Biblioteca Digital FCEN-UBA

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

PRMT5, un nexo entre el reloj circadiano y el splicing alternativo

Sanchez, Sabrina Elena

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sanchez, Sabrina Elena. (2011). PRMT5, un nexo entre el reloj circadiano y el splicing alternativo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sanchez, Sabrina Elena. "PRMT5, un nexo entre el reloj circadiano y el splicing alternativo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293 Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

PRMT5, UN NEXO ENTRE EL RELOJ CIRCADIANO Y EL SPLICING ALTERNATIVO

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Sabrina Elena Sanchez

Director de tesis: Dr. Marcelo J. Yanovsky Consejero de estudios: Dra. Sara Maldonado

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas Vinculadas a la Agricultura. FAUBA-CONICET.

Buenos Aires, 2011.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
AGRADECIMIENTOS	3
INTRODUCCION	5
Medición biológica del tiempo	6
El reloj circadiano en Arabidopsis thaliana	7
La sincronización del reloj circadiano	15
El reloj circadiano, mucho más que un mecanismo	16
La luz, una señal importante	17
La luz y el desarrollo vegetal	17
La percepción de la luz	18
El control del tiempo a floración	21
Epigenética: otro nivel de regulación	22
La epigenética y el desarrollo en Arabidopsis thaliana	23
OBJETIVOS	26
HIPOTESIS	26
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26
MATERIALES Y METODOS	27
Búsqueda a gran escala de mutantes en A. thaliana	28
Material vegetal y condiciones de crecimiento	29
Experimentos fotomorfogénicos	29
Medición del tiempo a floración	31

Análisis del reloj circadiano en A. thaliana	31
Identificación de la mutación prmt5-5: Clonado posicional	33
Líneas de moscas y ensayos comportamentales	34
Análisis de la expresión por PCR en tiempo real (qPCR)	34
Análisis global: Microarreglos de expresión en A. thaliana	35
Inmunoprecipitación secuencial de la cromatina (Re-ChIP)	36
Detección de distintas isoformas de splicing por PCR radiactiva	37
Construcción de líneas sobre-expresantes (PRR9_B OX)	37
Análisis global: <i>tiling-arrays</i>	39
Análisis bioinformático de las secuencias dadoras de splicing	40
RESULTADOS	41
Búsqueda de mutantes cuyo reloj circadiano se encuentre alterado	42
Caracterización inicial de la mutante	43
Identificación del gen afectado	46
Caracterización del reloj circadiano de la mutante	51
Análisis a gran escala: cambios de expresión globales en la mutante	57
PRMT5 y su relación con <i>PRR9</i>	61
PRMT5 y el <i>splicing</i> alternativo	68
PRMT5 en Drosophila melanogaster	78
DISCUSION	91
PRMT5 y el desarrollo de Arabidopsis thaliana	93
PRMT5 y el reloj circadiano	95
Mecanismo de acción de PRMT5	97
PRMT5 y el <i>splicing</i> alternativo	99
El splicing alternativo y su rol fisiológico en Arabidopsis thaliana	103

<i>Splicing</i> alternativo, ¿un nuevo <i>loop</i> en el reloj circadiano?10	4
El transcriptoma: la convergencia de diversos mecanismos de control10	5
Drosophila melanogaster en comparación con Arabidopsis thaliana10	7
Conclusiones Finales y Perspectivas10	9
REFERENCIAS11	2
APENDICE	0
Tabla 1 13	1
Tabla 2	7
Tabla 3 14	1
Tabla 4 15	1
Tabla 5	3
Tabla 6 15	9
Tabla 7 17	0
Tabla 8 17	2

PRMT5, un nexo entre el Reloj Circadiano y el *Splicing* Alternativo

Resumen

Los cambios producidos diariamente en el ambiente donde se desarrollan los seres vivos proveen señales que modulan su desarrollo y crecimiento. En particular, los relojes circadianos les permiten a los organismos adaptarse y anticiparse a esas fluctuaciones, optimizando su éxito reproductivo. En las plantas, las principales fuentes de sincronización están constituidas por los ciclos de luz-oscuridad y las oscilaciones diarias de la temperatura.

