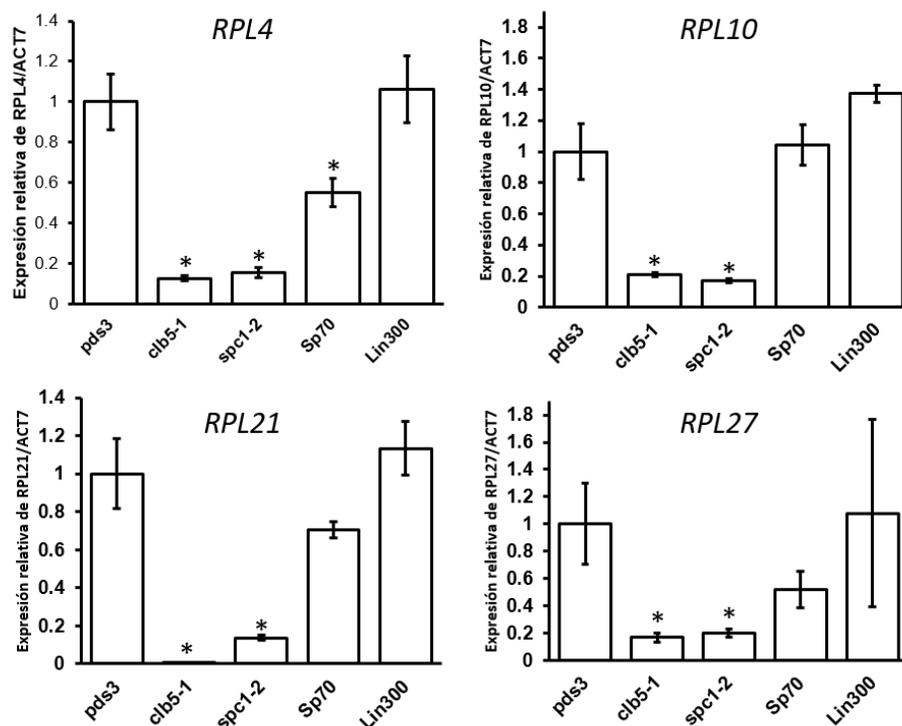


Figura 2.7. Los transcritos de GNPRP están afectados en las mutantes de ZDS, pero no en plantas tratadas con inhibidores de la traducción plastídica. Análisis de expresión por qRT-PCR de *RPL4*, *RPL10*, *RPL21* y *RPL27* en las mutantes *pds3*, *clb5* y *spc1-2* (mutante alélica de *clb5-1*) y en plantas de tipo silvestre tratadas con espectinomomicina (Sp, 70 μ M) o lincomicina (Lin, 300 μ M). Tomado de Escobar-Tovar et al. (2020).

Por otro lado, estudios previos habían identificado a GUN1 como mediador de la señal que resulta al inhibir la traducción en el plástido, ya que al inhibirla plástido en ausencia de GUN1, el desarrollo de la hoja no se ve afectado (Koussevitzky et al., 2007; Tameshige et al., 2013). De manera semejante, se mostró que en la doble mutante *gun1clb5-1* hay una reversión parcial de los defectos de la hoja de *clb5-1*, lo que demuestra que la respuesta en *clb5-1* también está mediada por GUN1, río abajo de la traducción plastídica (Escobar-Tovar et al., 2020, **fig. 2.8**).

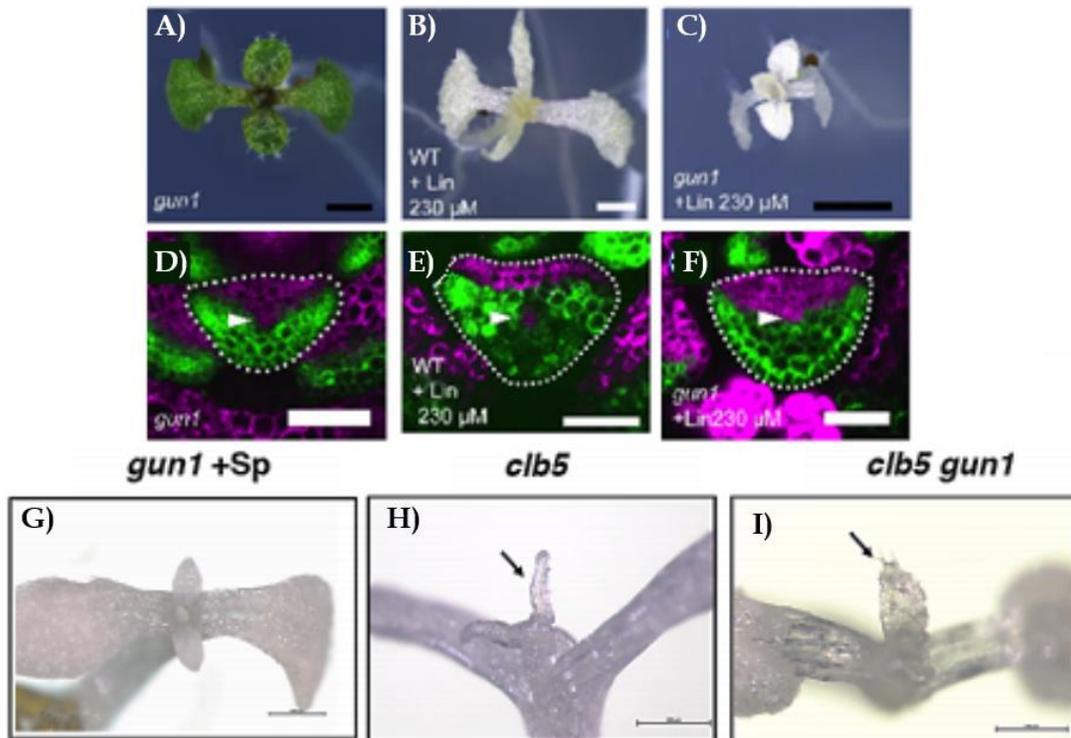


Figura 2.8. GUN1 media la señal retrógrada del desarrollo de la hoja cuando se inhibe la traducción del plástido. A) Mutante *gun1* sin tratar. B) Planta de tipo silvestre (WT), tratada con lincomicina. C) Mutante *gun1* tratada con lincomicina, donde la lámina foliar no se ve afectada. D-F) cortes transversales con marcador en magenta de la parte adaxial y en verde de la parte abaxial de la hoja de las respectivas plantas de arriba, y en flecha blanca se señala el cilindro vascular G) mutante *gun1* tratada con espectinomicina, H) mutante *clb5-1*, I) doble mutante *clb5-1 gun1* donde se señala con flecha la hoja. En verde pFIL:GFP y en magenta p35S:miYFP-W. Imágenes tomadas y modificadas de Tameshige et al. (2013) y Escobar-Tovar et al. (2020).

A partir de estos antecedentes se hipotetizó que ACS1 afecta la acumulación de diversos transcritos de genes nucleares como blancos principales, entre estos los que codifican para componentes del ribosoma del plástido, lo que a su vez afecta la traducción del plástido. Esto genera una segunda señal retrógrada mediada por GUN1 que regula el desarrollo de la hoja (**Fig. 2.9**). Con este modelo se abren diversas preguntas como: ¿a qué nivel de regulación se da la disminución de la traducción en el plástido? y ¿cuál es el mecanismo de dicha regulación? En el caso de que la regulación ocurra a nivel transcripcional también se hipotetizó que estos genes deberían estar corregulados por la presencia de elementos comunes en *cis* presentes en sus regiones regulatorias y que serían blanco de factores transcripcionales (represores o activadores), involucrados en la señalización mediada por ACS1. Por lo tanto, el presente proyecto pretende adentrarnos en este mecanismo de regulación.

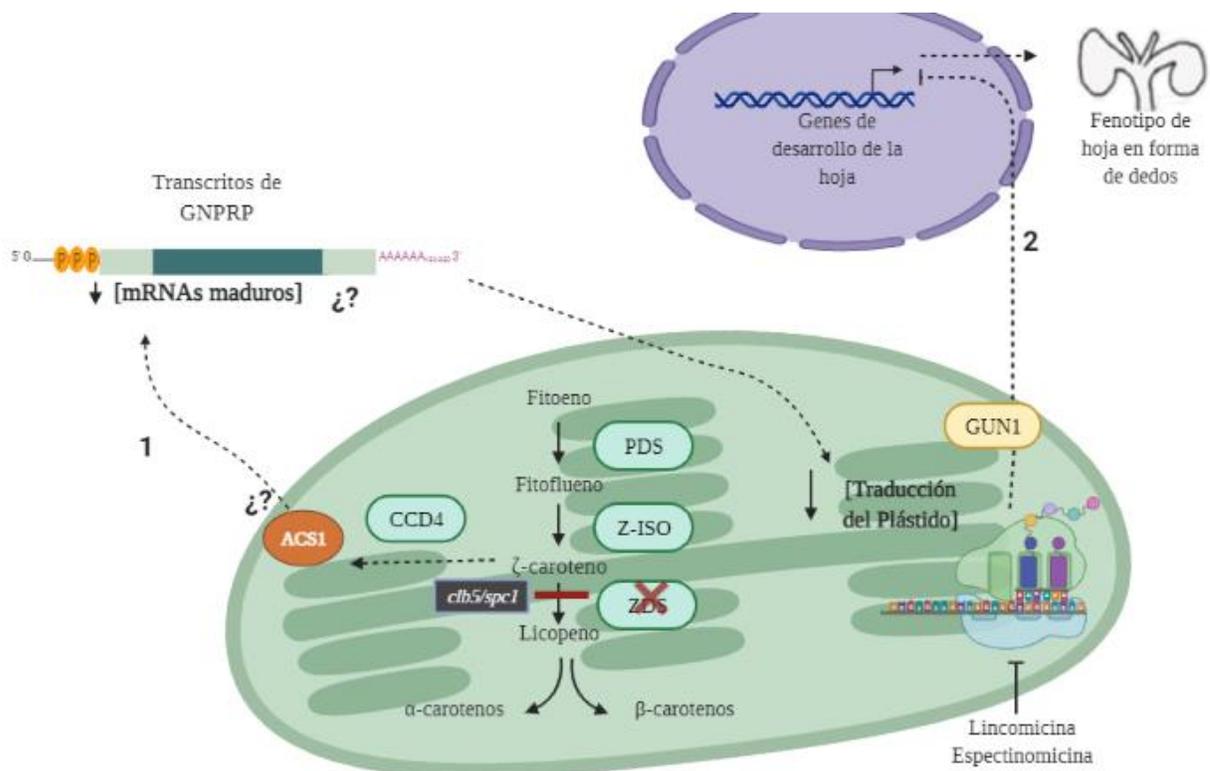


Figura 2.9. Modelo de la señal ACS1 generada en la mutante de *clb5-1*. Cuando se interrumpe el flujo de la síntesis de carotenos, en ausencia de ZDS, el ζ -caroteno es escindido por CCD4 lo que genera un apocarotenoide que da como resultado a la señal ACS1. El efecto primario de esta señal es la afectación de la acumulación de los transcritos maduros de GNPRP (Genes Nucleares que codifican

para Proteínas Ribosomales del Plástido), en consecuencia, se afecta la traducción del plástido lo que genera una segunda señal mediada por GUN1, que afecta al desarrollo de la hoja.

3. HIPÓTESIS

La señal ACS1 participa en la regulación de la transcripción de genes nucleares que codifican para proteínas ribosomales plastídicas, por alguna vía de transducción en la que participan factores de transcripción que reconocen elementos en *cis* comunes presentes en las regiones promotoras de dichos genes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar el mecanismo de regulación de genes nucleares que codifican para las proteínas del ribosoma del plástido (GNPRP), modulado por ACS1.

4.2 Objetivos particulares

1. Determinar si la regulación de los GNPRP en presencia de la señal ACS1 es a nivel transcripcional.
2. Identificar elementos regulatorios en *cis* comunes en los GNPRP que puedan estar involucrados en la regulación por ACS1.
3. Generar líneas reporteras con la región promotora de GNPRP representativos, con el fin de determinar si los elementos en *cis* que portan las fusiones transcripcionales están involucrados en la represión por ACS1.

6. RESULTADOS

6.1 La expresión de genes de proteínas ribosomales plastídicas codificadas en el núcleo es regulada a nivel transcripcional en las mutantes de *ZDS*

La disminución de los niveles de transcritos maduros de GNPRP reportados anteriormente (Escobar-Tovar et al., 2020) puede deberse tanto a una menor transcripción o a una menor estabilidad de los mensajeros (Sperling, 2007).

Para saber si el nivel de regulación de los GNPRP es a nivel transcripcional se realizaron RT-qPCR de los transcritos nacientes (pre-mRNA).

Trabajos previos donde analizaron la dinámica de la acumulación de los pre-mRNA, demostraron que su cuantificación correlaciona con la inducción de la transcripción, lo que podría reflejar la actividad transcripcional. Además, la acumulación de los pre-mRNA difiere de los transcritos maduros (mRNA), ya que la acumulación de los mRNA refleja los eventos postranscripcionales (Zeisel, et al. 2011; Ameer, et al. 2011; Henriks et al.; 2014, Gaidatzis et al., 2015). Por lo tanto, se optó por utilizar esta estrategia como una aproximación para saber el nivel de regulación de los GNPRP en presencia de la señal ACS1.

Para este análisis se tomaron como controles plantas de tipo silvestre de *A. thaliana* del ecotipo Columbia-0 (Col-0) además de la mutante *pds3* que está afectada también en la síntesis de carotenos, como *clb5-1* y *spc1-2*, pero no en el desarrollo de la hoja (**Tabla 2.1**). Para lograr amplificar los pre-mRNA se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada gen orientados hacia su extremo 3' para la síntesis de cDNA (**Fig. 6.1**). Para diferenciar los transcritos pre-mRNAs de los mRNAs, se diseñaron oligonucleótidos dentro de un intrón (*reverse*) y el otro en un exón (*forward*), de forma tal que sólo amplificaran el transcrito no procesado. Para el caso del transcrito maduro se diseñaron oligonucleótidos que solamente se unieran a las regiones donde ya sucedió la unión de exón-exón, lo que confirmaría que el transcrito ya ha sido procesado y por lo tanto es un transcrito maduro (**Fig. 6.1**).

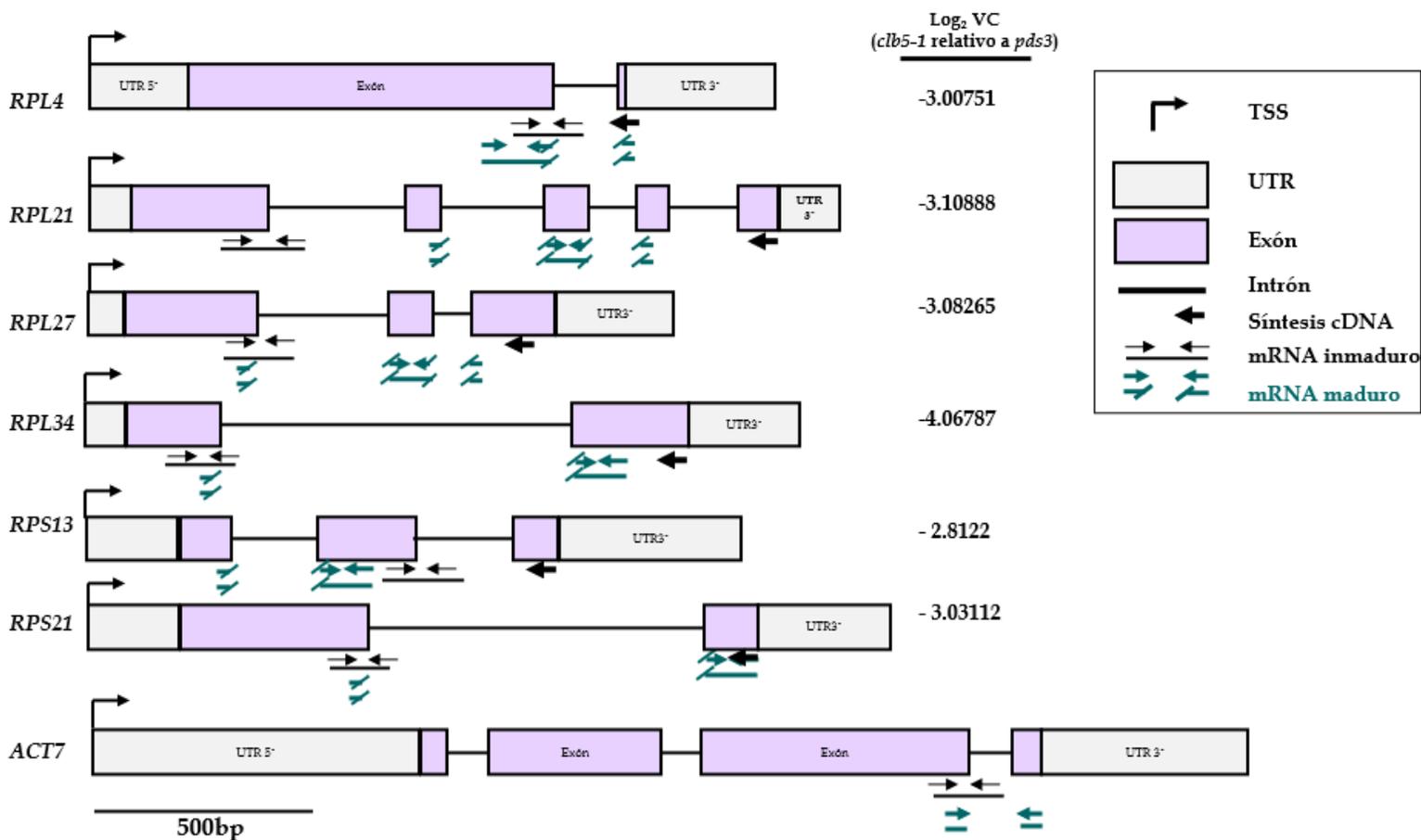


Figura 6.1. Diagrama de los genes *RPL4*, *RPL21*, *RPL27*, *RPL34*, *RPS13*, *RPS21* y el gen control *ACTINA7*. En cada gen se muestra el sitio donde se unen los oligonucleótidos diseñados. De lado derecho se muestra Log₂ VC, que es las veces de cambio de acumulación de mRNA en la mutante *clb5-1* de acuerdo con el RNA-seq de Escobar-Tovar et al. (2020). TSS, Sitio de inicio de la transcripción. UTR, Región no traducida.

Como se ve en las gráficas de la **Fig. 6.2**, para todos los transcritos de GNPRP aquí analizados, tanto en la mutante *clb5-1* como en el alelo *spc1-2*, los niveles de acumulación de transcrito prematuro como del maduro se encuentran drásticamente disminuidos, respecto a Col-0 y a la mutante *pds3*. Este resultado se observa tanto para genes que codifican proteínas correspondientes a la subunidad mayor (LSU): *RPL4*, *RPL21*, *RPL27* y *RPL34*, como para la subunidad menor del ribosoma del plástido (SSU): *RPS13*, y *RPS21*.

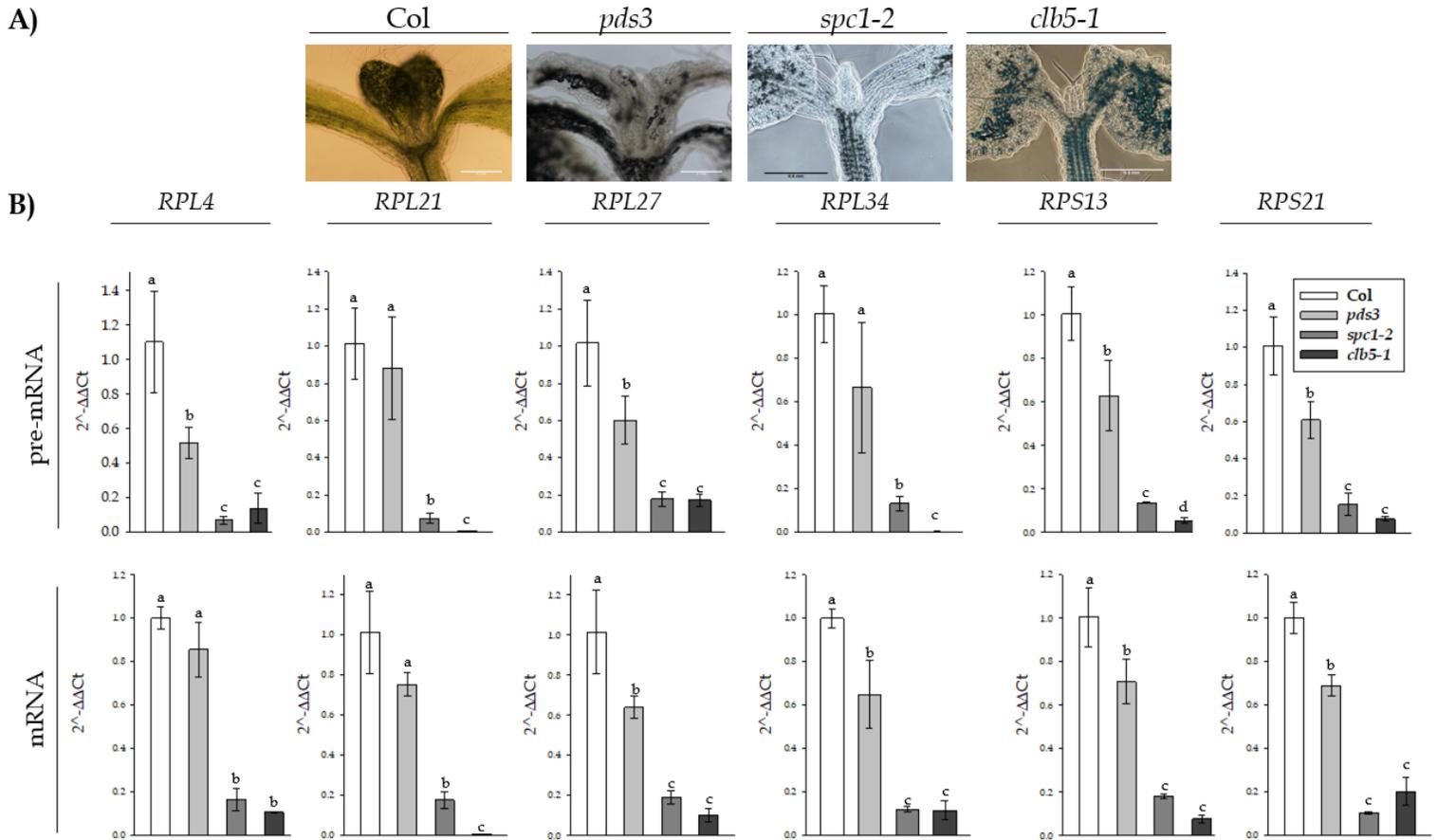


Figura 6.2. La acumulación de los transcritos inmaduros y maduros de GNPRP están drásticamente disminuidos en las mutantes del gen ZDS (*clb5-1* y *spc1-2*). A) Fenotipos de las líneas usadas para los qPCRs. B) Análisis por RT-qPCR de transcritos de los GNPRP de plantas Col, a los 8 días post germinación y las mutantes *pds3*, *clb5-1*, *spc1-2*, a los 18 días post germinación. La expresión se reporta en relación con la muestra de Col-0 normalizada a 1 y ajustada con la expresión de *ACTINA 7* (*ACT7*). Las barras son medias de SE ± de tres experimentos biológicos. Las letras a, b, c, y d significan que pertenecen a diferentes grupos de medias (*p-value* <0.001) se realizó ANOVA prueba Holm-Sidak.

En conclusión, debido a que en las mutantes *clb5-1* y *spc1-2*, los dos tipos de transcrito (pre-mRNA y mRNA) están disminuidos de manera similar, esto sugiere que la regulación de los GNPRP en presencia de la señal ACS1 es a nivel transcripcional.

6.2 Análisis del mecanismo de la regulación transcripcional de los GNPRP por ACS1

Los resultados anteriores sugieren que la regulación de la expresión de los GNPRP en presencia de ACS1 es a nivel transcripcional, por lo tanto, se decidió realizar dos aproximaciones paralelas con el propósito de conocer el mecanismo que participa en la regulación transcripcional de los GNPRP.

Un paso importante para comprender el mecanismo de regulación a nivel transcripcional es identificar los elementos regulatorios en *cis* (ERC) que podrían estar involucrados en la respuesta a la señal ACS1, ya que los elementos en *cis* son motivos de DNA que funcionan como sitios de unión a factores de transcripción (TFBS) en respuesta a algún estímulo o señal (D'haeseleer, 2006; Priest et al., 2009).

Por esta razón, la primera estrategia consistió en una búsqueda de ERC en las regiones promotoras de los 28 GNPRP, de los cuales se reportó una disminución en la acumulación de mRNAs en la mutante *clb5-1* (Escobar-Tovar et al. 2020, **tabla A2**).

La segunda estrategia consistió en generar líneas reporteras bajo el control de las regiones promotoras de GNPRP representativos que permitieran experimentalmente identificar aquellas regiones en *cis* necesarias para la regulación mediada por ACS1.

6.2.1 Identificación de elementos regulatorios en *cis* comunes en los promotores de genes nucleares que codifican para proteínas ribosomales plastídicas afectados por ACS1

La estrategia para identificar motivos en secuencias de DNA se basó en un análisis de enriquecimiento de secuencias, esto es una búsqueda de motivos sobrerrepresentados en un conjunto de genes corregulados. Las secuencias sobrerrepresentadas son patrones de secuencias que se encuentran con mayor frecuencia en el espacio de búsqueda de lo que se predeciría por un modelo nulo o de fondo (D'haeseleer P. 2006; Timothy et al., 2009).

6.2.1.1 TFBS reportados sobrerrepresentados en los GNPRP

Para encontrar TFBS reportados se utilizó el programa de AME, *Analysis of Motif Enrichment* (McLeay y Bailey, 2010 <https://meme-suite.org/meme/tools/ame>). Como resultado, se obtuvo una lista en la cual se muestran los TFBS que se encuentran presentes en al menos el 40% de los GNPRP (Tabla 6.1 y Fig. 6.3).

Tabla 6.1. TFBS sobrerrepresentados en los 28 GNPRP encontrados con el programa AME. Columna TFBS, del inglés *Transcription Factor Binding Site*; ID jasper, identificador del TFBS en la base de datos JASPAR; Secuencia consenso, se refiere a la secuencia de DNA del TFBS; *p-value*, representa la probabilidad de que observe una puntuación al menos tan alta como la puntuación requerida para ajustarse a la matriz del TFBS en cuestión; *e-value* representa el número esperado del motivo que podría estar enriquecido en secuencias primarias como en secuencias de fondo; Genes representa el número de genes que resultaron positivos que contienen los TFBS; %VP significa el porcentaje de genes que poseen los TFBS de 28 totales, o Verdaderos Positivos; %FP significa el porcentaje de falsos positivos de 1008 secuencias usadas como secuencias de fondo. A: Adenina; C: citosina G: Guanina T: Timina; R: A o G; Y: C o T; W: A o T; K: G o T; B: C o G o T; D: A o G o T; H: A o C o T. Se utilizó AME para el análisis de enriquecimiento de TFBS.

TFBS	ID jasper	Secuencia Consenso	<i>p-value</i>	<i>e-value</i>	Genes	%VP	%FP
MYBS1	MA1186.1	HWWAWYCTTATCYWH	1.26 ⁻¹¹	1.32 ⁻⁰⁶	22	78.6	18.0
KUA1	MA1398.1	HHWWYCTTATCCAHW	4.58 ⁻¹⁰	4.17 ⁻⁰⁵	19	67.9	14.4
DIV1	MA1192.1	WDWRGATAAGRTTWD	2.80 ⁻⁰⁸	2.74 ⁻⁰³	17	60.7	14.0
DOF5.1	MA1281.1	RAAAAAGWAAAAARAAAAARA	3.22 ⁻⁰⁸	6.35 ⁻⁰³	12	42.9	5.6
IDD2	MA1373.1	HABWAAACGACAAAA	6.52 ⁻⁰⁶	3.04 ⁻⁰¹	11	39.3	7.7
ID1	MA0120.1	TTKYYYYTHBCG	9.51 ⁻⁰⁴	4.76 ⁻⁰¹	25	89.3	44.9

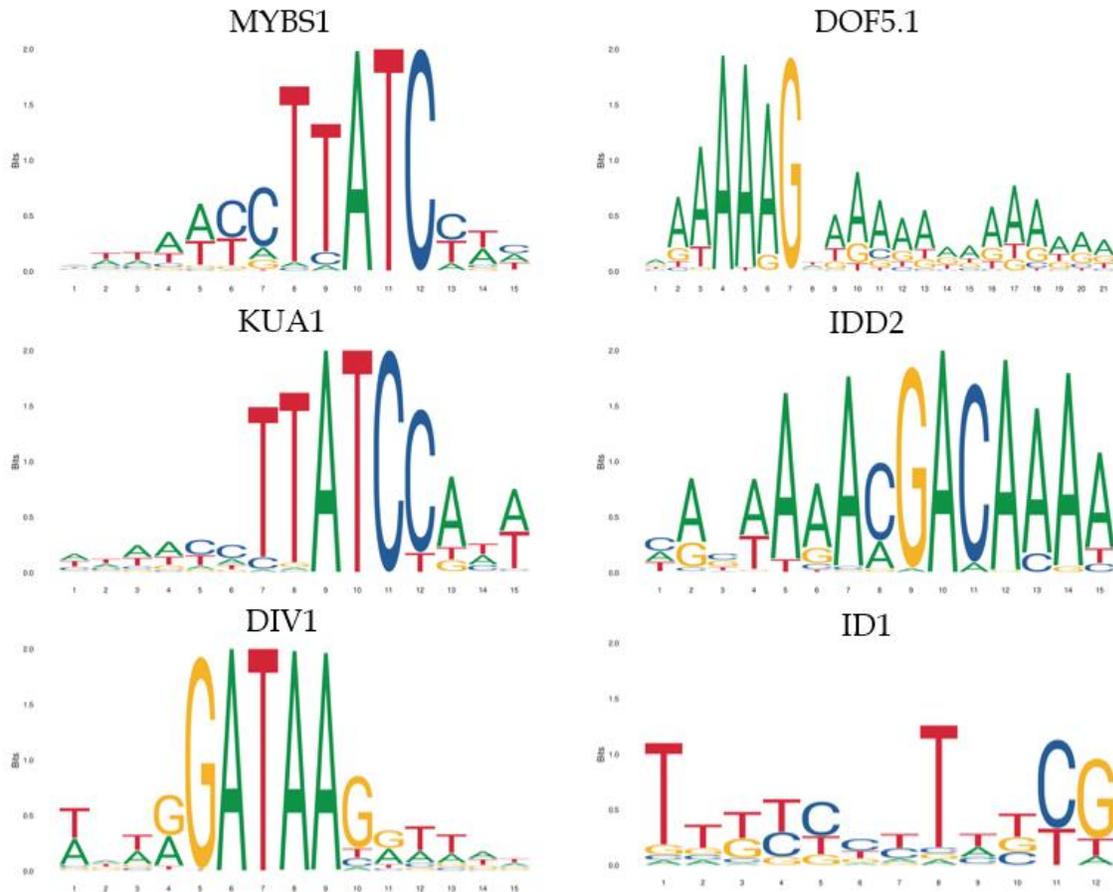


Figura 6.3 Logo de cada Matriz de posición de peso (PWM) de los TFBS presentes en los GNPRP afectados en *clb5-1*. Los logos fueron tomados de la base de datos de JASPAR.

De los TFBS que resultaron estar sobrerrepresentados en los GNPRP, el TFBS con mejor rango es el de MYBS1, el cual se encontró con un *p-value* de 1.26^{-11} y un *e-value* de 1.32^{-6} , lo que indica estar sobrerrepresentado, además de encontrarse presente en 22 genes de los 28 totales.

El siguiente con mejor rango resultó ser el TFBS de KUA1, el cual como se puede ver en su secuencia consenso y en el logo de su matriz de posición de peso (Fig. 6.3) tiene similitud con la secuencia central del TFBS de MYBS1 (TTATC), sin embargo, KUA1 sólo se encuentra sobrerrepresentado en 19 genes, no obstante, de esos 19 totales, 16 parecen estar traslapados (Fig. 6.4).

DIV1 y DOF5.1 también resultaron estar sobrerrepresentados con buenos valores de *p-value* y *e-value*, a pesar de sólo encontrarse sobrerrepresentado en 17 y 12 genes respectivamente.

En cambio, para IDD2 e ID1, sus valores de *p-value* y *e-value* indican no estar sobrerrepresentados en estas secuencias, no obstante, ID1 es el TFBS que se encuentra en la mayoría de las secuencias promotoras de los genes analizados, 25 de 28 totales.

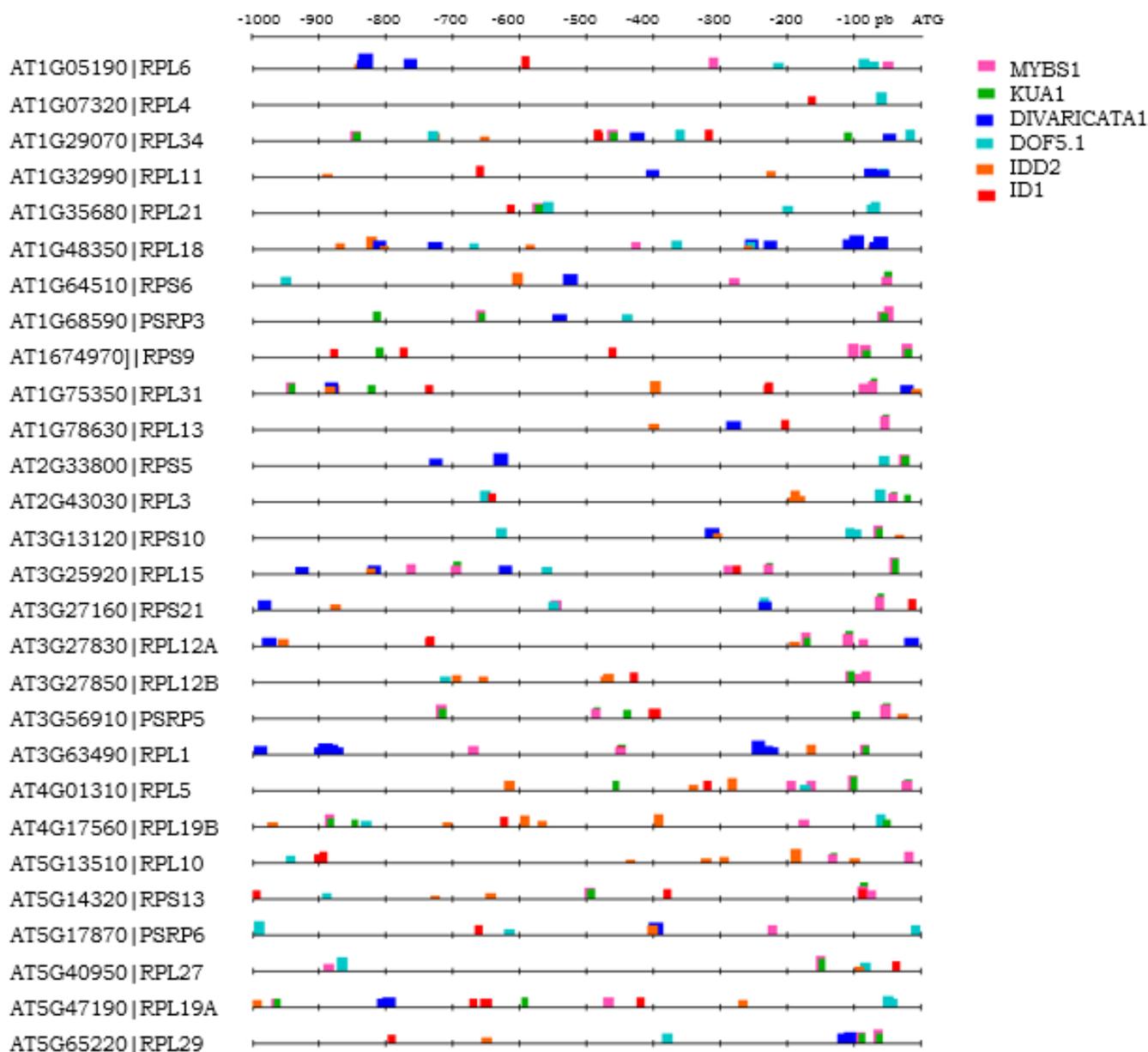


Figura 6.4 Posición de los TFBS MYBS1, KUA1, DIVIRACATA1, DOF5.1, IDD2, ID1. Se muestran los sitios de los TFBS dentro de 1000 pb de bases de las regiones promotoras río arriba del ATG de los 28 GNPRP afectados en *clb5-1*. Imagen realizada con RSAT, con la herramienta de escaneo de matriz, con los parámetros: Método de estimación del modelo de fondo, organismo *Arabidopsis thaliana*, 1er orden markov, $p\text{-value} \leq 0.0001$.

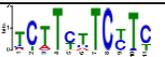
En resumen, de los TFBS reportados encontrados, no hay un TFBS que se encuentre presente en todos los GNPRP analizados. Por lo tanto, se procedió a realizar una búsqueda de motivos no descritos con la posibilidad de encontrar presente algún motivo en los 28 GNPRP.

6.2.1.2 Motivos no descritos sobrerrepresentados en los GNPRP

Con la finalidad de no descartar motivos que no hayan sido reportados, también se realizó la búsqueda de elementos no conocidos.

Para la búsqueda de motivos no descritos se utilizó el programa de MEME (Bailey et al., 2009; <https://meme-suite.org/meme/tools/meme> Tabla 6.2 y Fig. 6.5).

Tabla 6. 2. Motivos no reportados sobrerrepresentados en los GNPRP. Logo de la matriz de peso de posición (PWM) de los motivos encontrados; secuencia consenso del motivo; *e-value* representa el número esperado de motivos que podrían estar enriquecidos en secuencias primarias como en secuencias de fondo; Longitud, significa el largo en pares de bases de los motivos; Genes representa el número de genes que resultaron positivos que contienen el motivo; Proporción de verosimilitud logarítmica representa la proporción de la probabilidad de ocurrencias del motivo sobre la probabilidad de ocurrencias en el modelo nulo en logaritmo; El contenido de información del motivo en bits, es igual a la suma del contenido de información no corregido; La entropía relativa es el contenido de información corregido por el puntaje del motivo.

Logo	Secuencia consenso	<i>e-value</i>	Longitud (pb)	Genes	Proporción de verosimilitud logarítmica	Contenido de información	Entropía relativa
	TCTTYTTCYTC	7.30 ⁻¹⁹	11	28	290	15.0	14.9
	AGAGAGDGAGAMV	4.20 ⁻⁰⁶	13	23	242	14.6	15.2
	VAGAAGAAGAG	9.20 ⁻⁰¹	11	23	222	13.9	13.9

A partir de este análisis solamente se obtuvo un motivo presente en las regiones promotoras de los 28 GNPRP, TCTTYTTCYTC, el cual con el *e-value* de 7.30⁻¹⁹, indica que está sobrerrepresentado de forma más significativa que los TFBS encontrados en el apartado anterior. La posición de este motivo en las secuencias analizadas se muestra en la Fig. 6.5.

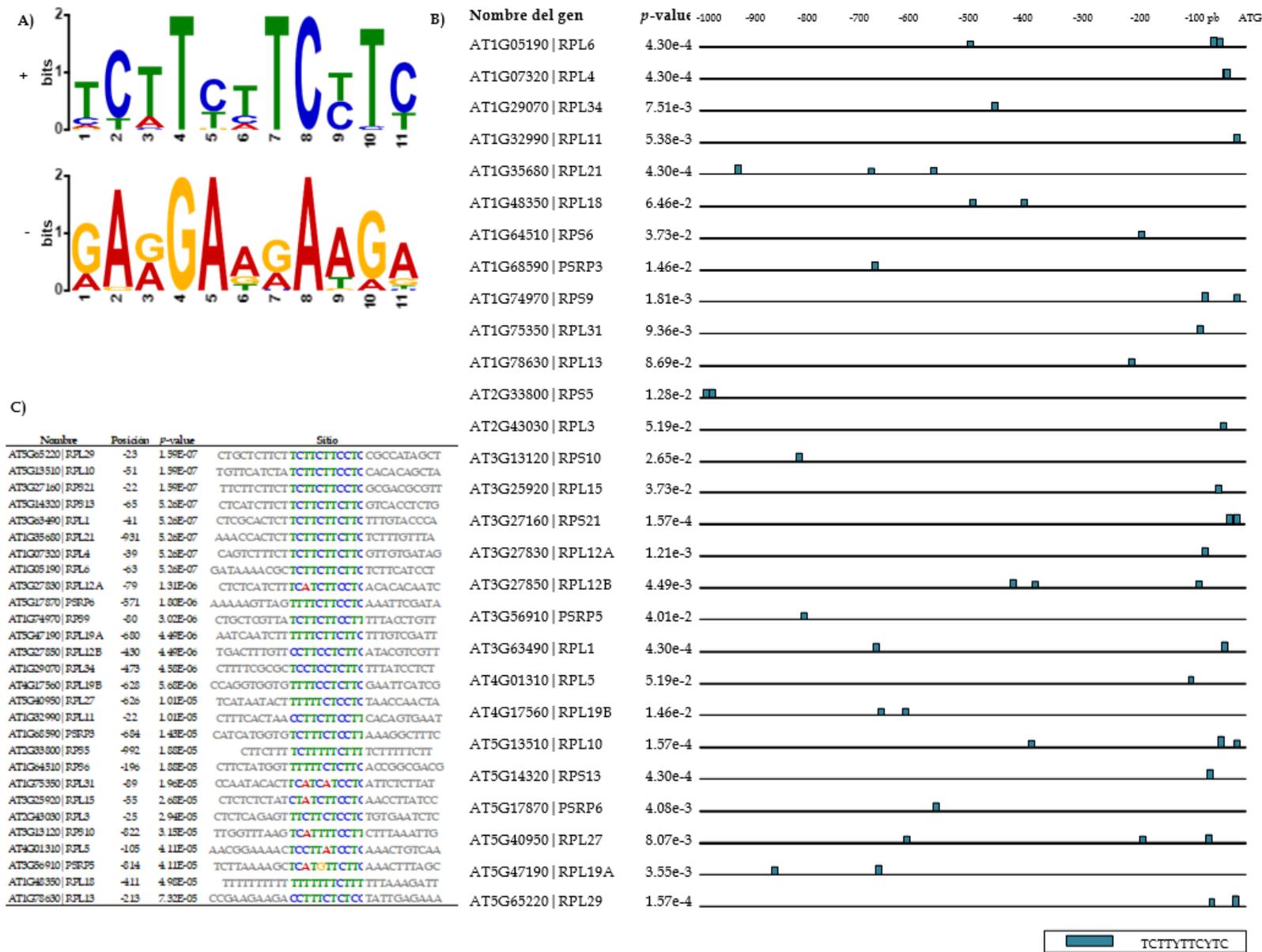


Figura 6.5. Motivo no descrito en los GNPRP. A) Logo del motivo TCTTYTTCYTC; + cadena directa; - cadena reverso-complementaria. B) Posiciones del motivo TCTTYTTCYTC en los 28 GNPRP analizados en 1000 pb río arriba del ATG. C) Posición y secuencias del motivo en las regiones promotoras, la posición indica el sitio de inicio del motivo, a lado del *p-value* de cada sitio. Se utilizó MEME para el descubrimiento de nuevos motivos.

Con el motivo no descrito encontrado, se realizó una búsqueda con la herramienta TOMTOM, la cual alinea el motivo de interés, con motivos que han sido previamente reportados (Gupta et al., 2007). Para el motivo TCTTYTTCYTC, no se encontró ningún motivo reportado que alinea con éste, lo que confirma que es un motivo hasta ahora no descrito.

En resumen, los resultados permitieron identificar distintos ERC en los GNPRP que potencialmente podrían regular su expresión en distintos momentos del desarrollo o respuesta. De los TFBS reportados, MYBS1, KUA1, DIV1, DOF5.1, IDD2, ID1, ninguno resultó estar presente en los 28 GNPRP. La hipótesis iba dirigida a que estos genes estaban corregulados a nivel transcripcional, por un ERC común presente en los 28 GNPRP, únicamente la búsqueda de motivos no descritos arrojó un motivo (TCTTYTTCYTC) que se encontró presente de manera significativa en los 28 GNPRP.

6.2.2 Delimitación de la Región Río arriba del ATG de GNPRP Afectados por ACS1

Con la idea de delimitar las secuencias requeridas para la expresión correcta de los GNPRP y estudiar la región en *cis* responsable de la represión de expresión de estos genes en presencia de ACS1, se generaron líneas transgénicas de *A. thaliana* que expresen genes reporteros, bajo la dirección de promotores de GNPRP representativos. Lo que permitirá corroborar de manera experimental si los elementos en *cis* son responsables de esta regulación.

Primero se estudiaron las posibles regiones promotoras de los 28 GNPRP, para esto se delimitó la región río arriba del ATG hasta el gen aledaño, por lo cual se muestra el UTR5' (*Untranslated Region 5'*) y toda la región intergénica (los datos se tomaron de la base de datos TAIR <https://www.arabidopsis.org/tools/bulk/sequences/index.jsp> , Fig. 6.6 y Tabla 6.3).

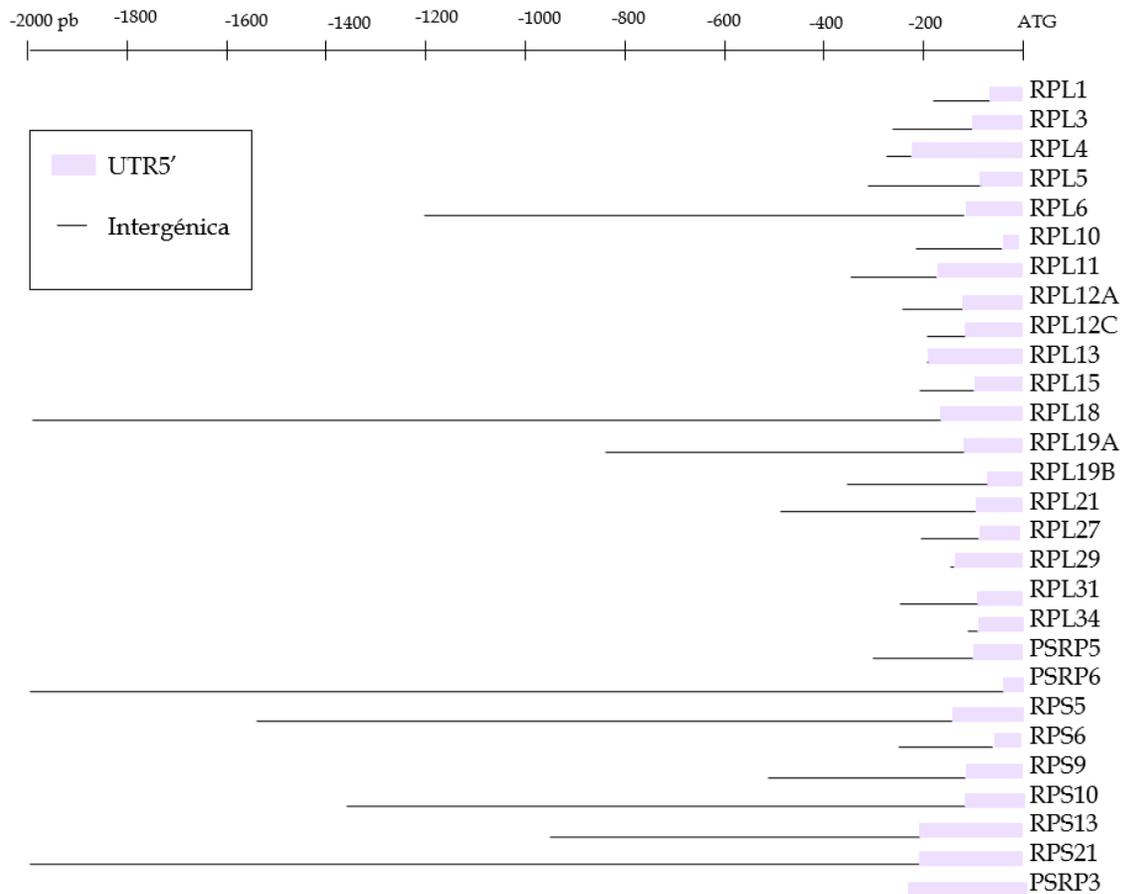


Figura 6.6. Delimitación de la región promotora de los GNPRP. En barras es la longitud de la región intergénica y en recuadro color lila la longitud del UTR5', la información se tomó de la base de datos TAIR.