El objetivo de este trabajo es identificar nuevos componentes regulatorios del reloj circadiano. Para ello, se realizó una búsqueda a gran escala de mutantes de *Arabidopsis thaliana*. Como resultado de la misma se aisló una mutante para el gen *PRMT5*. Este locus codifica para una enzima capaz de transferir grupos metilos al aminoácido arginina de otras proteínas. Aquí, se demostró que PRMT5 participa en la regulación de la transcripción, modula el *splicing* alternativo, y forma parte del oscilador central, mediando parte del control que éste ejerce sobre el procesamiento del ARNm prematuro en esa especie vegetal. Luego, se comprobó que el homólogo de PRMT5 presente en *Drosophila melanogaster* participa en el control de la actividad locomotora, una respuesta modulada por el reloj circadiano. Sin embargo, su vínculo con el oscilador central mostró ser más difuso que el observado en plantas. Por otro lado, la actividad de esta proteína en la regulación del *splicing* alternativo parece ser similar en ambos organismos estudiados, y estaría relacionada con el reconocimiento de las secuencias dadoras del *splicing*.

En conjunto, este trabajo constituye una herramienta potencial para el mejoramiento de especies cultivables, ya que incrementar el conocimiento sobre el funcionamiento del reloj circadiano y los mecanismos celulares con los que éste interactúa nos permitirá manipular el tiempo que tardan las plantas en florecer y aumentar su rendimiento. Por otro lado, muchas enfermedades humanas se han asociado a defectos en el *splicing*, y se ha vinculado a PRMT5 con procesos cancerígenos, por lo cual, mejorar nuestro entendimiento sobre el rol de esta proteína a nivel celular en modelos de estudio simples como lo son *Arabidopsis thaliana* y *Drosophila melanogaster*, podría facilitar la labor que se realiza en organismos más complejos.

Palabras Clave: Arabidopsis thaliana, reloj circadiano, PRMT5, arginin metiltransferasa, regulación transcripcional, epigenética, splicing alternativo, Drosophila melanogaster.

PRMT5, a link between the circadian network and alternative splicing

Abstract

Circadian clocks allow organisms to adjust multiple physiological and developmental processes in anticipation of daily and seasonal changes in the environment. In plants, the most important signals synchronizing the clock are the daynight cycles and associated temperature changes.

To identify new regulatory components of the circadian clock, a high throughput screening of mutants in *Arabidopsis thaliana* was performed. As a result, we isolated a mutant allele for *PRMT5* gene, which codifies for an enzime that transfers methyl groups to arginine residues present in other proteins. Here, we show that PRMT5 is part of a feedback loop strongly associated with the central oscillator, which couples the clock to the control of transcription and alternative splicing. Afterwards, we assayed a mutant affected in the *Drosophila melanogaster PRMT5* homolog, and we found that circadian rhythms in locomotor activity are disrupted in this mutant, although the clock connection is more elusive than in plants. We also found evidence indicating that PRMT5 has a role in the regulation of alternative splicing in flies, which seems to be quite similar to that observed in *Arabidopsis thaliana*, being related to the donor splice sequence recognition.

Together, these data could be a useful tool in crop improvement, since a better understanding of the circadian clock and cellular and molecular mechanisms under its control, could allow us to develop novel varieties that flower at the most appropriate time of the year, maximizing crop yield. On the other hand, splicing defects have been linked to human diseases, and PRMT5 has been associated with cancer development. Therefore, understanding the cellular and molecular roles of this protein in simple organisms, could facilitate similar work in more complex ones.

Key Words: *Arabidopsis thaliana*, circadian clock, PRMT5, arginine methyltransferase, transcriptional regulation, epigenetic, alternative splicing, *Drosophila melanogaster*.

Agradecimientos

A Marcelo, gracias por haberme elegido para trabajar con él hace casi 6 años. Por haber insistido en los momentos que hacía falta, por ser lo suficientemente positivo o cauteloso según la oportunidad lo requiriera. Gracias por enseñarme, por incentivarme, por confiar en mí y por dejar que piense por mi misma y que me equivoque. Ha sido un placer trabajar con una persona tan brillante, y tan grande humanamente.

Al IFEVA, por todo lo bueno y todo lo malo, que en conjunto lo hacen un lugar tan especial y tan único, tan querido como mi segundo hogar. Claro que el IFEVA es su gente:

A Jorge, gracias por su optimismo constante y por mostrar siempre una visión objetiva de los hechos.