Tabla 6. 3. Tamaño de la región intergénica y UTR5' de los GNPRP. Total, se refiere a la suma de pares de bases del UTR5' más los pares de bases de la región intergénica. pb, pares de bases.

Genes	UTR5' (pb)	Región intergénica (pb)	Total (pb)
At3g63490 RPL1	66	114	180
At2g43030 RPL3	102	160	262
At1g07320 RPL4	223	5	228
At4g01310 RPL5	86	229	315
At1g05190 RPL6	115	1087	1202
At5g13510 RPL10	32	173	205

At1g32990	RPL11	171	293	464
At3g27830	RPL12	121	121	242
At3g27850	RPL12	117	77	194
At1g78630	RPL13	191	4	195
At3g25920	RPL15	97	109	206
At1g48350	RPL18	167	2543	2710
At5g47190	RPL19	119	723	842
At4g17560	RPL19	71	284	355
At1g35680	RPL21	94	393	487
At5g40950	RPL27	84	116	200
At5g65220	RPL29	136	7	143
At1g75350	RPL31	92	1578	1670
At1g29070	RPL34	93	10	103
At3g56910	PSRP5	99	201	300
At5g17870	PSRP6	42	3000	3042
At2g33800	RPS5	144	1399	1543
At1g64510	RPS6	55	189	244
At1g74970	RPS9	115	397	512
At3g13120	RPS10	121	1245	1366
At5g14320	RPS13	209	745	954
At3g27160	RPS21	210	3000	3210
At1g68590	PSRP3	242	1324	1566

Como se puede observar (**Fig. 6.6** y **Tabla 6.3**), sólo 8 GNPRP tienen más de 1000 pb de su UTR5' más la región intergénica (*RPL6*, *RPL18*, *RPL31*, *PSRP6*, *RPS5*, *RPS10*, *RPS21* y *PSRP3*), la mayoría de los GNPRP se encuentra por debajo de los 700 pb.

Para generar líneas reporteras bajo la dirección del promotor, se seleccionaron a los genes *RPL4*, *RPL10*, *RPL21* y *RPL27* ya que de acuerdo con datos del RNA-seq y los qPCRs presentan los niveles de acumulación más afectados (Tovar-Escobar et al., 2020, **tabla A2** de anexos). Además, los cuatro, son genes esenciales para la traducción en el plástido (Yin et al., 2011; Romani et al., 2012; Tiller y Bock, 2014).

Del análisis de los genes *RPL4*, *RPL10*, *RPL21* y *RPL27* delimitados hasta su región intergénica, en estas regiones conservan la mayoría de los TFBS encontrados (**Fig. 6.7**), el motivo no descrito, TCTTYTTCYTC, se encuentra en las regiones de limitadas de los cuatro genes. De la región delimitada de *RPL4*, no porta los TFBS de MYBS1, IDD2 y DOF5.1. De *RPL10*, solamente no contiene los TFBS de DIV1 y KUA1. De la región delimitada de *RPL21* no contiene los TFBS de IDD2, KUA1, y DOF5.1. Sin embargo, la región delimitada para *RPL27*, contiene todos los TFBS encontrados anteriormente.

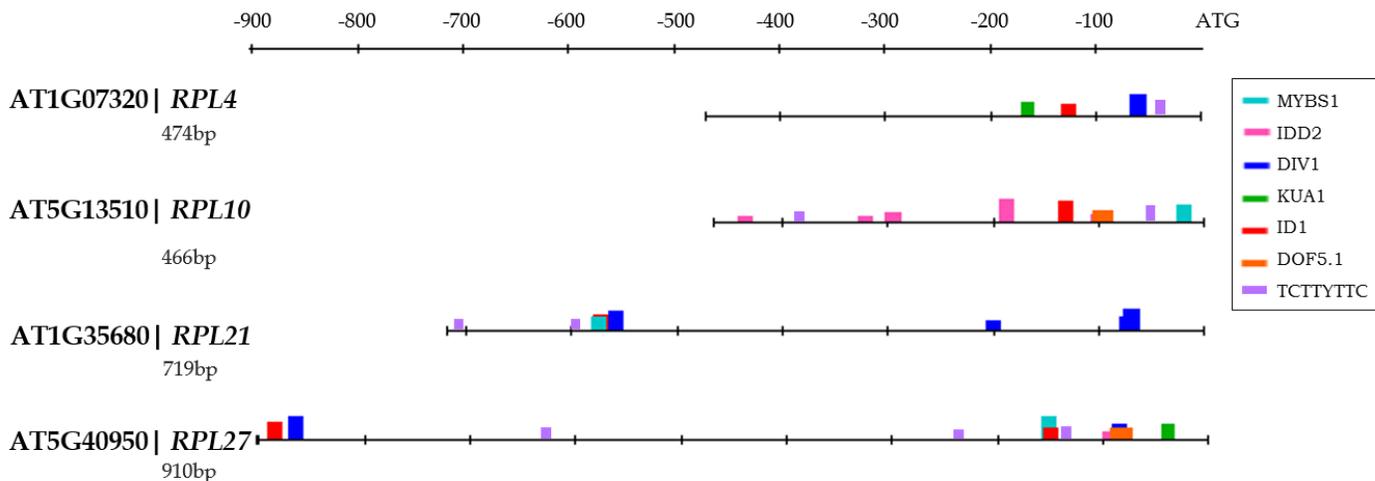


Figura 6.7 TFBS que se encuentran en las regiones delimitadas de los genes *RPL4*, *RPL10*, *RPL21*, y *RPL27*. Debajo del nombre de cada gen se encuentra la longitud en pares de bases (pb) de su región intergénica y UTR5'. El alto de las barras representa la significancia de cada sitio. Método de estimación del modelo de fondo, organismo *A. thaliana*, 1er orden Markov, p -value ≤ 0.0001 . Imagen realizada con RSAT, con la herramienta de escaneo de matriz.

6.2.3 Fusiones transcripcionales de GNPRP representativos

Debido a que en las regiones delimitadas se encuentran la mayoría de los TFBS encontrados anteriormente y los cuatro poseen el motivo TCTTYTTCYTC, se realizaron construcciones donde se tomaron las regiones de DNA río arriba del ATG, por lo tanto, contienen el UTR5' y la región intergénica (**Fig. 6.8**).

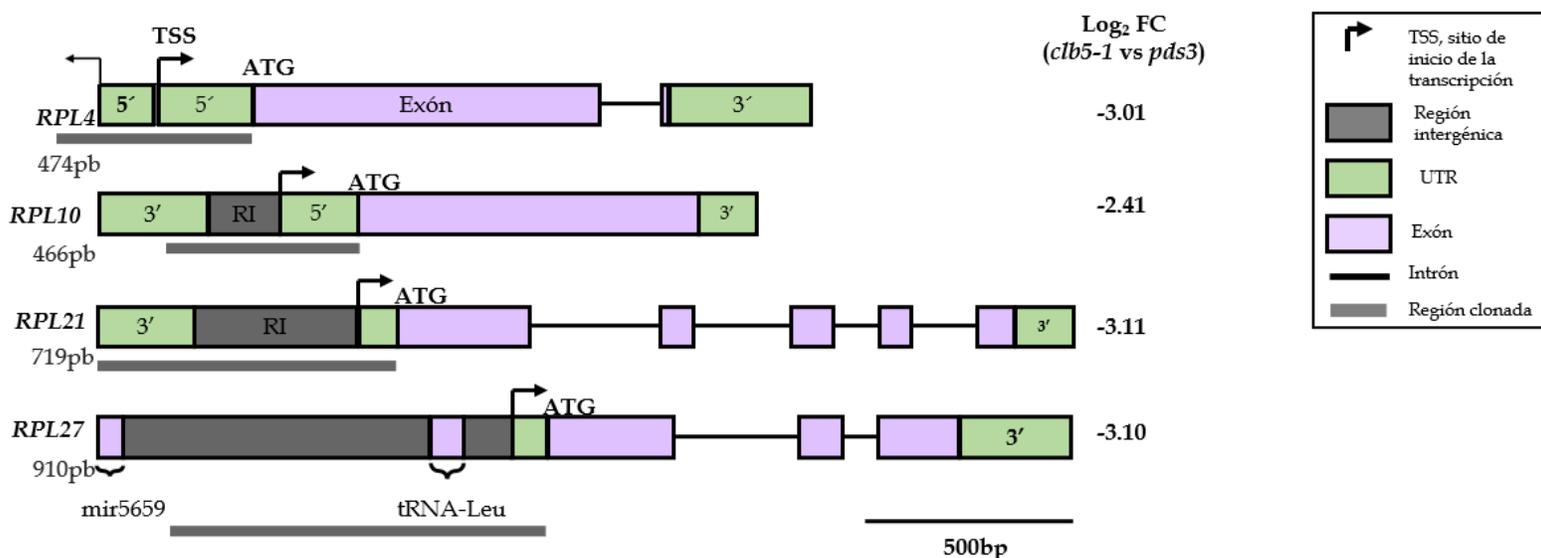


Figura 6.8 Esquema de los genes *RPL4*, *RPL10*, *RPL21*, y *RPL27*. En el esquema se muestra en una barra gris debajo de cada gen la región clonada para las fusiones transcripcionales. TSS, sitios de inicio de la transcripción; ATG, sitio de inicio de la traducción; UTR, región no traducida; RI, Región intergénica; FC veces de cambio.

Debido a que cada reportero representa distintas ventajas como también desventajas, las fusiones transcripcionales de los cuatro genes *RP* se fusionaron a distintos genes reporteros: *uidA* (β GLUCORONIDASA), *luc* (LUCIFERASA) y el reportero fluorescente *GFP* (del inglés *Green Flourescent Protein*), **Tabla 6.3**.

Tabla 4. Ventajas y desventajas de distintos reporteros en plantas. Información tomada de Leffel et al. (1997), Huttly (2009) y Gutiérrez et al. (2015).

Gen reportero	Reportero	Ventajas	Consideraciones
<i>uidA</i>	GUS	Alta estabilidad	Dependiente de sustrato
		Detección por histoquímica y fluorimétrico	No se puede observar <i>in vivo</i>
<i>gfp</i>	GFP	Detección <i>in vivo</i>	Ruido de fondo por auto fluorescencias o muerte celular
		Independiente de sustrato	
		Buena estabilidad	

<i>luc</i>	LUC	Alta sensibilidad Respuesta rápida Cuantificable	Dependiente de substrato Requiere O ₂ y ATP
------------	-----	--	--

6.2.3.1 Expresión de *RPL4* en plantas de tipo silvestre

Ocho líneas independientes generadas con la construcción transcripcional del promotor del gen *RPL4* con el reportero GUS no mostraron actividad del reportero (Fig. 6.9).

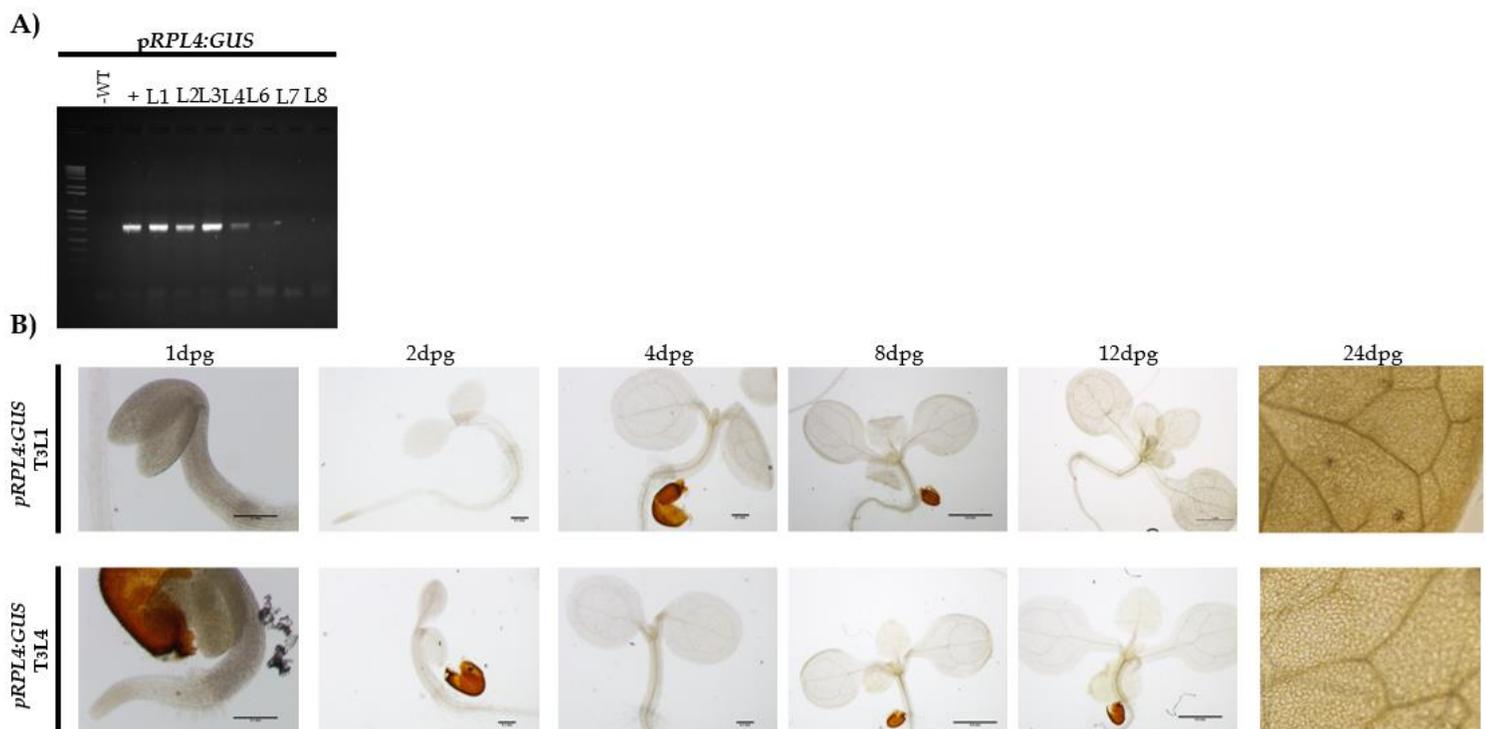


Figura 6.9. Actividad transcripcional del promotor del gen *RPL4*. A) Gel de PCR, donde se confirmó el inserto de plantas transgénicas en generación T₃. B) líneas independientes tratadas con x-gluc, y posteriormente clareadas, a los 24 dpg se muestran hojas de roseta. dpg, días post germinación. Barra de escala 0.1 mm.

6.2.3.2 Expresión de *RPL10* en plantas de tipo silvestre

Para la construcción transcripcional de *pRPL10:GUS* se observó expresión en diferentes estadios del desarrollo desde emergencia de la radícula (**Fig. 6.10**). En plántulas la actividad de GUS se detectó en cotiledones y en el cilindro vascular de la raíz primaria. A los 10 días post germinación (dpg), la actividad de GUS se observó con mayor intensidad en hojas verdaderas y con menor intensidad en cotiledones. En flor, la actividad de GUS se observa solamente en los sépalos, estigma, pero no se detecta en anteras, estigma ni pétalos (**Fig. 6.10**).

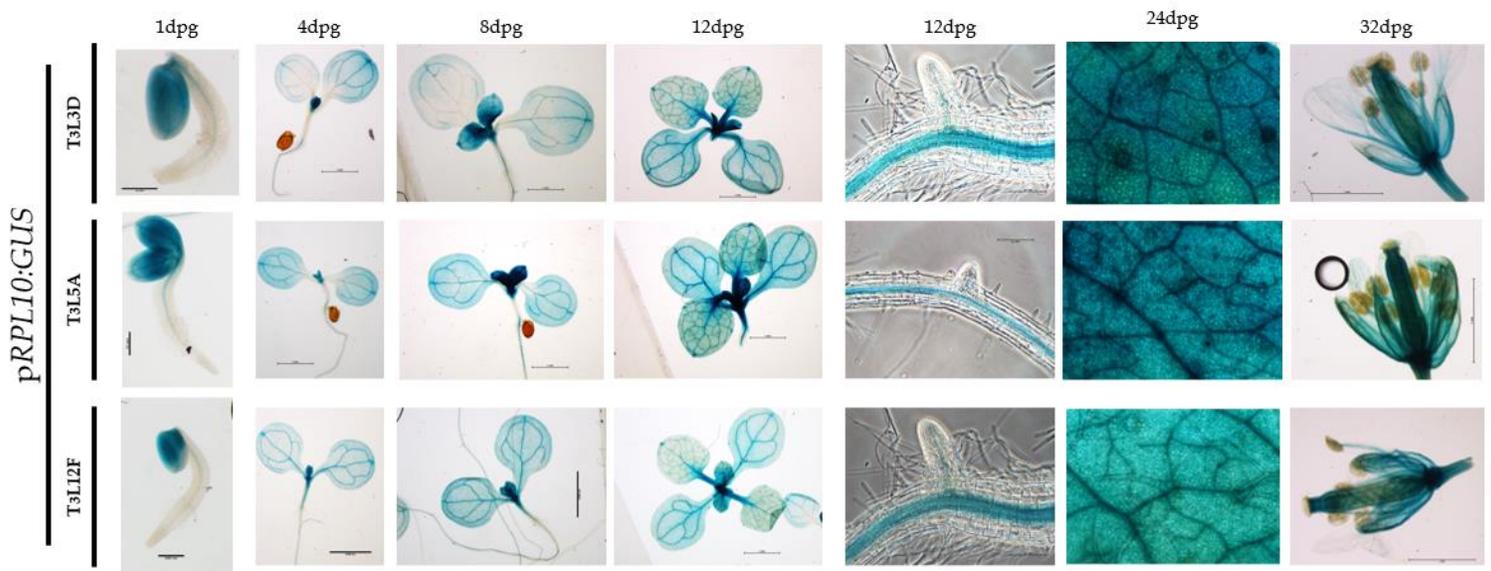


Figura 6.10. Patrón de expresión de *RPL10*. En las filas se muestran diferentes líneas independientes transgénicas homocigotas en generación T3 en diferentes estadios de desarrollo. En columnas se señala la edad de las plantas. A los 24 dpg se muestra hoja de la roseta. dpg, días post germinación. Barra de escala 0.1 mm.

6.2.3.3 Expresión de *RPL21* en plantas silvestres

La expresión de *pRPL21:GFP*, se observó predominantemente en hojas verdaderas y en el cilindro vascular de la raíz primaria de plántulas de 8 dpg (**Fig. 6.11**).

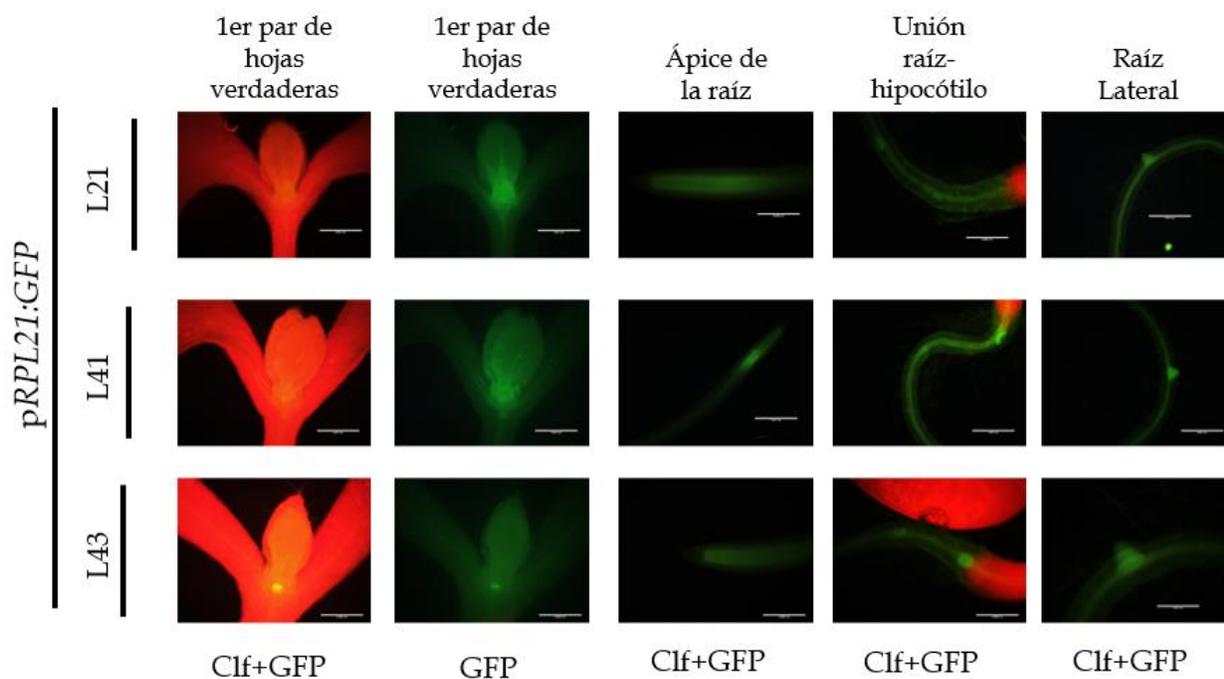


Figura 6.11. Patrón de expresión de pRPL21:GFP. Líneas transgénicas representativas portadoras de la fusión transcripcional de *RPL21*, en plantas de generación T₃, vistas en microscopio de epifluorescencia. Canales de Clf (clorofila), filtro azul (GFP). Barra de escala, 0.001 mm.

6.2.3.4 Expresión de *RPL27* en plantas silvestres

Para las plantas transgénicas de pRPL27:GFP su patrón de expresión fue muy similar a las de pRPL21:GFP, donde se observó al reportero en hojas verdaderas y el cilindro vascular de la raíz primaria de plántulas de ocho dpv, se denota una menor intensidad en la fluorescencia en estas líneas, sobre todo en la región cercana al meristemo apical del brote, a diferencia de las líneas de pRPL21:GFP (Fig. 6.12).