A las chicas del labo de U.V., en particular a Mer por esas largas charlas que rozaron en terapia de grupo porque la Real Time daba horrible. A Miriam por el cariño.

A quienes se fueron del IFEVA antes que yo, pero siguen en mi memoria. A Vero. Arana, por ponerle a su profesión tanta garra y espíritu, y ser una fuente de inspiración para los que recién entrábamos.

A la gente del labo, a Andre, Pau (Coluccio), Silvia, Carlitos, Yami y Gustavo. Por estar, escuchar, compartir y ser parte del laboratorio grande.

A Tesito (Martín), Santi, Gaby, Pipa (Juan), Paulita (aunque hace rato que no está en el lab, pero es como si lo estuviese) y Marian. Gracias por las cenas, las carcajadas, hacerme pensar, contenerme, soportarme y sobre todo, por quererme.

A Steve, por escucharme, por ayudarme, por compartir la tarea más aburrida de mi doctorado: el clonado posicional, y por las miles de veces que me regaste durante mis ausencias, ya sea por vacaciones, enfermedad o escribir esta tesis.

A Leito, por robarme los tips, por no saber comprar nada después de años de laburar en el lab, pero por sobre todo, por hacerse querer tanto tanto. Aunque hace unos meses que no estás en el lab, se te sigue extrañando Leo!!!.

A Mery y a Lu, por los "after lab" y los "super-after lab". Por reirnos, alegrarnos, angustiarnos, indignarnos y enojarnos juntas. Por la paciencia y los consejos. Gracias.

A la gente del lab de Petry, a los que aún están y a los que siguieron su camino, que me dieron la bienvenida, me ayudaron y me escucharon. Gracias. A Alberto, por darme lugar en su lab y recibirme siempre con los brazos abiertos. A Eze, por enseñarme tanto, por la paciencia, por compartir conmigo tantas cosas, por lo bueno y por lo malo, por seguir siendo quien es, por haber laburado codo a codo y no matarnos en el intento. Gracias por el cariño y el respeto mutuo.

A Viole, mi profe de la secundaria, quien definitivamente es la responsable de mi profesión. Por haberme mostrado la biología molecular y celular, por haberme obligado a pensar hace tantos años atrás "¿Por qué se diferencian unas células de otras si todas tienen la misma información genética?". Gracias también, por ponerle tanto amor a su profesión de docente. Todo un ejemplo.

Mis amigas de la facu, Ceci, Carli, Vicky y Belén, por estar siempre. Por el esfuerzo compartido que lo hizo más llevadero, por las salidas nocturnas post-química orgánica, por las charlas eternas en el camino a la facu, por las corridas para llegar a horario, por los cafés batidos a mano para mantenernos despiertas mientras estudiábamos para los finales y mil recuerdos más. Gracias por estar, y por seguir estando. Gracias a Patricio, alias Patito, por los consejos y el apoyo. Gracias por decirme "Sabri, ya vas a encontrar un lugar que te guste para hacer el doctorado"...tenía razón!.

A Carli, mi hermana del alma. Gracias por estar ahí durante tantos años, por compartir los mejores y los peores momentos de mi vida. Por crecer y adaptarnos a los cambios, por aprender juntas tantas cosas, por el apoyo constante ya sea presente o no, gracias por hacerme saber que puedo contar con vos.

A mi abue, por darle luz a mi vida. Por ser taaaaanto tanto para mi. Por apoyarme, por quererme y hacerme sentir tan querida, por malcriarme un poco, por cocinarme las cosas que más me gustan, por ser tal cual es.

A mi papá, por respetarme y apoyarme a pesar de no entenderme. Por amarme tanto. Por enseñarme a pelear por lo que uno quiere y a disfrutar del camino.

A Ruben y a Marta, por tanto. Gracias Ruben por estar, escuchar, escuchar aun más, aportar sabios consejos, confiar en mi, empujarme cuando es necesario y contenerme. Gracias Marta por estar, apoyarme, darme ánimo y preocuparte siempre. Muchas muchas gracias a ambos, su guía y su cariño han sido invalorables.

A Mati, gracias por todo lo que me das. Por entenderme y acompañarme en el camino. Por respetarme y amarme. Por reirnos juntos de lo bueno y de lo malo de la vida. Gracias por haber estado a mi lado todo este tiempo y por los proyectos compartidos. Gracias por darme la posibilidad de compartir un futuro juntos.