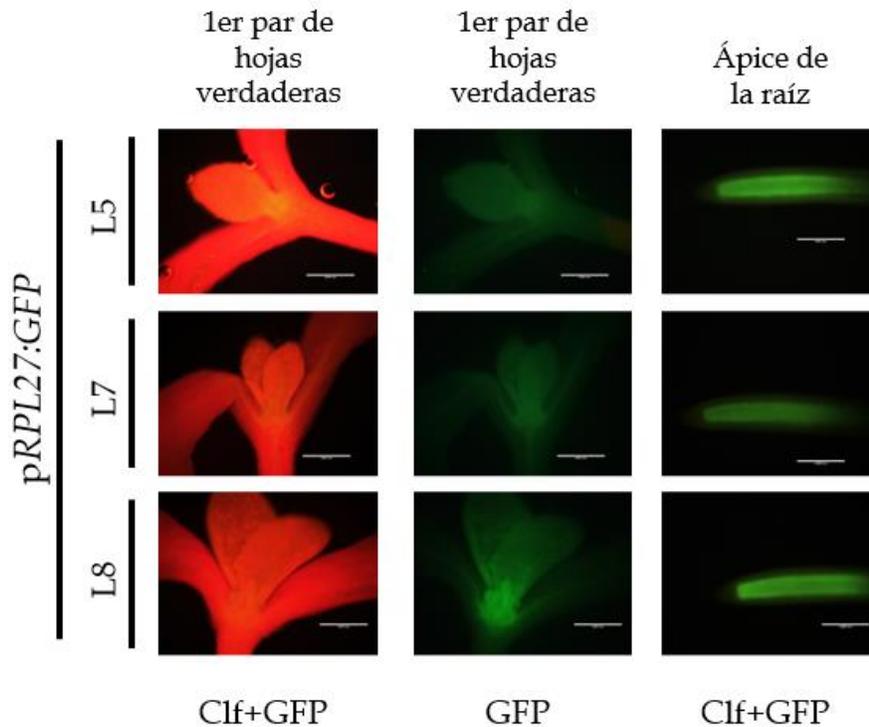


Figura 6.12. Patrón de expresión de pRPL27:GFP. Líneas transgénicas representativas de la construcción transcripcional de *RPL27*, en plántas de la generación T₃, vistas en microscopio de epifluorescencia. Canales de Clf (clorofila), filtro azul (GFP). Barra de escala, 0.001 mm.

En conclusión, se puede decir que las construcciones transcripcionales de *RPL10* con -466 pb, *RPL21* con -718 pb, y *RPL27* con -904 pb contienen los elementos en *cis* necesarios para activar la transcripción de estos genes en plantas de tipo silvestre.

6.2.4 Análisis de las fusiones transcripcionales en la mutante de *ZDS*

El propósito inicial del presente trabajo se basó en generar líneas reporteras bajo el control de las regiones promotoras de GNPRP representativos que permitieran experimentalmente identificar aquellas regiones en *cis* necesarias para la regulación mediada por ACS1.

Primero, una vez corroborada la expresión de los reporteros bajo los promotores de *RPL10*, *RPL21*, y *RPL27* en las plantas de tipo silvestre, posteriormente se realizaron cruza de las líneas transgénicas generadas en este trabajo con las mutantes *spc1-2* y *pds3*, ya que son las mutantes que están en el mismo fondo genético (Fig. 6.13, Fig. 6.14 y Fig. 6.15, ver flujo de trabajo en metodología Fig. 10.2).

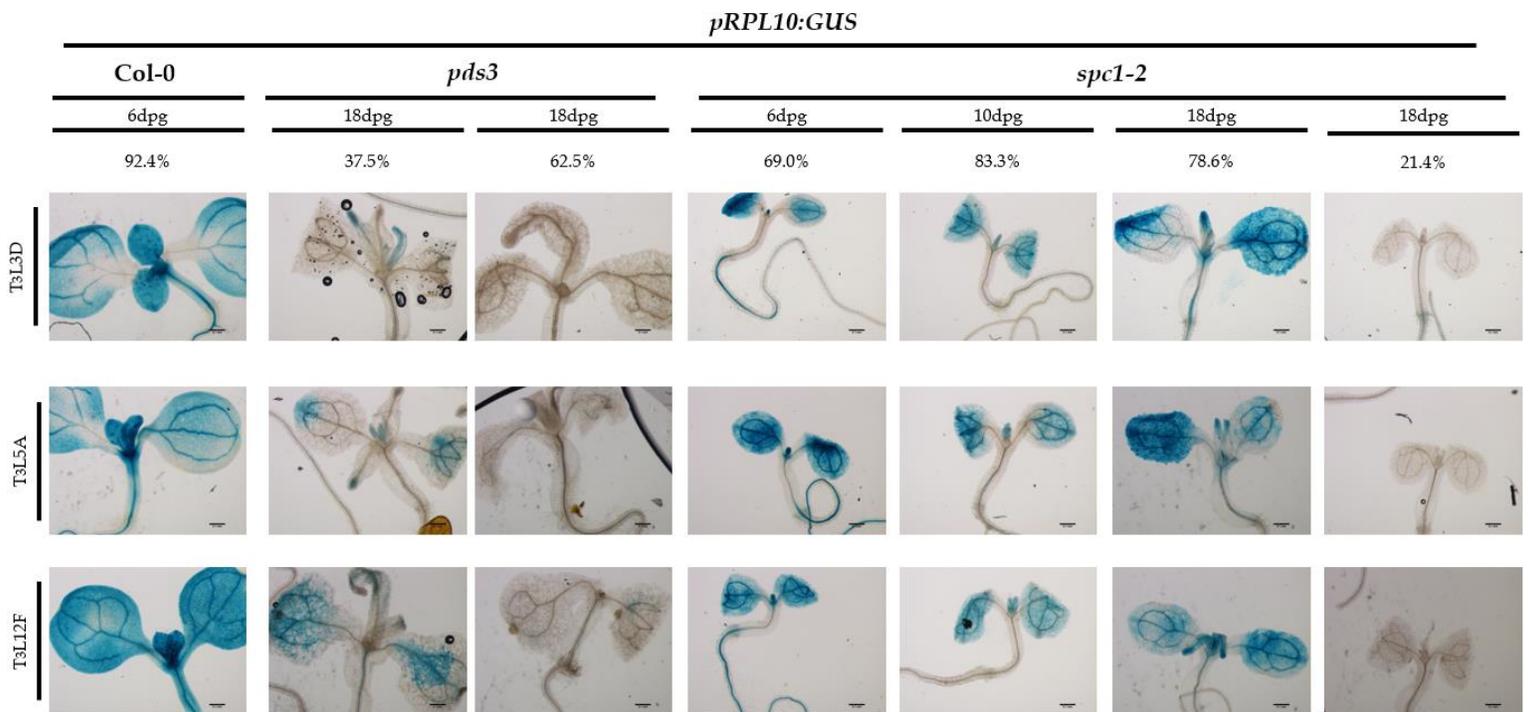


Figura 6.13. Expresión de *pRPL10:GUS* en las mutantes *pds3* y *spc1-2*. En filas se muestran líneas independientes, Generación T₃ Línea 3D.dpg, días post germinación, debajo de la edad vienen los porcentajes del número que plantas que presentó el fenotipo mostrado en las imágenes. Barra de escala 0.1 mm

Como resultado se observó actividad del reportero GUS en las líneas *pRPL10:GUS* en *spc1* en la mayoría de la población (78.6% a los 18 dpg), aunque resultó no haber una represión bajo la región promotora utilizada en este trabajo, el patrón de expresión en las mutantes de *spc1-2* parece estar distinto a las plantas de tipo silvestre donde se ve más intensidad de GUS en la zona cercana al meristemo apical del brote, o en la base de las hojas. Por otro lado, inesperadamente sólo el 37.5% de las mutantes *pds3* mostraron actividad del reportero (Fig. 6.13).

A partir de estos resultados, se puede concluir que esta fusión transcripcional no posee los elementos en *cis* para la represión de la expresión de *RPL10* en la mutante *spc1-2*.

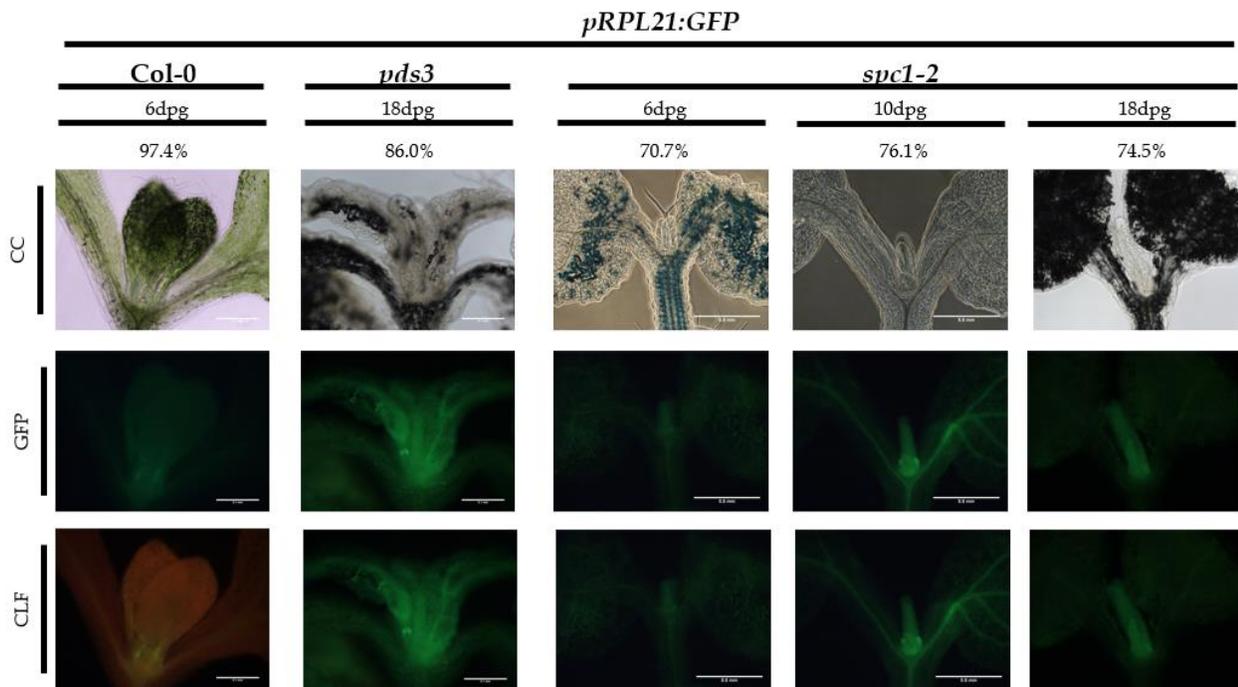


Figura 6.14. Expresión de *pRPL21:GFP* en las mutantes *pds3* y *spc1-2*. Las cruces se realizaron con la línea T₃L41E. En columnas se muestran los distintos genotipos. En filas los diferentes canales en que se tomaron las imágenes con microscopio de epifluorescencia. CC, campo claro; GFP, filtro azul; CLF, clorofila; dpg, días post germinación. Los porcentajes mostrados debajo de la edad, corresponden al porcentaje de la población que mostró el reportero. Barra de escala 0.1 mm

De la fusión *pRPL21:GFP* en la mutante *pds3* a los 18 días de edad se observó reportero en el 86.0% de la población. En la mutante *spc1-2* a los 6 dpg la expresión es tenue, y se observó un aumento en la fluorescencia a los 10 dpg (76.1%), y a los 18 dpg (74.5% , **Fig. 6.14**).

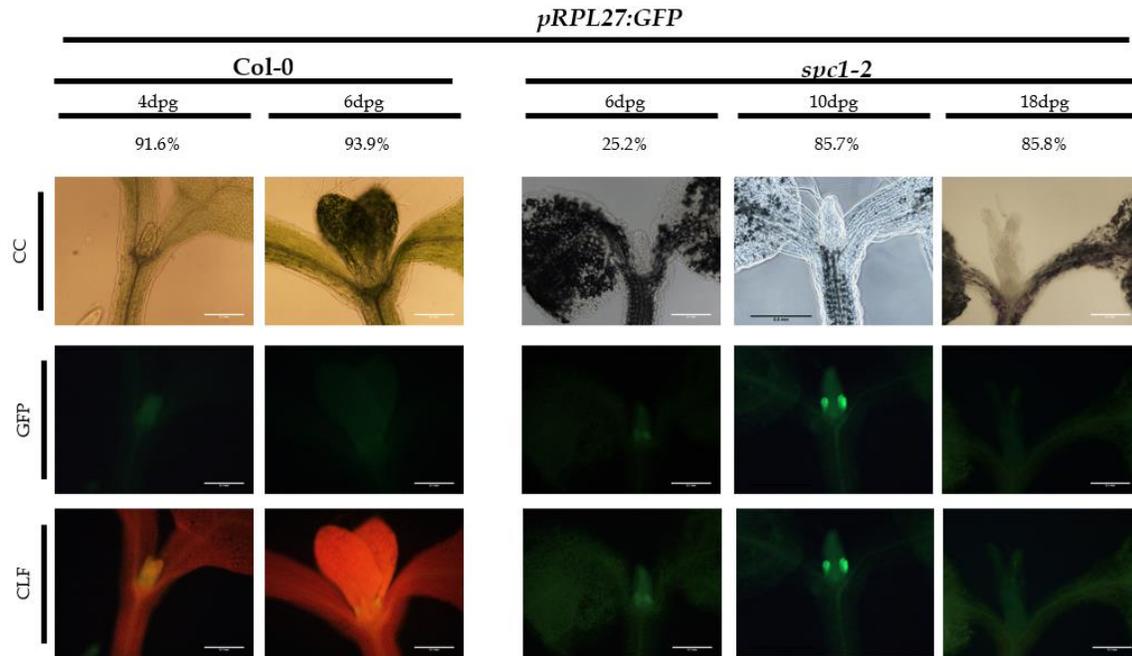


Figura 6.15. Expresión de *pRPL27:GFP* en *spc1-2*. Las cruces se realizaron con la línea T₃L7A. En columnas se muestran los distintos genotipos, Col, Columbia 0 (Tipo silvestre), y mutante *spc1-2*. En filas los diferentes canales en que se tomaron las imágenes con microscopio de epifluorescencia. CC, campo claro; GFP, filtro azul; CLF, clorofila; dpg, días post germinación. Los porcentajes mostrados debajo de la edad, corresponden al porcentaje de la población que mostró ese fenotipo. Barra de escala 0.1 mm

De la fusión *pRPL27:GFP*, a los 6 dpg y 18 dpg en la mutante *spc1-2* disminuye la expresión de la fusión *pRPL27:GFP*, sin embargo al día 10 dpg, se nota un aumento en la expresión, lo que podría sugerir que en esta etapa de desarrollo de la hoja la acumulación de ACS1 no afecta en la expresión de *RPL27*, al menos no con los elementos en *cis* que contienen la fusión realizada en el presente trabajo (Fig. 6.15).

De las fusiones transcripcionales con el reportero GFP, los resultados no mostraron ser muy claros, por lo que fue necesario corroborar de forma cuantitativa la expresión la actividad transcripcional, bajo los promotores de *RPL21* y *RPL27*, con el reportero de luciferasa (Fig 6.16).

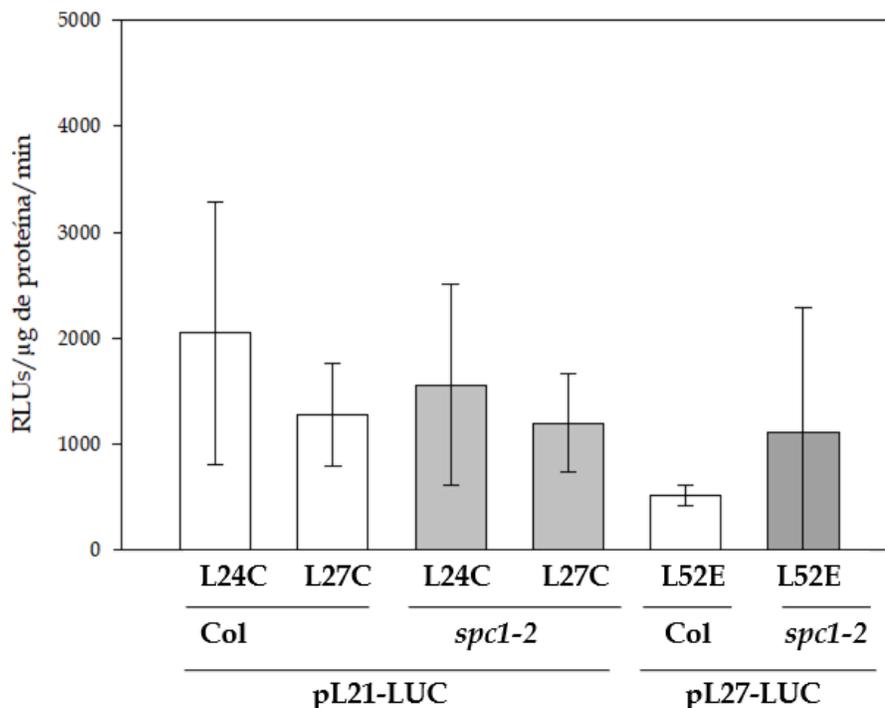


Figura 6.16. Actividad de LUCIFERASA de las fusiones pRPL21:LUC y pRPL27:LUC en *spc1-2*. Las cruces se realizaron con las líneas T₃L24C, T₃L27C de la fusión transcripcional pRPL21:LUC y T₃L52E de la fusión transcripcional pRPL27:LUC. Se colectaron plántulas de tipo silvestre Col, a la edad de 8 dpv, y las plantas albinas de *spc1-2* se colectaron a los 18 dpv. Se extrajo proteína total de planta completa ($n=15$). Las diferencias en los valores de las medias no muestran una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.121$).

Como se muestra en la **Fig. 6.16**, las fusiones de pRPL21:LUC, las plantas de tipo silvestre (Col) se comportan de forma similar a la mutante *spc1-2*.

Para las líneas de pRPL27:LUC, parecido a lo que se ve con el reportero de GFP bajo la región promotora de RPL27 al día 10 dpv, en la mutante *spc1-2* aumenta la actividad de luciferasa.

En resumen, se puede concluir, con ayuda de las fusiones transcripcionales de RPL10, RPL21 y RPL27, que la regulación a nivel transcripcional en la mutante *spc1-2* no es por las fusiones transcripcionales realizadas en este trabajo.

6.3 Las mutantes *clb5-1* y *spc1-2* están afectadas en la acumulación de RNA ribosomal del plástido

Por último, para ver si la represión de la transcripción de GNPRP en presencia de ACS1 repercute en la acumulación de las subunidades, se decidió analizar la acumulación de RNA ribosomal (rRNA), ya que la acumulación de rRNA es una aproximación de la acumulación de los ribosomas, además la síntesis rRNA es un paso limitante en la síntesis de ribosomas, se analizó la presencia de rRNAs del plástido en las mutantes *pds3*, *clb5-1* y *spc1-2* (**Fig. 6.17**).

Para esto se utilizó BioAnalyzer (Agilent), para determinar la cantidad del RNA de una forma más fiable, ya que consiste en un sistema de micro electroforesis mediante el uso de nano capilares. Además, los rRNAs sólo son estables si se integran en las subunidades ribosómicas, por lo tanto, la acumulación de rRNAs proporciona información sobre la acumulación de ribosomas y de sus subunidades (Walter et al., 2010; Tiller et al., 2012; Fristedt et al., 2014).

Se observó que para las mutantes *clb5-1* y *spc1-2* los rRNAs correspondientes al plástido están ausentes, en comparación con la mutante *pds3* que, a pesar de también estar afectada en la vía de síntesis de carotenos, ésta no se ve afectada de igual manera que las mutantes

de ZDS (Fig. 6.17A, ver longitud de nucleótidos de los rRNAs en Tabla A3 de anexos).

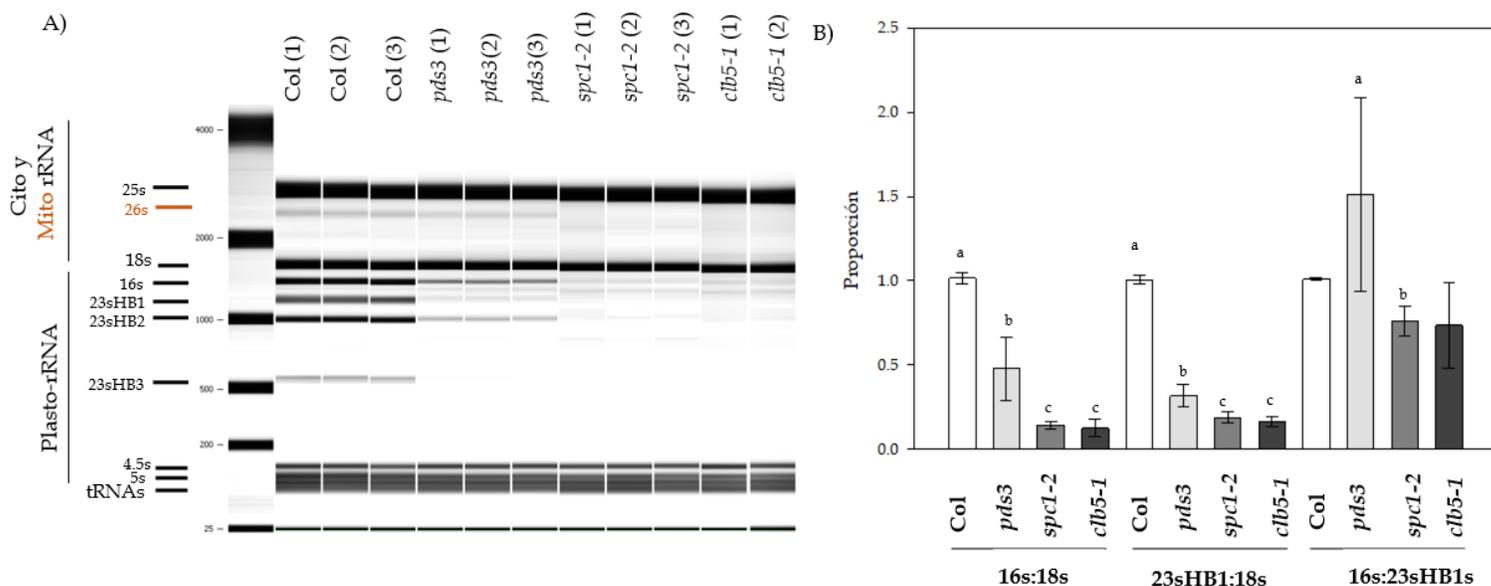


Figura 6.17. Las mutantes de ZDS carecen de los rRNAs del plástido. A) Gel de integridad de RNA, realizado con BioAnalyzer Agilent, se cargó 0.3 μ g de RNA total de cada línea, de cada réplica biológica (1, 2, 3), la referencia de los tamaños se tomó de Bieri et al. (2017) y Waltz et al. (2020), el color naranja identifica a los rRNAs que corresponden a la mitocondria. B) Proporción de los rRNAs en las distintas líneas. Col, plantas silvestres ecotipo Columbia 0, *pds3*, mutante albina de la vía de carotenogénesis, *clb5* y *spc1*, mutantes de la enzima ZDS involucrada también en carotenogénesis.

Del gel se observó una distinción de las mutantes de ZDS en comparación con *pds3* se vio reflejada en todos los rRNAs que corresponden al plástido (16s, 23sH1, 23sH2 y 23sH3), esto a pesar de que *pds3* es también una mutante albina afectada en la vía de síntesis de carotenos.

Además, se observó que las mutantes de ZDS, son las únicas que carecen de rRNA 26s de la mitocondria (Fig. 6.17A).

Las proporciones de los rRNAs sirven para indicar si hay una perturbación en la acumulación de los ribosomas del plástido o de sus subunidades. Cuando se muestra de esta manera (Fig. 6.17B), una relación 16S:18S <1.0 indica agotamiento de las subunidades 30S, una relación 23SHB1:18S <1.0 indica agotamiento de las subunidades 50S y

la relación 16S:23S es una medida directa de la estequiometría de las dos subunidades ribosomales del plástido (Tiller et al., 2012).