A mi mamá, a quien le debo todo lo que soy. Gracias mamá por haberme enseñado a dar lo mejor, a esforzarme, a confiar en que se puede, a aspirar a más; gracias por haberme contagiado esa pasión por la ciencia, esas ganas de preguntarse por qué suceden hasta las cosas más cotidianas de la vida. Gracias por haber confiado en mí y darme la energía suficiente para seguir. Pero sobre todas las cosas, gracias por haberme amado tanto. Te extraño mucho y lamento no haber podido compartir todo esto con vos.

<u>Introducción</u>

Introducción

La adaptación de las plantas al medio ambiente depende de su capacidad de regular distintos procesos fisiológicos y de desarrollo a lo largo del día y frente al cambio de estaciones durante el año. Esa regulación es posible gracias a un oscilador interno conocido como reloj circadiano, el cual es sincronizado principalmente por los ciclos de luz-oscuridad y de temperatura.

Por otro lado, debido al carácter sésil de las plantas y su incapacidad de migrar frente a la presencia de condiciones adversas, es vital la percepción de las señales provenientes del ambiente que modulen la plasticidad fenotípica que presenta cada organismo. Esto ha conducido al desarrollo de una compleja red de transducción de las señales percibidas y la interacción entre vías de señalización activadas por distintos estímulos. Debido al alto costo energético y a la irreversibilidad de algunos procesos fisiológicos, por ejemplo, el pasaje del estado vegetativo al estado reproductivo, los sistemas de percepción deben ajustar las respuestas al ambiente con exactitud.

Medición biológica del tiempo

La rotación de la tierra alrededor de su eje, y su movimiento de traslación alrededor del sol, expone a todos los seres vivos a cambios diarios y estacionales en la cantidad de luz, temperatura y humedad del ambiente en el que habitan. La mayoría de los organismos poseen mecanismos que les permiten anticiparse a esos cambios recurrentes y ajustar distintos procesos fisiológicos y del desarrollo de modo que estos ocurran en ciertos momentos del día y del año (Yanovsky, M.J. & Kay, S.A., 2003). Estos mecanismos son conocidos como relojes y calendarios biológicos. La habilidad de coordinar ciertos procesos de desarrollo a momentos particulares del año, cuando las condiciones ambientales tienden a ser más favorables, confiere diversas ventajas que se detallarán más adelante (Jackson, S.D., 2009).

Los relojes biológicos regulan múltiples procesos bioquímicos y fisiológicos, que incluyen la fotosíntesis y el momento en el que florecen muchas especies vegetales (Harmer, S.L., 2009), así como los ciclos de sueño y vigilia, el apetito y los niveles hormonales en humanos (Reiter, R.J. *et al.*, 2010). Alteraciones en el funcionamiento de

los relojes endógenos han sido asociadas a diversas enfermedades, por ejemplo, enfermedades metabólicas y cardiovasculares (Maury, E. *et al.*, 2010).

Los ritmos diarios regulados por estos osciladores persisten aún cuando los organismos son transferidos de ambientes con ciclos de luz y/o temperatura (condiciones de entrenamiento) hacia ambientes cuyas condiciones son constantes, conocidas experimentalmente como "condiciones de libre curso" {McClung, 2008 #1854}. Estas observaciones indican que los relojes biológicos constituyen mecanismos de control de origen endógeno. En ausencia de oscilaciones diarias de luz y temperatura, la periodicidad de estos ritmos es cercana, pero no exactamente igual a 24 horas (McClung, C.R., 2008), por ello se los denomina ritmos "circadianos", del latín las palabras circa (cerca) y dies (día). Otra característica de los mismos es la "compensación térmica", es decir la particularidad de que el período sea relativamente estable dentro de un rango de temperaturas fisiológicamente relevante. Esto último pone en evidencia la existencia de intrincados mecanismos de regulación, ya que si fuera simplemente la suma de diversas reacciones bioquímicas, la longitud del período debería acortarse a medida que aumenta la temperatura (McClung, C.R., 2008). Finalmente, el momento en el que un ritmo se inicia puede ser restaurado por las señales ambientales apropiadas, como ser cambios en la luz o en la temperatura.