La proporción 16S:18S de las tres mutantes albinas (*pds3*, *spc1-2* y *clb5-1*) se encontró por debajo de 1, lo que sugiere que las tres mutantes tienen disminuidos la acumulación de la subunidad pequeña del ribosoma del plástido (SSU), no obstante, las mutantes de ZDS (*clb5-1* y *spc1-2*) se encuentran más afectadas que la mutante *pds3* (**Fig. 6.17B**). Lo mismo sucedió con la relación 23SHB1:18S. En cambio, para la relación 16S:23S (30S:50S), *pds3* mostró tener más acumulación de la SSU, a diferencia de *spc1-2* y *clb5-1* que mostraron tener más acumulación de la subunidad mayor (LSU) con relación a la SSU.

En conclusión, las mutantes *spc1-2* y *clb5-1* tienen drásticamente disminuidos los rRNAs del plástido a diferencia de *pds3*, a pesar de ser también una mutante albina. El hecho de que la acumulación de los rRNAs del plástido en las mutantes de ZDS estén afectados indica que en efecto, la menor transcripción de GNPRP por la señal ACS1, repercute en la acumulación de ribosomas del plástido, lo que afecta la acumulación también de rRNAs, debido a que si no está incorporado a las subunidades del ribosoma éste se degrada.

7. DISCUSIÓN

La pregunta central de este trabajo se centró en tratar de entender el mecanismo molecular de cómo la acumulación de ACS1 en las mutantes de ZDS participa en la regulación de los GNPRP.

7.1 Nivel de regulación de GNPRP en presencia de ACS1.

El análisis realizado en el presente trabajo apoya a la hipótesis de que la regulación de los GNPRP es a nivel transcripcional, esto se basa en los resultados de qPCR que demostraron que los niveles de los transcritos prematuros al igual que los maduros tienen los niveles reducidos en *spc1-2* y *clb5-1*. Así que identificar el mecanismo de esta regulación es central para entender el proceso que media la señalización retrógrada proveniente de la acumulación de ζ carotenos.

El ribosoma es un complejo de RP y rRNA, las RP se encuentran de manera equimolar, por lo tanto, se pensó que había una co-regulación de la expresión de GNPRP, pero hasta la fecha se sabe muy poco al respecto, sólo se ha reportado un trabajo donde se mostró que 22 GNPRP están corregulados por la luz (Maclean et al., 2008). El análisis por qPCRs en este trabajo demuestra una co-represión de los genes *RPL4*, *RPL21*, *RPL27*, *RPL34*, *RPS13*, y *RPS12* en las mutantes *clb5* y *spc1-2*, confirmando lo que ya se había observado en el RNA-seq para la mutante *clb5-1* (Escobar-Tovar et al., 2020). Lo que apoya que los 28 GNPRP cuyos transcritos están disminuidos en el RNAseq, podrían estar igualmente corregulados. Aunque es importante mencionar que el análisis de la acumulación de un transcrito prematuro, es una forma indirecta de ver la actividad transcripcional para un gen, debido a que sólo se determina la acumulación relativa del transcrito en un tiempo fijo, a pesar de que diferentes trabajos han mostrado que la acumulación de pre-mRNA correlaciona con la actividad transcripcional de un gen (Zeisel, et al. 2011; Ameer, et al. 2011; Henriks et al.; 2014, Gaidatzis et al., 2015), no obstante, sería pertinente para tener una demostración contundente a este respecto un análisis más directo utilizando técnicas como *run-on*, en la cual sería posible determinar la eficiencia transcripcional.

A fin de esclarecer la co-regulación a nivel transcripcional de los GNPRP se hizo una búsqueda de ERC con la idea de identificar algún o algunos TFBS que pudieran estar compartidos en los GNPRP y que pudieran estar involucrados en su regulación en presencia de ACS1. De este análisis se encontraron secuencias blanco de los factores transcripcionales MYBS1, KUA1, DOF5.1, IDD2, los cuales resultan ser buenos candidatos para la co-regulación de GNPRP. Sin embargo, el inconveniente es que sólo el sitio de unión para MYBS1 se encontró en la mayoría de los genes analizados (22), pero ninguno de los TFBS reportados se encontró en todos los GNPRP (28). En una búsqueda previa hecha por Maclean et al., (2008) de los ERC en GNPRP sólo se reportaron los a los elementos I box, GT-1 y Dof compartidos y en máximo 22 GNPRP. Este resultado correlaciona con nuestro análisis y apoya que no parecen existir ERC comunes para todos los GNPRP. Es necesario enfatizar que estos análisis *in silico* tienen limitaciones

importantes, por lo tanto, sólo sirven como una predicción. El mayor riesgo al identificar los ERC es que la secuencia es únicamente uno de los muchos parámetros que determinan si un FT se une a ellos y si el evento de unión afecta la expresión génica. Es necesario también considerar información acerca de las marcas epigenéticas, la accesibilidad de la cromatina, la presencia o abundancia de los FT y sus interactores, entre otros factores que contribuyen a desencadenar un programa regulatorio (Zemlyankaya et al., 2021). No obstante, la detección de los TFBS en las regiones regulatorias es un requisito esencial para el estudio de la regulación transcripcional de los genes. Sin embargo, también existen diversos reportes en los que el uso del análisis *in silico* como el realizado en este trabajo han permitido la identificación de elementos y factores importantes para la regulación de varios genes. Por lo tanto, aún para los candidatos identificados se requiere demostrar su funcionalidad *in planta*.

7.2 Las líneas con las fusiones de pRPL10, pRPL21, pRPL27 muestran una fuerte expresión en hojas jóvenes

En el presente trabajo se mostró el primer reporte del patrón de la expresión de *RPL10*, el cual mostró una fuerte expresión en hojas jóvenes. También, el análisis del patrón de expresión para el gen *RPL21* usando diferentes reporteros (*pRPL21:LUC*, *pRPL21:GFP*), se observó predominantemente en hojas verdaderas. Este patrón de expresión concuerda con el que había sido reportado para *Arabidopsis* por Yin T. et al. (2012). En este caso los autores, utilizaron un fragmento de 2066 pb rio arriba del UTR5' y se detectó expresión del transgén en el cilindro vascular de la raíz primaria, en las hojas verdaderas y en flor (Yin et al., 2012). Lo que nos permite concluir que los ERC que portan las fusiones realizadas en este trabajo, a pesar de ser pequeñas, es posible su expresión donde corresponde, en plantas de tipo silvestre. También en espinaca, mediante northern blot, se había reportado que la expresión de *RPL21*, al igual que otros genes de PRP (*RPL4*, *RPL15*, *RL19*, *RPS1*, *RPS17*, *RPS22* y *RPS30*), se restringe a las hojas fotosintéticamente activas (Zhou et al., 1992; Villain et al., 1994, Achard et al., 2003), desde el inicio del desarrollo de primordio foliar (Liang et al., 2018, Dalal et al., 2018; Tiang et al., 2019). Lo que sugiere que la expresión de PRP es

necesaria para la diferenciación del plástido a cloroplasto y también probablemente lo podría ser para la determinación de la hoja, lo que toma sentido ya que en las mutantes de *ZDS* tienen afectado el desarrollo de la hoja y los niveles de expresión de GNPRP también están fuertemente afectados.

El patrón de expresión observado de las fusiones transcripcionales de *RPL10*, *RPL21*, y *RPL27* realizadas en este trabajo, junto con los análisis previamente reportados, permiten concluir que la región regulatoria utilizada en las construcciones obtenidas es suficiente para inducir la transcripción de estos genes, ya que su patrón de expresión concuerda a lo reportado para el transcrito endógeno en plantas de tipo silvestre, a pesar de que las fusiones poseen longitudes pequeñas de la región promotora de estos genes.

El análisis de las líneas transgénicas con la construcción de *RPL4* conteniendo 474 pb desde el ATG no mostró actividad del reportero en líneas independientes. Dicho resultado puede deberse a que la construcción utilizada no incluye los elementos en *cis* necesarios para su correcta expresión. Cabe remarcar que la región intergénica de este gen en *Arabidopsis* incluye solamente cinco pares de bases y que existe un gen adyacente que se transcribe en la dirección opuesta a *RPL4*. Por lo tanto, es posible que los elementos requeridos para la transcripción de este gen podrían estar localizados aún más hacia el 5', o bien que existan elementos importantes necesarios para su transcripción dentro de la región codificante, ya que existen varios ejemplos en los que un promotor aun incluyendo los sitios de iniciación y de unión a factores de transcripción está inactivo, a menos de que estén presentes uno o más de los intrones del gen (Callis et al., 1987; Palmiter et al., 1991; Emami et al., 2013; Gallegos y Rose, 2017).

El análisis del patrón de expresión para el gen *RPL27* (*pRPL27:GFP*) realizado en este trabajo mostró una expresión clara en la raíz limitándose al cilindro vascular (**Figura 6.12**), sin embargo, una fusión transcripcional anteriormente publicada, que contenía -1522 pb río arriba del sitio de inicio de transcripción de *RPL27*, no mostró expresión

en el cilindro vascular de la raíz (Maclean et al., 2008). Esto podría deberse a que en la búsqueda de ERC negativos se encontró que en la región regulatoria de *RPL27* se encuentran dos elementos *S1F* (5'-ATGGTA-3'), el cual es un ERC que se ha demostrado que regula negativamente su expresión en la raíz (Zhou D. X. et al., 1992; Langrage et al., 1993; Villain P., et al., 1994). En *A. thaliana* este elemento se localiza en las posiciones -1199 y -1015 de *RPL27*, mientras que la construcción reportada aquí sólo incluye 904 pb río arriba del ATG, razón por la cual no contiene el elemento *S1F*. Resulta interesante remarcar que el elemento *S1F* se ha encontrado en distintos GNPRP (*RPS1*, *RPS9*, *RPS22*, *RPS10*, *RPL35* y *RPL21*) en espinaca (Zhou et al., 1992; Villain et al., 1994, Achard et al., 2003), lo que apoya a que este elemento participe en regular negativamente la expresión de *RPL27* en raíz. Basado en estos datos se concluye que el patrón de expresión bajo la región promotora de *RPL27* observado en este trabajo no contiene todos los elementos necesarios para su regulación negativa en la raíz.

7.3 Los ERC requeridos para la represión de *RPL10*, *RPL21*, *RPL27* en respuesta a ACS1

Con la idea de identificar los elementos en *cis* responsables de la regulación negativa de GNPRP mediada por ACS1 de manera experimental, se analizaron las fusiones transcripcionales obtenidas en el fondo genético *spc1-2*. La hipótesis de esta aproximación experimental es que en este fondo genético los niveles de expresión de las fusiones de *RPL10*, *RPL21* y *RPL27* previamente observada en los qPCRs deberían de disminuir a causa de la acumulación de ACS1. Inesperadamente en la mutante *spc1-2* se mantuvieron los niveles del reportero para los tres genes analizados y se comportaron de manera contraria a la hipótesis. Esto puede deberse a que las construcciones carecen de ERC necesarios para la regulación negativa dependiente de ACS1, la cual podría encontrarse incluso dentro de la región codificante o que haya regiones regulatorias involucradas en la transcripción de los GNPRP río abajo del gen, en dirección 3'. Sin embargo, no se descarta que la disminución de la transcripción para estos genes está siendo regulada a otro nivel, siendo influida por modificaciones epigenéticas, o el estado de la cromatina en donde se encuentran estos genes. No obstante, aunque se

esperaba una menor actividad del reportero en la mutante *spc1-2*, se distingue un cambio en el patrón de expresión para los reporteros GUS y GFP, ya que en las plantas de tipo silvestre la mayor actividad del reportero se ve en la base de las hojas, lo que sugiere que es cercano al MAP, donde podría ser necesaria la expresión de GNPRP para que se dé la diferenciación de la hoja en una hoja con lámina foliar.

7.4 Mutantes de ZDS tienen afectada la acumulación de rRNA del plástido

Los antecedentes previos a este trabajo apuntaban a que la traducción de proteínas en el plástido se encuentra afectada de manera importante en las mutantes del gen *ZDS*, ya que los niveles de proteínas codificadas en el plastoma como *RpoA*, *ClpP1*, *Rpl2*, *RbcL*, *PetA*, disminuyen fuertemente o son indetectables en las mutantes *clb5-1* y *spc1-2*, pero sí hay transcrito de *ClpP1* y *Rpl2*, lo que indica que si hay transcripción, pero no traducción para ciertos genes en el plástido en las mutantes de *ZDS* (Avendaño-Vázquez et al., 2014; Escobar-Tovar et al., 2020). Con la idea de dar apoyo adicional en este trabajo se analizaron los niveles de concentración de los rRNAs plásticos ya que se sabe que una acumulación normal de éstos se debe a que las proteínas ribosomales se encuentren ensambladas. Por lo tanto, defectos en su acumulación es una buena indicación de la acumulación de las subunidades del ribosoma.

Aquí se demostró que tanto en la mutante *clb5-1* como en *spc1-2* los niveles de acumulación de los rRNA del plástido son tan bajos que no se detectan a través de un método tan sensible como un BioAnalyzer. Esto contrasta con lo que ocurre en otra mutante albina como *pds3* en la que si se observó acumulación de rRNAs del plástido y mitocondria. Además, se distinguen de *pds3*, en la acumulación de la SSU, ya que se encuentra en menor cantidad que la LSU del ribosoma del plástido. Por lo tanto, este análisis permite apoyar que la presencia de ACS1 provoca un defecto sustancial en la traducción plastídica debido a la falta de ribosomas.

Los datos del presente trabajo contribuyen a una comprensión más clara del modelo propuesto de la señal ACS1, donde en ausencia de la enzima ZDS, se acumula fitoflueno o ζ -caroteno, los cuales son escindidos por CCD4 y dan como producto un apocaroteno, que se sugiere funciona como señal retrógrada, denominada ACS1, y que afecta la transcripción de los GNPRP (al parecer independiente de los TFBS MYBS1, KUA1, DOF5.1, IDD2 y TCTTYTTCYTC), que en consecuencia causa una disminución de ribosomas del plástido, por lo tanto la falta de la traducción de proteínas en el plástido envía una segunda señal mediada por GUN1 que afecta el desarrollo de la hoja (Fig.7.1).

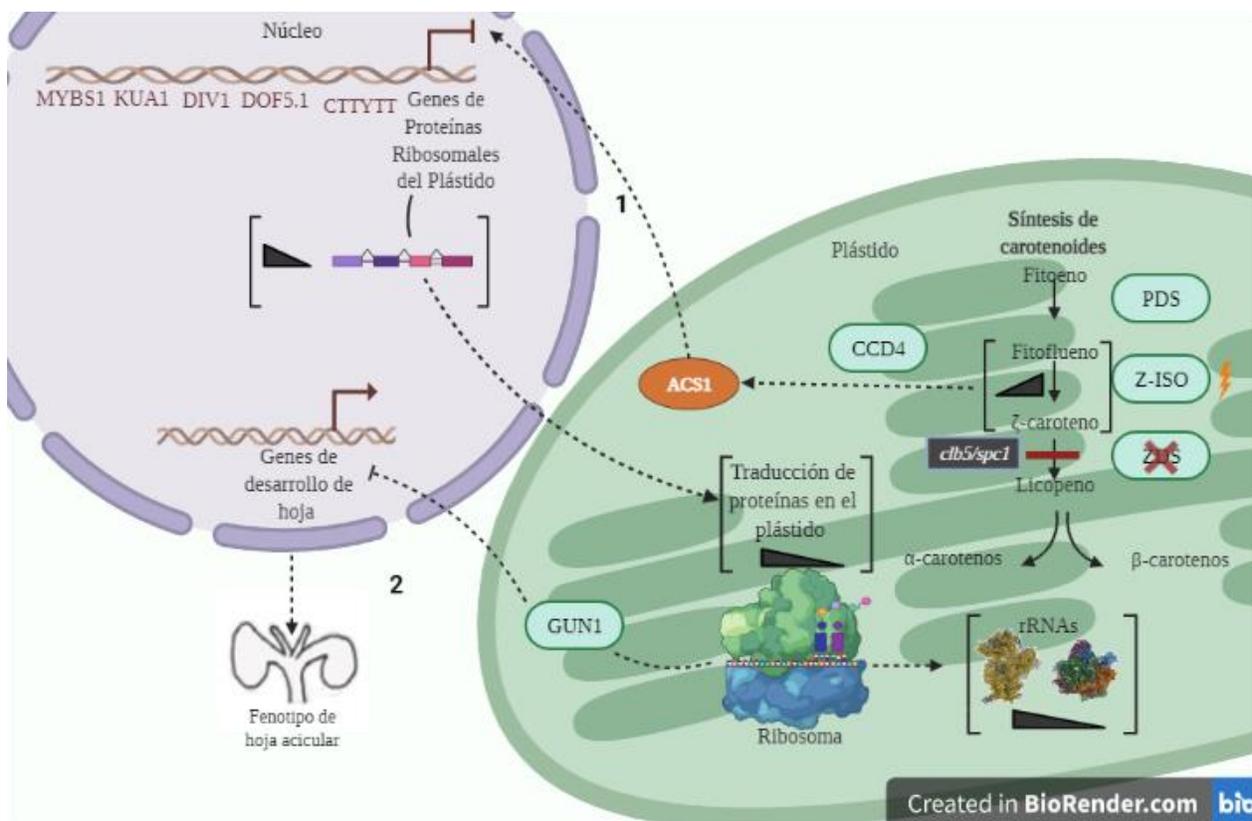


Figura 7.1. Hipótesis de la señal ACS1. La ausencia de la enzima ZDS influye en la acumulación de fitoflueno o ζ -caroteno, que es escindido por CCD4 lo que genera la señal ACS1, afectando la transcripción de los GNPRP, probablemente de manera independiente a los TFBS de IDD2, DOF5.1, KUA1, MYBS1, CTTCTTY. Debido a la disminución de la transcripción de GNPRP, esto influye en la acumulación de ribosomas del plástido, y en consecuencia una disminución en la acumulación de subunidades de ribosomas repercute en la acumulación de rRNAs del plástido. Que disminuya la traducción del plástido desencadena una segunda señal mediada por GUN1 que afecta a genes involucrados en el desarrollo de la hoja. Triángulos en negro señalan si la concentración disminuye o aumenta de izquierda a derecha.

8. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se estudió la participación de ACS1 en la regulación de los GNPRP en *A. thaliana*, a partir de los resultados mostrados se pueden deducir las siguientes conclusiones:

- La regulación de GNPRP en presencia de ACS1 es a nivel transcripcional.
- Sólo un máximo de 22 GNPRP comparten un TFBS sobrerrepresentado, MYBS1.
- El motivo TCTTYTTCYTC, no descrito, se encontró en los 28 GNPRPR.
- Las regiones promotoras utilizadas permiten la expresión del reportero en las condiciones analizadas, sin embargo, no llevan las regiones regulatorias necesarias para su represión por ACS1.
- Las mutantes *spc1-2* y *clb5-1* están afectadas en la acumulación de ribosomas del plástido, ya que carecen de rRNAs plastídicos.

9. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados de este trabajo las perspectivas se orientan en dos direcciones

Una a dirigir el estudio de una forma más completa, debido a las deficiencias presentadas en este trabajo, se requiere de una mejor evaluación experimental de los ERC presentes en las regiones promotoras de los GNPRP que sean responsables a la respuesta ACS1, para esto sería necesario realizar distintas construcciones de las regiones regulatorias que involucren ERC presentes en las regiones codificantes o en dirección 3' de GNPRP.

La otra a dirigir el estudio para entender si la regulación transcripcional de los GNPRP en las mutantes de *ZDS* se debe a cambios epigenéticos, podría ser mediante el análisis de metilación de estas regiones regulatorias, o con el análisis de la modificación de las histonas con el uso de la técnica CHIP.

10. METODOLOGÍA

10.1 Condiciones de crecimiento

Los experimentos se realizaron con plántulas de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) del ecotipo Columbia 0 de tipo silvestre y de mutantes *pds3*, y *spc1-2* en fondo genético de Columbia 0, además de la mutante *clb5-1* (alélica a *spc1-2*) en fondo genético Lansberg Erecta (ver **tabla A1**). Para su crecimiento en condiciones estériles, las semillas se lavaron con etanol industrial (96%) por seis min, posteriormente con hipoclorito de sodio al 20% por cuatro min, seguido de tres lavados con agua destilada estéril. Las semillas se estratificaron a 4°C durante tres días en oscuridad. Se crecieron en medio GM 1x, que contiene sales basales de MS 1x (Murashige & Skoog) adicionado con vitaminas de Gamborg (Phytotechnology, No. de catálogo M404, Phytotechnologies Laboratories LLC), suplementado con sacarosa al 1% (p/v) y fitoagar al 0.8% (p/v). Se crecieron a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ luz bajo un fotoperiodo de luz:oscuridad de 16/8hr a 22° C. Las plantas en tierra se crecieron en una mezcla 5:3:2 de turba 3 (Mezcla 3, Sunshine, Sun Gro Horticulture, Agawam, EE. UU.):Vermiculita (Sun Gro Horticulture):perlita (Agrolita, Tlalnepantla, México) con 1.7 kg/m³ de fertilizante Osmocote (Everris, Geldermalsen).

10.2 Análisis de expresión por RT-qPCR

Se extrajo el RNA total de plantas crecidas *in vitro* en medio GM 1x con el primer par de hojas completamente desarrolladas, 10 días para las de tipo silvestre y 18 días de edad para las mutantes albinas, usando TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) según lo recomendado por el fabricante. Se realizaron de tres experimentos biológicos independientes. El RNA total se trató con DNasa I (Promega), se limpió por medio de columna utilizando el RNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research, Orange, CA, EE. UU.). El DNA complementario (cDNA) se sintetizó a partir de 3 μg del RNA tratado con DNasa y luego con la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), se utilizaron oligos específicos para

los genes *RPL4*, *RPL21*, *RPL27*, *RPL34*, *RPS13* y *RPS21* (Tabla 1 del anexo). Los qPCR se realizaron con Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Baltics, UAB, Lituania), en un Light Cycler 480 Roche, a partir de tres réplicas experimentales independientes con duplicados técnicos. El gen de referencia utilizado fue *ACTINA7* (*ACT7*), los datos se graficaron con el método de $2^{\Delta\Delta CT}$.

10.3 Análisis de la actividad de luciferasa

El análisis *in vitro* de luciferasa se realizó utilizando las instrucciones del fabricante (Luciferase Assay System de Promega), en plántulas de 10, 12 y 18 días de edad. Se extrajo proteína total con el buffer de lisis (25 mM Tris-Fosfato, 25mM; Tritón X-100, 1%, glicerol, 10% y DTT, 2mM), se cuantificó la concentración de proteína total, con el reactivo de Bradford (BIO-Rad) y las Unidades Relativas de Luz (RLUs) con un luminómetro de tubo único TITERTEK BERTHOLD FB12, y se graficaron las (RLUs/ μ g de proteína/min).

10.4 Análisis del patrón de expresión de GUS

Para el análisis de la actividad de la enzima reportera β -GLUCORONIDASA (GUS), se colectaron plantas de diferentes días de edad, se fijaron en acetona al 90% por 12 h, se incubaron con la mezcla de reacción (el sustrato X-Gluc (Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónico, sal de ciclohexilamonio, $C_{14}H_{13}BrClNO_7$); Ferrocianuro (50 μ M); Ferricianuro (50 μ M); tritón-X100 0.01%). Después, para su observación, se destiñeron con cuatro lavados de etanol al 70% 15 min cada uno, y se rehidrataron con etanol al 50% y 30%. Se procedió al aclarado del tejido para remover la clorofila con la solución I (0.24 M HCl y metanol 20%) luego se procedió a remover el contenido citoplasmático con la solución II (NaOH 7%, metanol 60%), para finalmente rehidratar las muestras con etanol al 40%, 20% y 10%. Las plantas se montaron en glicerol al 50% con DMSO al 2%.

10.5 Construcciones transcripcionales y transformación genética de *A. thaliana*

Se clonaron las regiones regulatorias río arriba del ATG, que contienen el UTR5' más la región intergénica de los genes *RPL4* (-441 pb), *RPL10* (-466 pb), *RPL21* (-718 pb) y *RPL27* (-904 pb) se amplificaron utilizando oligos flanqueados por los sitios attB para amplificar las secuencias respectivas (**Tabla A1**). Los fragmentos fueron introducidos al vector pDONR/Zeo a través de la reacción BP. Se confirmó la presencia del inserto por PCR, y por secuenciación del inserto en los vectores de entrada. Posteriormente los insertos se introdujeron a los vectores destino binarios; pMDC107, pMDC163, y pBGWL7 con los reporteros GFP, GUS y LUCIFERASA respectivamente, a través de la reacción LR (**Fig. 10.1**).

Posteriormente las construcciones se introdujeron por electroporación a *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58, con *helper plasmid* pGV2206 para finalmente transformar al gameto femenino de plantas de *A. thaliana*, ecotipo Columbia 0 (Col-0) por el método de *floral dip* (Zhang, 2006). La selección de semillas transformadas se realizó con el marcador de resistencia a higromicina 50 µg/mL para los vectores pMDC y metionina sulfoximina 15 µM para el vector pBGWL7. Las plantas resistentes F1 independientes fueron crecidas para seleccionar las que mostraran una segregación de una proporción de resistencia 3:1, lo que indica que sólo tenían una copia del transgen.

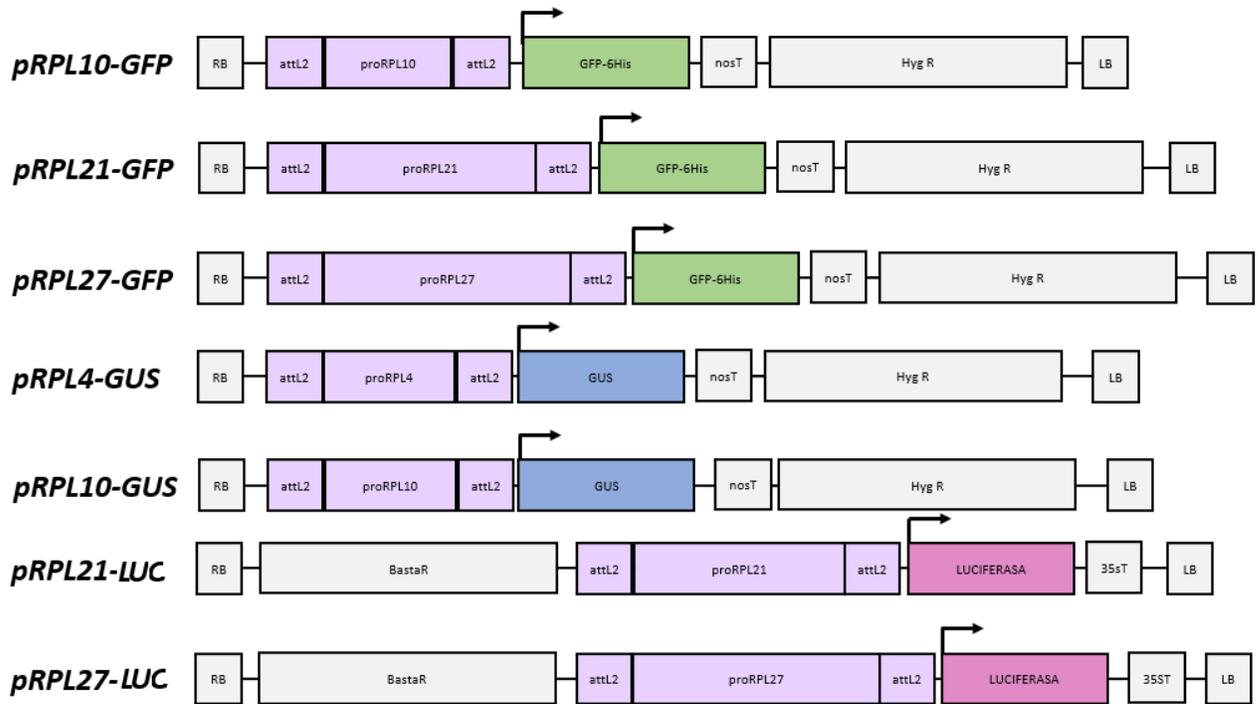


Figura 10.1. Esquema del inserto final / transgen en las plantas transformadas. LB, left border; RB right border, Hyg R; Gen de Resistencia a Hygromicina; Basta R; gen de resistencia a BASTA. attL1 y attL2, sitios att de recombinación presentes en los vectores GATEWAY.

Cada una de las construcciones realizadas (ver en anexos **Figs. A1**, y **A2**) fueron introducidas en plantas de *A. thaliana* del ecotipo Col 0 por el método de *floral dip* y *Agrobacterium tumefaciens*. De cada construcción se seleccionaron líneas independientes resistentes al marcador de resistencia (T1, generación 1). Posteriormente, en la T2 se seleccionaron las líneas que mostraron una segregación de una sola inserción (3:1) (**Fig. 10.2**). De estas líneas se cruzaron con líneas heterocigotas para la mutación de *spc1-2*.

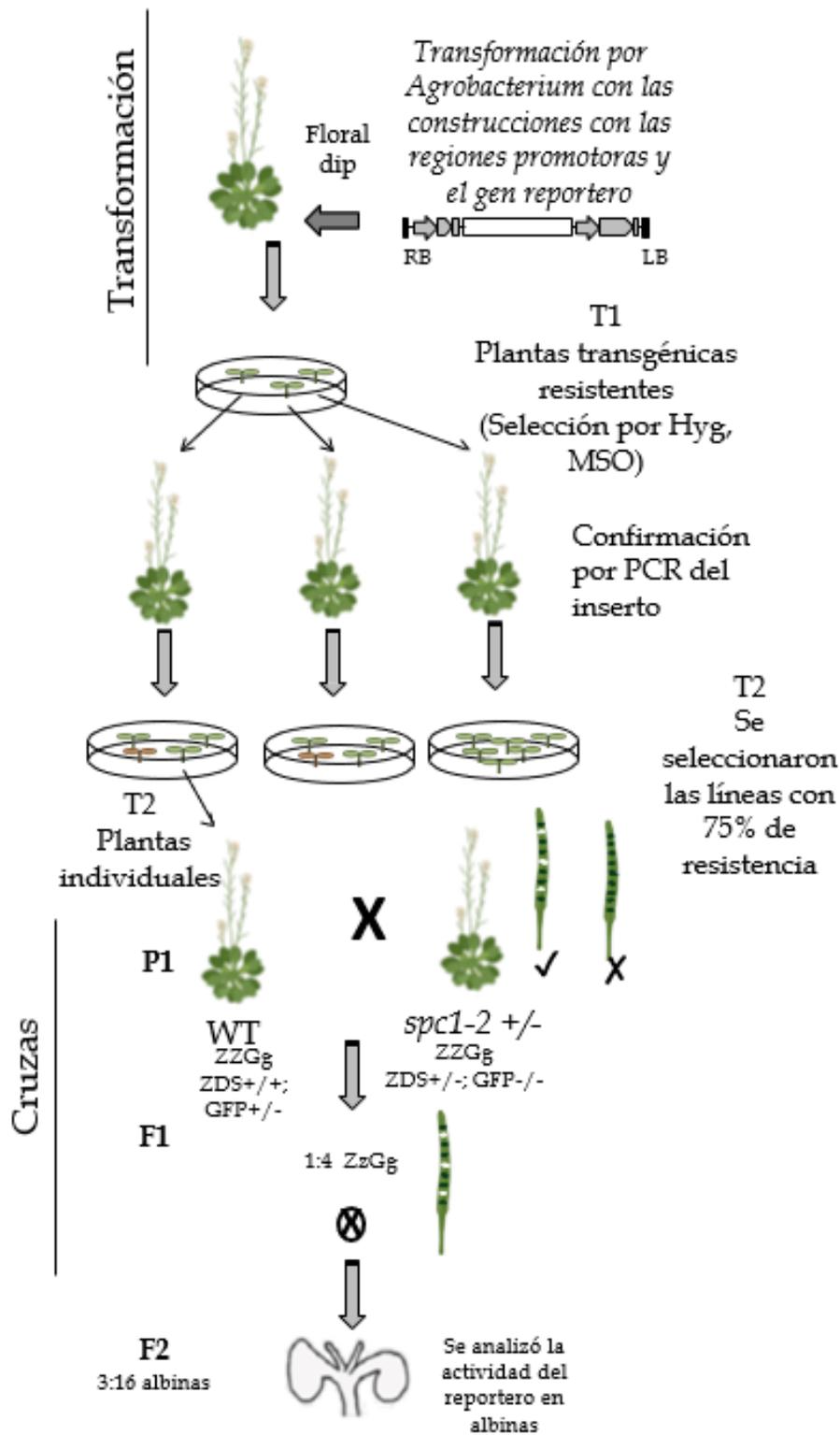


Figura 10.2. Método de transformación de plantas de *A. thaliana*. Procedimiento que se realizó hasta conseguir cruces con la mutante *spc1-2* con el reportero bajo la región promotora de GNPRP. En T₁, el gameto femenino de la planta se debe de transformar con la inoculación de *Agrobacterium* con el gen de interés; posterior a la cosecha de las semillas, se seleccionan las plantas que muestran segregación de una sola inserción en T₁. Posteriormente se crecen plantas de la generación T₂, y de estas líneas se seleccionaron las que tiene un patrón de expresión representativo y se cruzaron con las heterocigotas de *spc1-2*, para analizar la actividad de reportero en las mutantes.

10.6 Análisis *in silico* para la identificación de elementos regulatorios en *cis* comunes en los promotores de GNPRP afectados por ACS1.

10.6.1 Búsqueda de elementos conocidos

Para la búsqueda de motivos conocidos se utilizó AME (*Analysis Of Motif Enrichment* <https://meme-suite.org/meme/tools/ame>). La base de datos de motivos que se utilizó fue JASPAR 2020, Redundant, Plants. El método de puntuación de secuencias fue por puntuación de probabilidades de medias. La prueba de enriquecimiento de motivos fue por prueba exacta de Fisher. Se eligieron los TFBS con un un *e-value* menor a 0.1, y los que se encontrarán en al menos 40% de genes.

10.6.2 Búsqueda de elementos *de novo*

La búsqueda de elementos *de novo* se realizó mediante un análisis de enriquecimiento de secuencias, para encontrar motivos sobrerrepresentados. Para la búsqueda de motivos *de novo* se usó el programa MEME *Multiple Em for Motif Elicitation* (Timothy et al., 2009; <http://meme-suite.org/>). Se analizó 1 Kb río arriba del ATG de cada gen, se utilizaron los parámetros establecidos por default, excepto para el ancho del motivo de 5-13 pb. La corroboración de la especificidad de los motivos con MEME se hizo de manera discriminativa se usaron como control negativo promotores de genes no afectados por ACS1, de acuerdo con el RNAseq de Escobar-Tovar et al., (2020). Para la selección de los motivos, se eligieron los motivos con los valores de *e-value* más bajo, para ver el flujo de trabajo (Fig. 10.3).

11. ANEXOS

Tabla A1. Oligos utilizados en este trabajo.

Oligos utilizados para los qPCRs	
ACT7 maduro Fw	5'- CAG TGT CTG GAT CGG AGG AT-3'
ACT7 maduro Rv	5'- TGA ACA ATC GAT GGA CCT GA-3'
ACT7 primario Fw	5'- GGT GGT TGC ACC GCC AGA GAG AA-3'
ACT7 primario Rv	5'- CTG ATT CAC ACA CAC AAA CAA AAC-3'
cDNA rpl4	5'- CAT TCT TAA GCT TCC TCT GAC C -3'
Rpl4 maduro Fw	ACG CCT AGG ACA CTG AAT C
Rpl4 maduro Rv	GGA TAC ACA CTT ATC TTC TTC
Rpl4 primario Fw	CTG ACT CCT GCG GCT GTG GAG
Rpl4 primario Rv	CGA CAA CAA GCC AGT TCC
cDNA rpl21	5'- AAG ATT TAC TTC TCC AAC TGC A -3'
Rpl21 maduro Fw	GTT GAT GAC CAG ATT GTT CTC
Rpl21 maduro Rv	CTC TGA CCC TTC CGT CTC
Rpl21 primario Fw	CGT CGA AGC TGA ACC GGA GA
Rpl21 primario Rv	CGT ATG ATT CAA CAA GCT CAC
cDNA rpl27	5'- GCA CTC CGG ATT GGC TTC AGC A -3'
Rpl27 maduro Fw	ACG TGG CAC TAA GTT CCA TG
Rpl27 primario Fw	GGT GCT ATC ATT GTT CGT CAA CG
Rpl27 primario Rv	CAG AGC TTG AGA GCT AAA CC
cDNA rpl34	5'- AGC CCG TTT GCC GCT GCT AGG -3'
Rpl34 maduro Fw	5'- GCG TCT CCA TTT TCT GGT TTG T -3'
Rpl34 maduro Rv	5'- TCC TCA TCC TTC TAC GGA AAC C -3'
Rpl34 primario Fw	CTC TCG TCG CCT GTT TCC C
Rpl34 primario Rv	GCC TAA CAC ACG AGA ATA G
cDNA rps13	5'- CTT GGA AAC TTT CTT CTT CCC -3'
Rps13 maduro Fw	5'- CAC TCC CAA TAA GCA GAG TCT A -3'
Rps13 maduro Rv	5'- GAG TTC TTC CTC AGC CAT GTC T -3'
Rps13 primario Fw	GAG GGT GAT CTG GTA ATA CAC
Rps13 primario Rv	CCA AAT CAA AAC AAG AGG AAA CCC
cDNA rps21	5'- AGA AGG TAC ATC TCC ACC AGG -3'
Rps21 maduro Fw	5'- GCG TAA TAA GAA AAG GCG TCC T -3'
Rps21 maduro Rv	5'- AGA AGG TAC ATC TCC ACC AGG -3'
Rps21 primario Fw	GGA CTC GTG ATG CTG CTA AGC G
Rps21 primario Rv	CCC AAC CAA GAA ACA TGA AAC
Oligos utilizados para las construcciones	
Fw rpl4 attb1	5'- G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GGT CAA GAT ACA GAA CAA CGT AGG G -3'
Rv rpl4 attb2	5'- G GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TGT TGT TCC CTG ACC TGA CC -3'
Fw rpl10 attb1	5'- G GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TGT TGT TCC CTG ACC TGA CC -3'
Rv rpl10 attb2	5'- G GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TTT TTT GCT CAG AAG ATG AGG AGA C -3'
Fw rpl21 attb1	5'- G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC CTC ATC ATT CTT CCA CAA TTT CTG -3'
Rv rpl21 attb2	5'- G GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TGT TTT CGA CTG AGA GAG AGC -3'
Fw rpl27 attb1	5'- G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GTC CAT GTC TCT ATA ACT CTA TCC -3'
Rv rpl27 attb2	5'- G GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TGG TAA AAT CAC CAG AGA ATT CG -3'

Tabla A2. GNPRP esenciales para la traducción en el plástido. ID, identificador en base de datos TAIR. Log2 FC (*clb5-1* relativo a *pds3*), representa las veces de cambio (Log2) de los transcritos de cada gen de la mutante *clb5-1*, relativo a la mutante *pds3*. En la siguiente columna es las veces de cambio de *ccd4clb5-1* relativo a *pds3*. Esencial, significa si esos genes son esenciales para la traducción de proteínas en el plástido. SA, Sin Analizar, en negro genes que están codificados en el plastoma, en mayúsculas genes codificados en el núcleo. Información tomada de Escobar et al., (2020) y Tiller y Bock (2014).

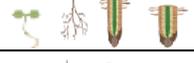
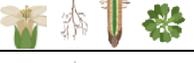
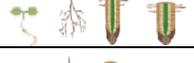
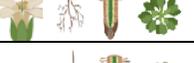
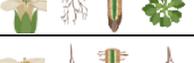
ID	Nombre del gen	Log2 FC (<i>clb5-1</i> relativo a <i>pds3</i>)	Log2 FC (<i>ccd4clb5-1</i> relativo a <i>pds3</i>)	Esencial
AT3G63490	<i>RPL1</i>	-2.04	-1.24	Esencial
ATCG01310	<i>rpl2</i>	0.00	0.00	SA
ATCG00830	<i>rpl2</i>	0.00	0.00	SA
AT2G43030	<i>RPL3</i>	-2.50	-1.75	Esencial
AT1G07320	<i>RPL4</i>	-3.01	-1.74	Esencial
AT4G01310	<i>RPL5</i>	-2.43	-1.70	SA
AT1G05190	<i>RPL6</i>	-2.61	-1.56	Esencial
AT3G44890	<i>RPL9</i>	-1.48	-1.23	SA
AT5G13510	<i>RPL10</i>	-2.41	0.00	Esencial
AT1G32990	<i>RPL11</i>	-2.52	-1.42	No esencial
AT3G27830	<i>RPL12</i>	-2.32	-1.52	SA
AT3G27850	<i>RPL12</i>	-3.16	-1.64	SA
AT1G78630	<i>RPL13</i>	-2.58	-1.69	Esencial
ATCG00780	<i>rpl14</i>	-1.16	-1.17	SA
AT3G25920	<i>RPL15</i>	-2.43	-1.68	SA
ATCG00790	<i>rpl16</i>	0.00	-1.16	SA
AT3G54210	<i>RPL17</i>	-1.87	-1.33	SA
AT1G48350	<i>RPL18</i>	-2.40	-1.53	Esencial
AT5G47190	<i>RPL19</i>	-2.32	-1.59	SA
AT4G17560	<i>RPL19</i>	-2.23	-1.46	SA
ATCG00660	<i>rpl20</i>	0.00	0.00	Esencial
AT1G35680	<i>RPL21</i>	-3.11	-1.81	Esencial
ATCG00810	<i>rpl22</i>	0.00	-1.05	Esencial
ATCG01300	<i>rpl23</i>	-2.15	-1.73	Esencial
ATCG00840	<i>rpl23</i>	-2.15	-1.73	Esencial

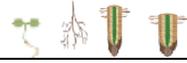
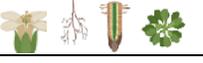
AT5G54600	RPL24	-1.64	-1.14	No esencial
AT5G40950	RPL27	-3.08	-1.71	Esencial
AT2G33450	RPL28	-1.55	-1.03	Esencial
AT5G65220	RPL29	-2.92	-1.59	SA
AT1G75350	RPL31	-1.99	-1.44	Esencial
ATCG01020	<i>rpl32</i>	-1.91	-2.04	Esencial
ATCG00640	<i>rpl33</i>	-1.02	0.00	No esencial
AT1G29070	RPL34	-4.07	-1.23	SA
AT2G24090	RPL35	-1.92	-1.53	Esencial
ATCG00760	<i>rpl36</i>	-1.64	-1.36	No esencial
AT3G56910	PSRP5	-2.51	-1.50	<i>Knockdown viable</i>
AT5G17870	PSRP6	-5.97	-1.33	No esencial
AT5G30510	RPS1	-1.74	-1.34	<i>Knockdown viable</i>
ATCG00160	<i>rps2</i>	-1.80	-1.46	Esencial
ATCG00800	<i>rps3</i>	-1.11	-1.11	Esencial
ATCG00380	<i>rps4</i>	-2.68	-2.34	Esencial
AT2G33800	RPS5	-2.07	-1.75	Esencial
AT1G64510	RPS6	-2.57	-1.67	SA
ATCG00900	<i>rps7</i>	-1.21	-1.47	SA
ATCG01240	<i>rps7</i>	-1.21	-1.47	SA
ATCG00770	<i>rps8</i>	-2.30	-1.24	SA
AT1G74970	RPS9	-2.62	-1.58	Esencial
AT3G13120	RPS10	-2.44	-1.35	SA
ATCG00750	<i>rps11</i>	-1.44	-1.28	SA
ATCG00905	<i>rps12</i>	0.00	-1.03	SA
ATCG01230	<i>rps12</i>	0.00	-1.03	SA
ATCG00065	<i>rps12</i>	0.00	0.00	SA
AT5G14320	RPS13	-2.81	-1.63	Esencial
ATCG00330	<i>rps14</i>	0.00	0.00	Esencial
ATCG01120	<i>rps15</i>	-1.02	0.00	No esencial
ATCG00050	<i>rps16</i>	0.00	0.00	Esencial
AT1G79850	RPS17	-1.81	-1.09	No esencial
ATCG00650	<i>rps18</i>	-1.12	-1.01	Esencial
ATCG00820	<i>rps19</i>	0.00	0.00	SA
AT3G15190	RPS20	-1.76	-1.24	Esencial
AT3G27160	RPS21	-3.03	-1.81	No esencial
AT3G52150	PSRP2	0.00	-1.57	<i>Knockdown viable</i>
AT1G68590	PSRP3-1	-2.94	-1.76	No esencial
AT2G38140	PSRP4	-1.74	-1.11	<i>Knockdown viable</i>

Tabla A3. Tamaños de los rRNAs en plantas (Bieri et al., 2017 y Waltz et al., 2020). Plasto rRNAs, RNAs ribosomales que corresponden al plástido; Mito rRNAs, RNAs ribosomales que corresponden a la mitocondria; Cito rRNAs, RNAs ribosomales que corresponden al ribosoma del citoplasma.

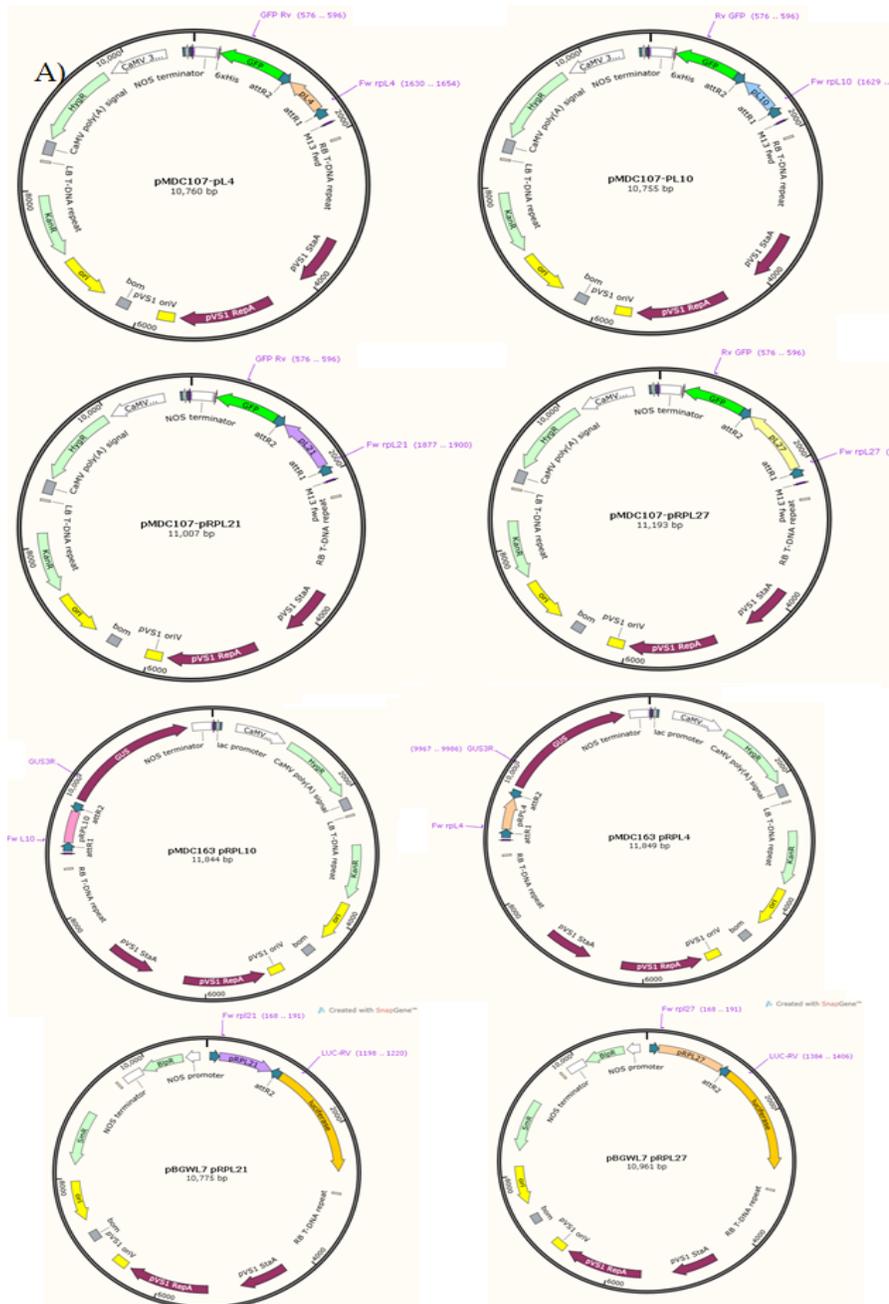
	Plasto rRNAs			Mito rRNAs		Cito rRNAs	
	rRNA	Nombre en el gel	longitud de nt	rRNA	longitud de nt	rRNA	longitud de nt
SSU	16s	16s	1500	18s	1,935	18s	1800
LSU	23sA	23sHB3	500	26s	3,169	25s	3376
	23sB	23sHB1	1200	5s	118	5.8s	161
	23sC	23sHB2	1100				
	4.5s	4.5s	100				
	5s	5s	120				

Tabla A4. Líneas generadas en el presente trabajo. T1 se refiere a la generación 1; T2 generación T2; T3 generación 3. X^2 Valor que resultó de la prueba de ji cuadrado, en rojo se marcan los valores que se rechazan, por sobrepasar el valor de α . H_0 , se refiere a si se acepta o se rechaza la hipótesis nula al valor esperado de resistencia al marcador en cada línea generada. En T3 se analizaron los patrones de expresión de las líneas, y en dibujos se muestra dónde se mostró actividad del reportero. En la columna de cruces; - sin cruza para la mutante; + línea que sí cuenta con la cruza con la mutante señalada en la columna.

<i>pRPL10:GFP</i>	L1	90.8	10.8291	rechaza		-	-
	L2	77.8	0.5840	acepta		-	-
	L3	80.8	2.0262	acepta		-	-
	L3r2	82.3	3.1108	rechaza		-	-
	L6	79.7	1.5424	acepta		-	-
	L9	77.8	0.4046	acepta		-	-
	L10	77.7	2.1354	acepta		-	-
	L11	98.8	14.8818	rechaza		-	-
<i>pRPL21:GFP</i>	L1	79.7	1.1662	acepta		-	-
	L3	76.8	1.1546	acepta		-	-
	L20	0.7	184.2765	rechaza		-	-
	L21	77.1	0.2628	acepta		-	+
	L22	72.9	0.4578	acepta		-	-
	L23	79.9	1.2240	acepta		-	-
	L24	92.3	11.7285	rechaza		-	-
	L26	73.4	1.6896	acepta		-	-
	L27	74.2	0.4302	acepta		-	+
	L28	74.5	2.8427	rechaza		-	-
	L30	71.7	1.1512	acepta		-	-
	L31	73.7	0.0371	acepta		-	-
	L33	74.1	0.2856	acepta		-	-
	L40	74.9	0.1232	acepta		-	-
	L41	80.8	2.0262	acepta		-	+
	L43	75.2	0.2424	acepta		-	-
L47	73.3	1.4977	acepta		-	-	

	L48	68.7	0.7935	acepta		-	-
	L51	90.2	9.9512	rechaza		-	-
	L50	66.7	1.1667	acepta		-	-
<i>pRPL27:GFP</i>	L3r2	81.6	2.1780	acepta		-	+
	L5	0.0	225.0000	rechaza		-	-
	L7r2	73.0	1.2110	acepta		+	+
	L8r2	81.4	1.7078	acepta		-	+
	L11	75.9	0.1511	acepta		-	-
	L25	66.0	90.3600	rechaza		-	-
	L35	68.5	2.4753	acepta		-	-
<i>pRPL21:LUC</i>	L2	0.0	112.5000	rechaza		-	-
	L10	71.1	0.9558	acepta		-	+
	L11	79.0	1.1662	rechaza		-	-
	L14	100.0	25.0000	rechaza		-	-
	L19	89.6	4.0833	rechaza		-	-
	L21	81.4	1.7078	acepta		-	-
	L23	0.0	112.5000	rechaza		-	-
	L24	71.7	1.1512	acepta		-	+
	L26	80.0	0.5500	acepta		-	-
	L27	73.7	0.0371	acepta		-	+
L3	0.0	187.5000	rechaza	-		-	
<i>pRPL27:LUC</i>	L6	0.0	187.5000	rechaza		-	-
	L20	0.0	187.5000	rechaza		-	-
	L24	0.0	187.5000	rechaza		-	-
	L25	0.0	187.5000	rechaza		-	-

	L28	0.0	187.5000	rechaza		-	-
	L31	62.6	4.5761	rechaza		+	+
	L32A	69.7	0.6441	Acepta		-	+
	L33	62.9	3.3485	rechaza		-	-
	L34	51.4	12.9180	rechaza		-	-
	L35	58.1	12.0024	rechaza		-	-
	L52	80.0	0.5500	Acepta		-	+



B)

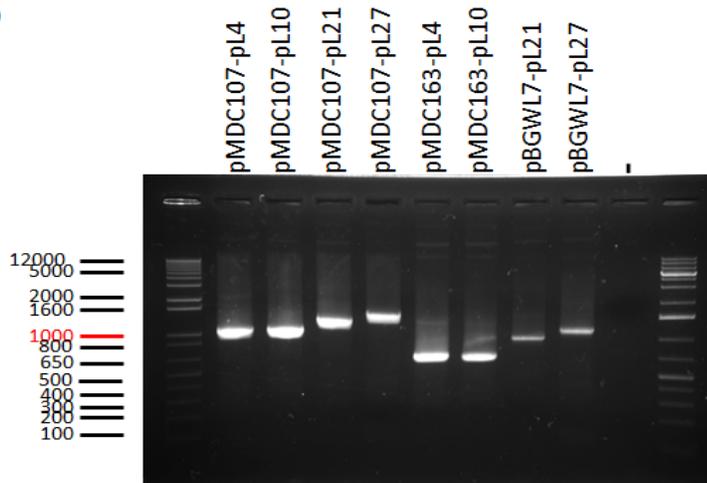


Figura A1. PCR de confirmación de los vectores destino, con el inserto de interés. En el panel A se muestran los mapas de los vectores destino con la región clonada de interés ya insertada. B) el PCR de confirmación, se amplificó con oligos *fw* que corresponden al inserto, marcados en los mapas de los vectores, y el oligo *Rv* que permite amplificar desde el gen reportero. En la tabla se muestran los tamaños esperados de cada amplicón por vector.

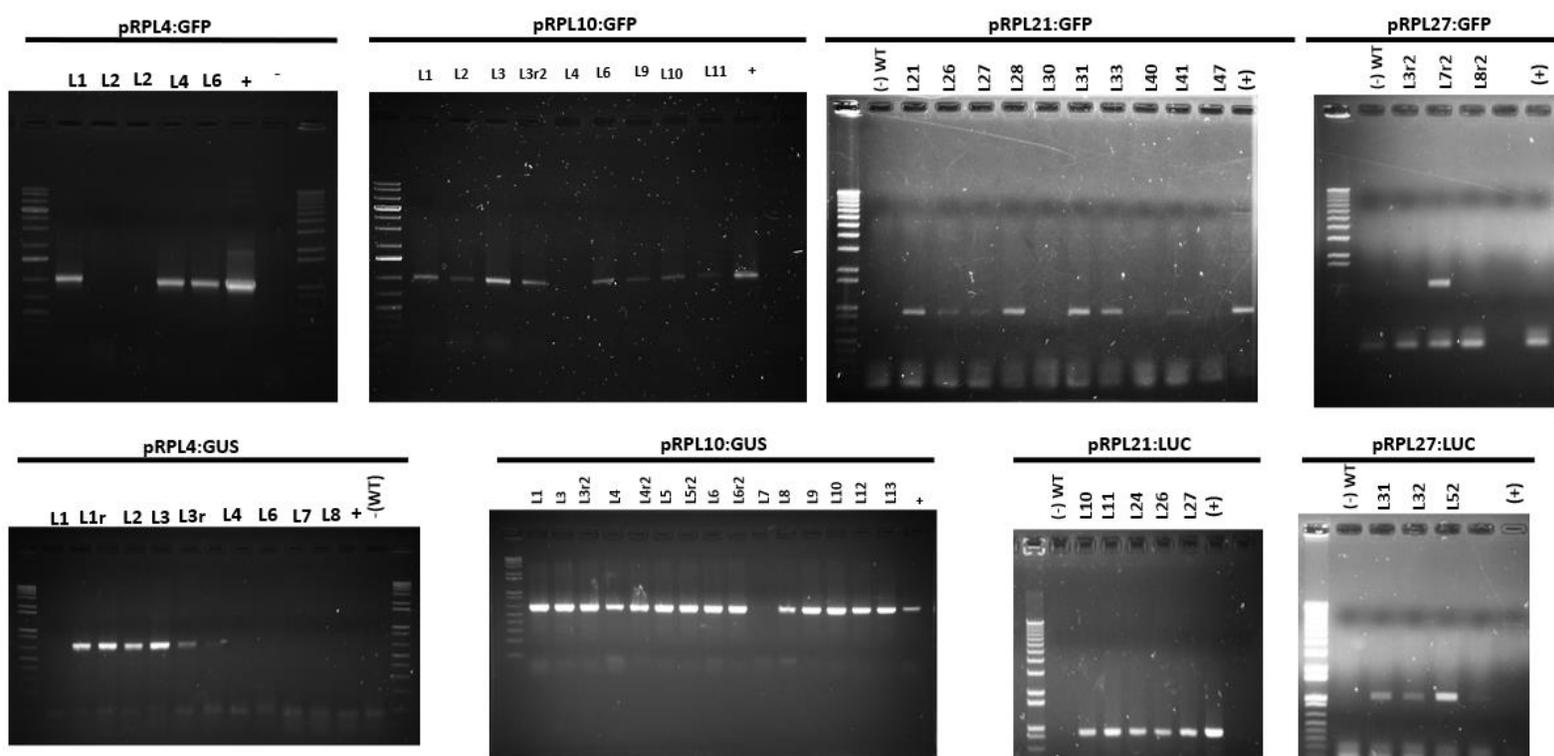


Figura A2. confirmación de PCR de la presencia del transgen en las plantas resistentes al marcador de selección. Los controles positivos son los vectores destino confirmados que poseen el inserto, y el negativo plantas silvestres no transformadas.

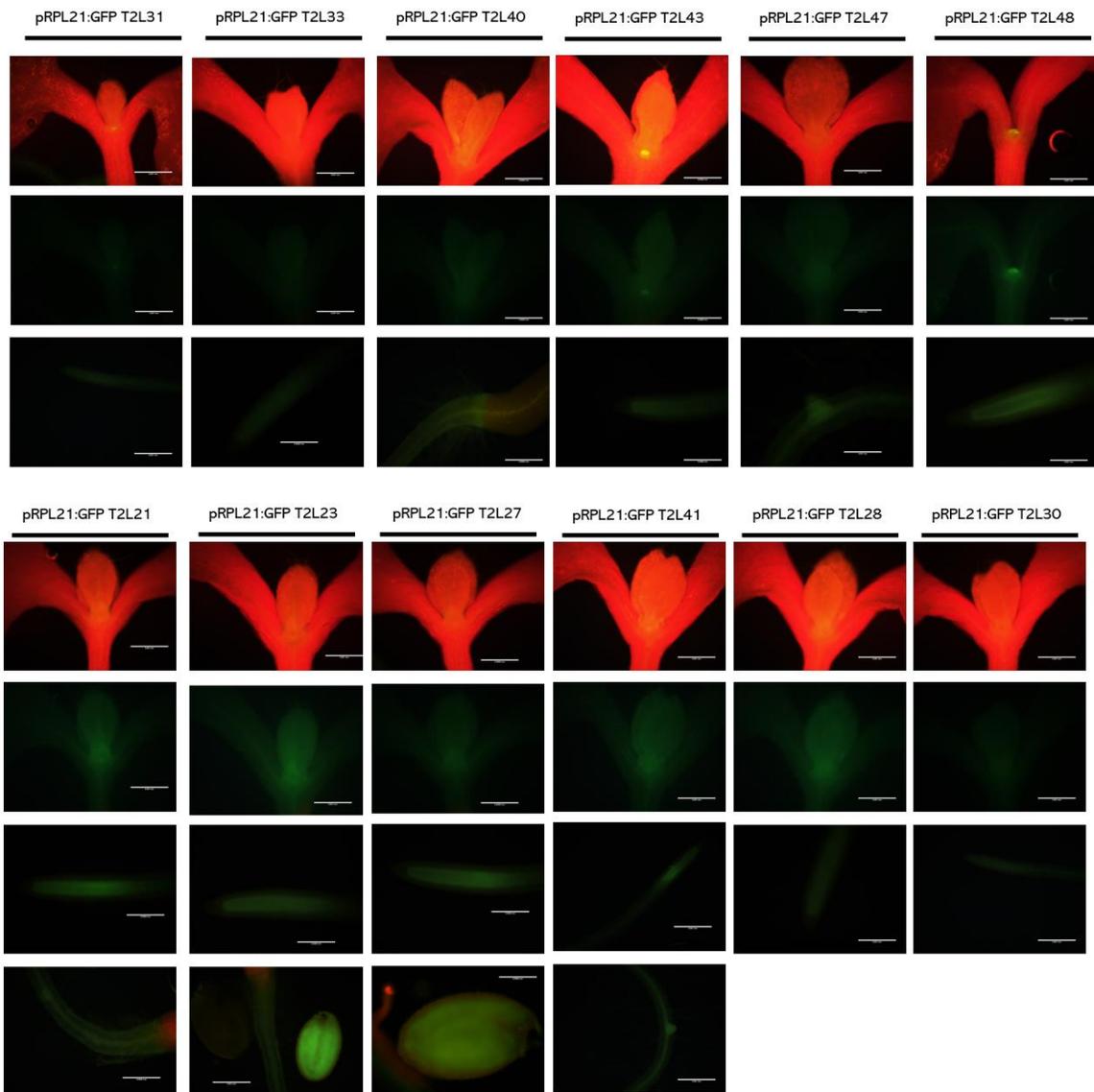


Figura A3. Patrón de expresión de *RPL21* de todas las líneas reporteras de *pRPL21:GFP* generadas en este trabajo.

Código de nucleótidos IUPAC

A: Adenina

C: Citosina

G: Guanine

T: Timina

R: A o G

Y: C o T

S: G o C

W: A o T

K: G o T

M: A o C

B: C o G o T

D: A o G o T

H: A o C o T

V: A o C o G

N: cualquier base

12. BIBLIOGRAFÍA

Achard, P., Lagrange, T., Zanaty, A., Mache, R. (2003). Architecture and transcriptional activity of the initiator element of the TATA-less RPL21 gene. *The Plant Journal*. 35(6), 743–752. doi:10.1046/j.1365-313x.2003.01843.x

Ameur, A., Zaghlool, A., Halvardson, J., Wetterbom, A., Gyllensten, U., Cavelier, L., Feuk, L. (2011). Total RNA sequencing reveals nascent transcription and widespread co-transcriptional splicing in the human brain. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(12), 1435–1440. doi:10.1038/nsmb.2143

Avendaño-Vázquez A. O., Cordoba E., Llamas E., San Román C., Nisar N., De la Torre S., Ramos-Vega M., Gutiérrez-Nava M. L., Cazzonelli C: I., Pogson B., León P. (2014). An Uncharacterized Apocarotenoid-Derived Signal Generated in ζ -Carotene Desaturase Mutants Regulates Leaf Development and the Expression of Chloroplast and Nuclear Genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 26: (6) 2524-2537. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.123349>

Bailey T.L., Boden M., Buske F.A., Frith M., Grant C.E., Clementi. L, Ren J., Li W.W., Noble W.S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.*202-8. doi: 10.1093/nar/gkp335.

Bisanz-Seyer, C., Li, Y.-F., Seyer, P., Mache, R. (1989). The components of the plastid ribosome are not accumulated synchronously during the early development of spinach plants. *Plant Molecular*. 12(2), 201–211. doi:10.1007/.

Bondino, H. G., & Valle, E. M. (2009). A small intergenic region drives exclusive tissue-specific expression of the adjacent genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Molecular Biology*, 10(1), 95. doi:10.1186/1471-2199-10-95

Booker, J., Auldrige, M., Wills, S., McCarty, D., Klee, H., Leyser, O. (2004). MAX3/CCD7 Is a Carotenoid Cleavage Dioxygenase Required for the Synthesis of a Novel Plant Signaling Molecule. *Current Biology*, 14(14), 1232–1238. doi: 10.1016/j.cub.2004.06.061.

Borello, U., Ceccarelli, E., & Giuliano, G. (1993). Constitutive, light-responsive and circadian clock-responsive factors compete for the different I box elements in plant light-regulated promoters. *The Plant Journal*, 4(4), 611–619. doi:10.1046/j.1365-3113x.1993.04040611.x

Burge, C., Campbell, A. M., & Karlin, S. (1992). Over- and under-representation of short oligonucleotides in DNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(4), 1358–1362. doi:10.1073/pnas.89.4.1358

Byrne, M. E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J. M., Dunham, M., Hudson, A., & Martienssen, R. A. (2000). Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in Arabidopsis. *Nature*, 408(6815), 967–971. doi:10.1038/35050091

Callis, J., Fromm, M., Walbot, V. (1987). Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev.* 1(10), 1183–1200. doi:10.1101/gad.1.10.1183

Castro-Mondragon JA, Rioualen C, Contreras-Moreira B, van Helden J. (2016). RSAT Plants: Motif Discovery in ChIP-Seq Peaks of Plant Genomes. *Methods Mol Biol.* 1482:297-322. doi: 10.1007/978-1-4939-6396-6_19.

Charuvi, D., Kiss, V., Nevo, R., Shimoni, E., Adam, Z., Reich, Z. (2012). Gain and loss of photosynthetic membranes during plastid differentiation in the shoot apex of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(3), 1143–1157. doi:10.1105/tpc.111.094458

Chi W., Feng P., Ma J., Zhang L. (2015). Metabolites and chloroplast retrograde signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. (25), 32–38. doi:10.1016/j.pbi.2015.04.006

Chiang, Y.-H., Zubo, Y. O., Tapken, W., Kim, H. J., Lavanway, A. M., Howard, L., Pilon M., Kieber J. J., Schaller, G. E. (2012). Functional Characterization of the GATA Transcription Factors GNC and CGA1 Reveals Their Key Role in Chloroplast Development, Growth, and Division in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 160(1), 332–348. doi:10.1104/pp.112.198705

Chitwood, D. H., Nogueira, F. T. S., Howell, M. D., Montgomery, T. A., Carrington, J. C., Timmermans, M. C. P. (2009). Pattern formation via small RNA mobility. *Genes & Development*, 23(5), 549–554. doi:10.1101/gad.1770009

Chotewutmontri, P., Barkan, A. (2016). Dynamics of Chloroplast Translation during Chloroplast Differentiation in Maize. *PLOS Genetics*. 12(7), 81-106. doi:10.1371/journal.pgen.12(7), 81-106. doi:10.1371/journal.pgen.

Coego, A., Brizuela, E., Castillejo, P., Ruíz, S., Koncz, C., del Pozo, J. C. Piñero M., Jarillo A. J., Paz-Ares J., León J., Transplanta Consortium. (2014). The TRANSPLANTA collection of Arabidopsis lines: a resource for functional analysis of transcription factors based on their conditional overexpression. *The Plant Journal*, 77(6), 944–953. doi:10.1111/tpj.12443

Contreras-Moreira B, Castro-Mondragon JA, Rioualen C, Cantalapiedra CP, van Helden J. (2016). RSAT Plants Motif Discovery Within Clusters of Upstream Sequences in Plant Genomes. *Methods Mol Biol*. 1482:279-95. doi:10.1007/978-1-4939-6396-6_18.

Czarnecki O., Gläßer C., Chen J., Mayer K., F. X.; Grimm, B. (2012). Evidence for a Contribution of ALA Synthesis to Plastid-To-Nucleus Signaling. *Frontiers in Plant Science*, 3. doi:10.3389/fpls.2012.00236

D'Alessandro S., Ksas, B., Havaux, M. (2018). Decoding β -cyclocitral-mediated retrograde signaling reveals the role of a detoxification response controlled by SCL14 and ANAC102 in plant tolerance to photooxidative stress. *The Plant Cell*, tpc.00578.2018. doi:10.1105/tpc.18.00578

D'haeseleer. P. (2006). What are DNA sequence motifs? *Nature Biotechnology*. 24(4):423-5. doi: 10.1038/nbt0406-423.

Dalal V., Dagan S., Friedlander G., Aviv E., Bock R., Charuvi D., Reich Z., Adam Z. (2018). Transcriptome analysis highlights nuclear control of chloroplast development in the shoot apex. *Scientific Reports* volume 8: 8881.

Du, F., Guan, C., Jiao, Y. (2018). Molecular Mechanisms of Leaf Morphogenesis. *Molecular Plant*. 11(9):1117-1134. doi: 10.1016/j.molp.2018.06.006.

Dyall, S. D. (2004). Ancient Invasions: From Endosymbionts to Organelles. *Science*, 304(5668), 253–257. doi:10.1126/science.1094884

Ellis, R.J. (1970). Further similarities between chloroplast and bacterial ribosomes. *Planta* 91, 329–335. <https://doi.org/10.1007/BF00387506>

Emami, S., Arumainayagam, D., Korf, I., Rose, A.B. (2013). The effects of a stimulating intron on the expression of heterologous genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnol. J.* 11: 555–563.

Escobar-Tovar, L., Sierra, J., Hernández-Muñoz, A., McQuinn, R. P., Mathioni, S., Cordoba, E., Francs-Small C. C., Meyers M. C., Pogson B., León, P. (2020). Deconvoluting apocarotenoid-mediated retrograde signaling networks regulating plastid translation and leaf development. *The Plant Journal*. 105(6):1582-1599. doi: 10.1111/tpj.15134.

Estavillo G.M., Crisp P.A., Pornsiriwong W., Wirtz M., Collinge D., Carrie C., Giraud E., Whelan J., David P., Javot H. (2011). Evidence for

a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high light signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*. 23(11):3992-4012. doi: 10.1105/tpc.111.091033.

Fitter, D.W., Martin, D.J., Copley, M.J., Scotland, R.W., and Langdale, J.A. (2002). GLK gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species. *Plant J*. 31: 713–727.

Franco-Zorrilla, J. M., López-Vidriero, I., Carrasco, J. L., Godoy, M., Vera, P., Solano, R. (2014). DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(6), 2367–2372. doi:10.1073/pnas.1316278111

Fristedt R, Williams-Carrier R, Merchant SS, Barkan A. (2014). A thylakoid membrane protein harboring a DnaJ-type zinc finger domain is required for photosystem I accumulation in plants. *J Biol Chem*. 2014 Oct 31;289(44):30657-30667. doi: 10.1074/jbc.M114.587758.

Gaidatzis, D., Burger, L., Florescu, M., Stadler, M. B. (2015). Analysis of intronic and exonic reads in RNA-seq data characterizes transcriptional and post-transcriptional regulation. *Nature Biotechnology*, 33(7), 722–729. doi:10.1038/nbt.3269

Gallegos J. E., Rose A. B. (2017). Intron DNA Sequences Can Be More Important Than the Proximal Promoter in Determining the Site of Transcript Initiation. *The Plant Cell*. 29 (4) 843-853; DOI: 10.1105/tpc.17.00020

Gupta S., Stamatoyannopoulos J., Bailey T.L., Noble W. S. (2007). Quantifying similarity between motifs. *Genome Biology*, 8(2): R24. DOI: 10.1186/gb-2007-8-2-r24

Gutiérrez, J. C., Amaro, F., Martín-González, A. (2015). Heavy metal whole-cell biosensors using eukaryotic microorganisms: an updated

critical review. *Frontiers in Microbiology*, 6.
doi:10.3389/fmicb.2015.00048

Hanson, M. R., Köhler, R. H. (2001). GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 52(356), 529–539.
doi:10.1093/jexbot/52.356.529

Harrak, H., Lagrange, T., Bisanz-Seyer, C., Lerbs-Mache, S., Mache, R. (1995). The expression of nuclear genes encoding plastid ribosomal proteins precedes the expression of chloroplast genes during early phases of chloroplast development. *Plant Physiology*, 108(2), 685–692.
doi:10.1104/pp.108.2.685

Hendriks, G.-J., Gaidatzis, D., Aeschmann, F., Großhans, H. (2014). Extensive Oscillatory Gene Expression during *C. elegans* Larval Development. *Molecular Cell*, 53(3), 380–392.
doi:10.1016/j.molcel.2013.12.013

Hieno A, Naznin HA, Hyakumachi M, Sakurai T, Tokizawa M, Koyama H, Sato N, Nishiyama T, Hasebe M, Zimmer AD, Dang D, Reski R, Rensing S, Obokata J, Yamamoto YY. (2014). PPDB: plant promoter database version 3.0. *Nucleic Acids Res* 42, 1188-1192. doi: 10.1093/nar/gkt1027.

Hirayama, T., Shinozaki, K. (2007). Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends in Plant Science*, 12(8), 343–351.
doi:10.1016/j.tplants.2007.06.013

Hou X., Rivers J., León P., McQuinn R.P., Pogson B.J. (2016). Synthesis and Function of Apocarotenoid Signals in Plants. *Trends in Plant Science*. 21(9):792-803. doi: 10.1016/j.tplants.2016.06.001.

Husbands, A. Y., Benkovics, A. H., Nogueira, F. T. S., Lodha, M., Timmermans, M. C. P. (2015). The ASYMMETRIC LEAVES Complex

Employs Multiple Modes of Regulation to Affect Adaxial-Abaxial Patterning and Leaf Complexity. *The Plant Cell*, 27(12), 3321–3335. doi:10.1105/tpc.15.00454

Huttly A. (2009). Cap. 3. Reporter genes. En *Methods in Molecular Biology. Transgenic Wheat, Barley and Oats*. pp 39-69. doi: 10.1007/978-1-59745-379-0_3

Iratni, R., Diederich, L., Harrak, H., Bligny, M., Lerbs-Mache, S. (1997). Organ-specific transcription of the *rrn* operon in spinach plastids. *Journal of Biological Chemistry*, 272(21), 13676–13682. doi:10.1074/jbc.272.21.13676

Isogawa A., Fuchs R.P., Fujii S. (2018). Versatile and efficient chromatin pull-down methodology based on DNA triple helix formation. *Sci Rep* 8; 5925.

Iwakawa H., Iwasaki M., Kojima S., Ueno Y., Soma T., Tanaka H., Semiarti E., Machida Y., Machida C. (2007). Expression of the *ASYMMETRIC LEAVES2* gene in the adaxial domain of Arabidopsis leaves represses cell proliferation in this domain and is critical for the development of properly expanded leaves. *Plant J.* 51: 173–184.

Jarvis P., López-Juez E. (2013). Biogenesis and homeostasis of chloroplast and other plastids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 14(12):787-802. doi: 10.1038/nrm3702.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*. 6(13):3901-3907. doi: 10.1002/j.1460-2075.1987.tb02730.x.

Keeling, P. J. (2010). The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 365(1541):729-48. doi: 10.1098/rstb.2009.0103

Kerstetter, R. A., Bollman, K., Taylor, R. A., Bomblies, K., & Poethig, R. S. (2001). KANADI regulates organ polarity in Arabidopsis. *Nature*, 411(6838), 706–709. doi:10.1038/35079629

Koo, J., Kim, Y., Kim, J., Yeom, M., Lee, I. C., Nam, H. G. (2007). A GUS/Luciferase Fusion Reporter for Plant Gene Trapping and for Assay of Promoter Activity with Luciferin-Dependent Control of the Reporter Protein Stability. *Plant and Cell Physiology*, 48(8), 1121–1131. doi:10.1093/pcp/pcm081

Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T.C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R., and Chory, J. (2007). Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science*. 316: 715-719. 316(5825):715-9. doi/10.1126/science.1140516

Koyama T., Masahiko Furutani, Masao Tasaka, Masaru Ohme-Takagi. (2007). TCP Transcription Factors Control the Morphology of Shoot Lateral Organs via Negative Regulation of the Expression of Boundary-Specific Genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 19 (2) 473-484. doi:10.1105/tpc.106.044792

Kressler, D., Hurt, E., Baßler, J. (2010). Driving ribosome assembly. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research*, 1803(6), 673–683. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.10.009

Lagrange T, Franzetti B, Axelos M, Mache R, Lerbs-Mache S. (1993). Structure and expression of the nuclear gene coding for the chloroplast ribosomal protein L21: developmental regulation of a housekeeping gene by alternative promoters. *Mol Cell Biol*. 13(4):2614-22. doi: 10.1128/mcb.13.4.2614-2622.1993.

Lai, X., Stigliani, A., Vachon, G., Carles, C., Smaczniak, C., Zubieta, C., Kaufmann K., Parcy, F. (2018). Building transcription factor binding site models to understand gene regulation in plants. *Molecular Plant*. doi:10.1016/j.molp.2018.10.010

Leffel S. M., Mabon S. A., Stewart C. N. (1997). Applications of Green Fluorescent Protein in Plants. *BioTechniques*, 23(5), 912–918. doi:10.2144/97235bi01

Lerbs-Mache, S. (2000). Regulation of rDNA transcription in plastids of higher plants. *Biochimie*, 82(6-7), 525–535. doi:10.1016/s0300-9084(00)00607-6

Lescot M., Dahais P., Thijs G., Marchal K., Moreau Y., Van de Peer Y., Rouzé, Rombauts S. (2002). PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* Jan 1;30(1):325-327. doi: 10.1093/nar/30.1.325.

Li, H. M. Chiu, C. C. (2010). Protein transport into chloroplasts. *Annual Review of Plant Biology*. 61, 157–180. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112222.

Liang Z, Zhu N., Mai K. K., Liu Z., Tzeng D., Osteryoung K. W., Zhong S., Staehelin L. A., Kanga . (2018). Thylakoid-Bound Polysomes and a Dynamin-Related Protein, FZL, Mediate Critical Stages of the Linear Chloroplast Biogenesis Program in Greening Arabidopsis Cotyledons. *The Plant Cell*. 30: 1476–1495. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00972>

Liu, S., Melonek, J., Boykin, L. M., Small, I., & Howell, K. A. (2013). PPR-SMRs. *RNA Biology*, 10(9), 1501–1510. doi:10.4161/rna.26172

Macleán, D., Jerome, C. A., Brown, A. P. C., Gray, J. C. (2008). Co-regulation of nuclear genes encoding plastid ribosomal proteins by light and plastid signals during seedling development in tobacco and Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 66(5), 475–490. doi:10.1007/s11103-007-9279-z

Martin W., Stoebe B., Goremykin V., Hansmann S., Hasegawa M., Kowallik K.V. (1998). Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature*. 393:162-165. doi: 10.1038/30234.

McConnell, J.R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J., Barton, M.K. (2001). Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. *Nature*. 411, 709–713.

McIntosh KB, Bonham-Smith PC. (2006). Ribosomal protein gene regulation: what about plants? *Canadian Journal of Botany* 84: 342–362. doi.org/10.1139/b06-014

McLeay, R. C., Bailey, T. L. (2010). Motif Enrichment Analysis: a unified framework and an evaluation on ChIP data. *BMC Bioinformatics*. 11(1), 165. doi:10.1186/1471-2105-11-165

Merchante, C., Stepanova, A. N., & Alonso, J. M. (2017). Translation regulation in plants: an interesting past, an exciting present and a promising future. *The Plant Journal*, 90(4), 628–653. doi:10.1111/tpj.13520

Mhamdi, A., Gommers, C. M. M. (2019). Another gun Dismantled: ABSCISIC ACID INSENSITIVE4 is not a target of retrograde signaling. *Plant Physiology*, 179(1), 13–14. doi:10.1104/pp.18.01421

Mitra S., Estrada-Tejedor R., Volke D.C., Phillips M.A., Gershenzon J., Wright L.P. (2021). Negative regulation of plastidial isoprenoid pathway by herbivore-induced β -cyclocitral in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*. 9;118(10):e2008747118. doi: 10.1073/pnas.2008747118.

Mochizuki, N., Brusslan, J. A., Larkin, R., Nagatani, A. Chory, J. (2001). *Arabidopsis* genome uncoupled 5 (*gun5*) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *PNAS*. 98:2053–2058. doi: 10.1073/pnas.98.4.2053.

Mulo P., Pursiheimo S., Hou C-X., Tyystjärvi T., Aro E-M. (2003). Multiple effects of antibiotics on chloroplast and nuclear gene expression. *Functional Plant Biology*. 30(11):1097-1103. doi: 10.1071/FP03149.

Nakamura, M., Tsunoda, T., Obokata, J. (2002). Photosynthesis nuclear genes generally lack TATA-boxes: a tobacco photosystem I gene responds to light through an initiator. *The Plant Journal*, 29(1), 1–10. doi:10.1046/j.0960-7412.2001.01188.x

Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N. C., Pogson, B. J. (2015). Carotenoid Metabolism in Plants. *Molecular Plant*. 8(1), 68–82. doi:10.1016/j.molp.2014.12.007

Nott A., Jung H.J., Koussevitzky S., Chory J. (2006). Plastid-To-Nucleus Retrograde Signaling. *Annual Review of Plant Biology*. 57:739-59. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105310.

Otsuga, D., DeGuzman, B., Prigge, M. J., Drews, G. N., Clark, S. E. (2008). REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. *The Plant Journal*, 25(2), 223–236. doi:10.1111/j.1365-313x.2001.00959.x

Palmiter, R.D., Sandgren, E.P., Avarbock, M.R., Allen, D., Brinster, R.L. (1991). Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *PNAS* 88(2):478-82. doi: 10.1073/pnas.88.2.478.

Porto, M. S., Pinheiro, M. P. N., Batista, V. G. L., dos Santos, R. C., de Albuquerque Melo Filho, P., de Lima, L. M. (2013). Plant Promoters: An Approach of Structure and Function. *Molecular Biotechnology*, 56(1), 38–49. doi:10.1007/s12033-013-9713-1

Priest, H. D., Filichkin, S. A., Mockler, T. C. (2009). *cis*-Regulatory elements in plant cell signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(5), 643–649. doi:10.1016/j.pbi.2009.07.016

Puente P, Wei N, Deng XW. (1996). Combinatorial interplay of promoter elements constitutes the minimal determinants for light and developmental control of gene expression in *Arabidopsis*. *EMBO J* 15:3732–3743. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00743.x>

Ramel F, Birtic S, Ginies C, Soubigou-Taconnat L, Triantaphylide, C, Havaux M. (2012). Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. PNAS. 109(14):5535-40. doi: 10.1073/pnas.1115982109

Ravindran, P., Verma, V., Stamm, P., & Kumar, P. P. (2017). A Novel RGL2-DOF6 Complex Contributes to Primary Seed Dormancy in *Arabidopsis thaliana* by Regulating a GATA Transcription Factor. *Molecular Plant*, 10(10), 1307-1320. doi:10.1016/j.molp.2017.09.004

Reyes-Prieto, A., Weber, A. P. Bhattacharya, D. (2007). The origin and establishment of the plastid in algae and plants. *Annuals Review Genetics*. 41:147-68. doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130134.

Rieu, I., Powers, S. J. (2009). Real-Time Quantitative RT-PCR: design, calculations, and statistics. *The Plant Cell*. 21(4), 1031-1033. doi:10.1105/tpc.109.066001

Roeder, R.G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 21, 327-335.

Romani, I., Tadini, L., Rossi, F., Masiero, S., Pribil, M., Jahns, P., Pesaresi, P. (2012). Versatile roles of *Arabidopsis* plastid ribosomal proteins in plant growth and development. *The Plant Journal*, 72(6), 922-934. doi:10.1111/tpj.12000

Sarojam, R., Sappl, P.G., Goldshmidt, A., Efroni, I., Floyd, S.K., Eshed, Y., Bowman, J.L. (2010). Differentiating *Arabidopsis* shoots from leaves by combined YABBY activities. *Plant Cell*. 22: 2113-2130.

Sato S., Nakamura Y., Kaneko T., Asamizu E., Tabata S. (1999). Complete Structure of the Chloroplast Genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA RESEARCH*. 6(5):283-90. doi: 10.1093/dnares/6.5.283.

Satterlee, J. W., Scanlon, M. J. (2019). Coordination of Leaf Development Across Developmental Axes. *Plants*, 8(10), 433. doi:10.3390/plants8100433

Sormani R., Masclaux-Daubresse C., Daniele-Vedele F., Chardon F. (2011). Transcriptional regulation of ribosome components are determined by stress according to cellular compartments in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 6(12): e28070. doi:10.1371/journal.pone.0028070

Sperling, S. (2007). Transcriptional regulation at a glance. *BMC Bioinformatics*, S2. doi:10.1186/1471-2105-8-s6-s2

Srivastava, R., Rai, K. M., Srivastava, M., Kumar, V., Pandey, B., Singh, S. P., Bag S. K., Singh B. D., Tuli R., Sawant S. V. (2014). Distinct Role of Core Promoter Architecture in Regulation of Light-Mediated Responses in Plant Genes. *Molecular Plant*, 7(4), 626–641. doi:10.1093/mp/sst146

Strand A., Asami T., Alonso J., Ecker J. R., Chory J. (2003). Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of MG-protoporphyrin IX. *Nature*. 421(6918):79-83. doi: 10.1038/nature01204.

Sugiura, M. (1992). The chloroplast genome. *Plant Molecular Biology*. 19:149-168. doi: 10.1007/BF00015612.

Surpin, M., Larkin, R. M., Chory, J. (2002). Signal Transduction between the Chloroplast and the Nucleus. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S327–S338. doi:10.1105/tpc.010446

Swarbreck D., Wilks C., Lamesch P., Berardini T. Z., Garcia-Hernandez M., Foerster H., Li D., Meyer T., Muller R, Ploetz R., Radenbaugh A., Shanker Singh, Vanessa Swing, Christophe Tissier, Peifen Zhang and Eva Huala. (2008). The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Research*. 36: 1009-1014. doi: 10.1093/nar/gkm965.

Tadini L., Mühlhaus T., Schroda M., Masiero S., Pribil M, Rothbart M., Hedtke B., Grimm B., Leister D. (2016). GUN1 Controls Accumulation of the Plastid Ribosomal Protein S1 at the Protein Level and Interacts with Proteins Involved in Plastid Protein Homeostasis. *Plant Physiology*. 170-3; 1817–1830, <https://doi.org/10.1104/pp.15.02033>

Tameshige, T., Fujita, H., Watanabe, K., Toyokura, K., Kondo, M., Tatematsu, K., Okada, K. (2013). Pattern dynamics in adaxial-abaxial specific gene expression are modulated by a plastid retrograde signal during *Arabidopsis thaliana* leaf development. *PLoS Genetics*, 9(7), e1003655. doi:10.1371/journal.pgen.1003655

The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796–815. doi:10.1038/35048692

Thompson, M. D., Jacks, C. M., Lenvik, T. R., Gantt, J. S. (1992). Characterization of *rps17*, *rpl9* and *rpl15*: three nucleus-encoded plastid ribosomal protein genes. *Plant Molecular Biology*, 18(5), 931–944. doi:10.1007/bf00019207

Tian C., Wang Y., Yu H., He J., Wang J., Shi B., Du Q., Provart N., Meyerowitz E. M., Jiao Yuling. (2019). A gene expression map of shoot domains reveals regulatory mechanisms. *Nature Communications*. 10:141. doi: 10.1038/s41467-018-08083-z.

Tiller, N., and Bock, R. (2014). The translational apparatus of plastids and its role in plant development. *Molecular Plant*. 7(7):1105-20. doi: 10.1093/mp/ssu022.

Tiller, N., Weingartner, M., Thiele, W., Maximova, E., Schöttler, M.A. Bock, R. (2012). The plastid-specific ribosomal proteins of *Arabidopsis thaliana* can be divided into non-essential proteins and genuine ribosomal proteins. *The Plant Journal*, 69: 302-316. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04791.x>

Van-Helden, J. (2003). Regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 31(13):3593-6. doi: 10.1093/nar/gkg567

Villain P., Clabault G., Mache R., Zhou D. X. (1994). S1F binding site is related to but different from the light-responsive GT-1 binding site and differentially represses the spinach *rpsl* promoter in transgenic tobacco. *The Journal of Biological Chemistry*. 269 (24),17,16626-16630. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)89435-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)89435-8)

Vothknecht, U. C., Westhoff, P. (2001). Biogenesis and origin of thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1541(1-2), 91-101. doi:10.1016/s0167-4889(01)00153-7

Walter, M., Piepenburg, K., Schottler, M.A., Petersen, K., Kahlau, S., Tiller, N., Drechsel, O., Weingartner, M., Kudla, J. Bock, R. (2010). Knockout of the plastid RNase E leads to defective RNA processing and chloroplast ribosome deficiency. *Plant Journal*. 64, 851-863. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04377.x.

Waltz, F., Soufari, H., Bochler, A., Giegé, P., Hashem, Y. (2020). Cryo-EM structure of the RNA-rich plant mitochondrial ribosome. *Nature Plants*. doi:10.1038/s41477-020-0631-5

Wasserman, W. W., Sandelin, A. (2004). Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nature Reviews Genetics*, 5(4), 276-287. doi:10.1038/nrg1315

Waters M. T., Wang P., Korkaric M., Capper R. G., Saunders N. J., Langdale J. A. (2009). GLK Transcription Factors Coordinate Expression of the Photosynthetic Apparatus in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 21 (4) 1109-1128; doi: 10.1105/tpc.108.065250

Waters, M. T., Gutjahr, C., Bennett, T., Nelson, D. C. (2017). Strigolactone Signaling and Evolution. *Annual Review of Plant Biology*. 68(1), 291-322. doi:10.1146/annurev-arplant-042916-040925

Wu G. Z. Bock R. (2021). GUN control in retrograde signaling: How GENOMES UNCOUPLED proteins adjust nuclear gene expression to plastid biogenesis. *The Plant Cell*. 33:3,457–474. <https://doi.org/10.1093/plcell/koaa048>

Wu G.Z., Meyer E.H., Richter A.S., Schuster M., Ling Q., Schöttler M.A., Walther D., Zoschke R., Grimm B., Jarvis R.P., Bock R. (2019). Control of retrograde signalling by protein import and cytosolic folding stress. *Nature Plants*. 5(5):525-538. doi: 10.1038/s41477-019-

Wu Guo-Zhang, Etienne H. Meyer, Si Wu, Ralph Bock. (2019). Extensive Posttranscriptional Regulation of Nuclear Gene Expression by Plastid Retrograde Signals. *Plant Physiology*. 180 (4) 2034-2048; DOI: 10.1104/pp.19.00421

Xiao Y., Savchenko T., Baidoo E., Chehab W., Hayden D., Tolstikov V., Corwin J., Kliebenstein D., Keasling J., Dehesh K. (2012). Retrograde Signaling by the Plastidial Metabolite MEcPP Regulates Expression of Nuclear Stress-Response Genes. *Cell*.149:7, 1525 - 1535. doi: 10.1016/j.cell.2012.04.038.

Xie, M., Chen, H., Huang, L., O'Neil, R. C., Shokhirev, M. N., Ecker, J. R. (2018). A B-ARR-mediated cytokinin transcriptional network directs hormone cross-regulation and shoot development. *Nature Communications*, 9(1). doi:10.1038/s41467-018-03921-6

Yamamoto, Y. Y., Ichida, H., Abe, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Obokata, J. (2007). Differentiation of core promoter architecture between plants and mammals revealed by LDSS analysis. *Nucleic Acids Research*, 35(18), 6219–6226. doi:10.1093/nar/gkm685

Yamamoto, Y. Y., Ichida, H., Matsui, M., Obokata, J., Sakurai, T., Satou, M., Seki M., Shinozaki K., Abe, T. (2007). Identification of plant promoter constituents by analysis of local distribution of short sequences. *BMC Genomics*, 8(1), 67. doi:10.1186/1471-2164-8-67

Yamamoto, Y. Y., Yoshitsugu, T., Sakurai, T., Seki, M., Shinozaki, K., Obokata, J. (2009). Heterogeneity of *Arabidopsis* core promoters revealed by high-density TSS analysis. *The Plant Journal*, 60(2), 350–362. doi:10.1111/j.1365-3113x.2009.03958.x

Yang X., Cara M. Winter, Xiuying Xia, Susheng Gan. (2011). Genome-wide analysis of the intergenic regions in *Arabidopsis thaliana* suggests the existence of bidirectional promoters and genetic insulators. *Current Topics in Plant Biology*. Vol. 12. <http://www.hort.cornell.edu/gan/pubs/yangetal2011>.

Yasumura, Y., Moylan, E.C., and Langdale, J.A. (2005). A conserved transcription factor mediates nuclear control of organelle biogenesis in anciently diverged land plants. *Plant Cell* 17: 1894–1907.

Yin, T., Pan, G., Liu, H., Wu, J., Li, Y., Zhao, Z., Fu T., Zhou, Y. (2012). The chloroplast ribosomal protein L21 gene is essential for plastid development and embryogenesis in *Arabidopsis*. *Planta*, 235(5), 907–921. doi:10.1007/s00425-011-1547-0

Zeisel, A., Kostler, W. J., Molotski, N., Tsai, J. M., Krauthgamer, R., Jacob-Hirsch, J., Domany, E. (2014). Coupled pre-mRNA and mRNA dynamics unveil operational strategies underlying transcriptional responses to stimuli. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 529–529. doi:10.1038/msb.2011.62

Zemlyanskaya, E. V., Dolgikh, V. A., Levitsky, V. G., Mironova, V. (2021). Transcriptional regulation in plants: Using omics data to crack the cis-regulatory code. *Current Opinion in Plant Biology*, 63, 102058. doi:10.1016/j.pbi.2021.102058

Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.-S., Niu, Q.-W., Chua, N.-H. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, 1(2), 641–646. doi:10.1038/nprot.2006.97

Zhou D. X., Li Y. F., Rocipon M., Mache R. (1992). Sequence-specific Interaction between S1F, a Spinach Nuclear Factor, and a Negative & Element Conserved in Plastid-related Genes. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol. 267, No. 33, 26, pp. 23515-23519. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)35869-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)35869-1)

Zubo, Y., Blakley, I. C., Franco-Zorrilla, J. M., Yamburenko, M. V., Solano, R., Kieber, J. J., Loraine A. E., Schaller, G. E. (2018). Coordination of Chloroplast Development through the Action of the GNC and GLK Transcription Factor Families. Plant Physiology, pp.00414.2018. doi:10.1104/pp.18.00414