Los ritmos circadianos comúnmente presentan una forma sinusoidal al graficarlos en función del tiempo. Esas ondas pueden ser descriptas por términos matemáticos como el período, la fase y la amplitud (Fig. 1). En el caso de los relojes biológicos, se entiende como fase el momento del día (hora) en el que la respuesta estudiada obtiene el valor máximo; por ejemplo, si se estudia el perfil de expresión de un gen, el momento de máxima expresión. La amplitud, por su parte, se estima como la mitad de la distancia entre el máximo y el mínimo para determinada respuesta, y el período representa la distancia, en tiempo, entre máximos o mínimos sucesivos (McClung, C.R., 2006).

El reloj circadiano en Arabidopsis thaliana

Desde un punto de vista molecular, se propone que el reloj circadiano en las plantas está compuesto por varios circuitos de retro-alimentación negativa, que se encuentran acoplados entre sí y poseen complejos mecanismos de regulación. En la última década,



Fig. 1. Representación gráfica de la oscilación presente en un ritmo circadiano. A: Modelo de una respuesta circadiana en condiciones de entrenamiento (ciclos de luz-oscuridad) en función del tiempo (horas). Se indican la amplitud (la mitad de la distancia entre el máximo y el mínimo) y el período (distancia entre máximos o mínimos) que es de exactamente de 24 hs por el entrenamiento del reloj por los ciclos de luz- oscuridad. Los rectángulos debajo del eje X, representan las horas de luz (blancos) y de oscuridad (negros). **B:** Se representan dos *outputs* de igual amplitud y período, siendo la única diferencia entre ellos la fase que poseen.

se han descubierto gran cantidad de componentes del reloj y se ha determinado que la regulación de ellos se da a distintos niveles: transcripcional, post-transcripcional, post-traduccional y, más recientemente, se ha determinado, que también a nivel epigenético y de procesamiento del pre-ARNm (ARN mensajero prematuro) (Matsushika, A. *et al.*, 2000; Alabadí, D. *et al.*, 2001; Farré, E.M. *et al.*, 2005; Nakamichi, N. *et al.*, 2005; Perales, M. & Mas, P., 2007; Filichkin, S.A. *et al.*, 2010; Sanchez, S.E. *et al.*, 2010).

Años atrás, el reloj circadiano era dividido mecanísticamente en tres partes que se creía, se sucedían progresivamente: *input* o señales de entrada (las que sincronizan al reloj), oscilador central y *output* o señales de salida (respuestas controladas por el reloj). Sin embargo, se ha determinado que esa representación resulta una simplificación, ya que el correcto funcionamiento del reloj biológico es mucho más complicado que eso, siendo prácticamente imposible separar el *output* del *input*. Se ha encontrado evidencia que demuestra la existencia de una intrincada red de señalización donde, por ejemplo, genes que pertenecen al *output* son capaces de modular el propio *input*. Actualmente se hace referencia a esas subdivisiones, pero el concepto es mucho más amplio y se plantea que todas las piezas del reloj se conectan entre sí en mayor o menor medida (Fig. 2) (Harmer, S.L., 2009).



Fig. 2. Modelos de funcionamiento del reloj biológico. A: Modelo de reloj estructurado como un mecanismo lineal, formado por tres componentes discretos. B: Modelo de reloj más complejo, donde los distintos actores del mismo forman una red interconectada entre sí. Aquí, el oscilador central sigue existiendo pero como una serie de circuitos de retro-alimentación conectados entre sí. Con flechas rayadas se muestra que respuestas controladas por el reloj, pueden a su vez, modular el efecto de la luz y/o la temperatura sobre el entrenamiento del oscilador. Esas señales ambientales, pueden entrenar el reloj y/o tener consecuencias directas sobre respuestas reguladas por el oscilador central (flechas negras). Figura adaptada de Harmer, S.L., Annu. Rev. Plant Biol. (2009).

En el año 2001 el grupo del Dr. Steve Kay propuso el primer modelo molecular para explicar el funcionamiento del oscilador endógeno en *Arabidopsis thaliana* (Alabadí, D. et al., 2001). Ese modelo estaba basado en la regulación transcripcional de tres componentes. Uno de ellos es el gen *TOC1* (del inglés, *TIMING OF CAB EXPRESSION 1*), también conocido como *PRR1* (del inglés, *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 1*), cuya expresión es de fase nocturna (o sea expresión máxima durante la noche) y cuya

función molecular es desconocida. La proteína TOC1, de localización nuclear, promueve la expresión de dos factores de transcripción de tipo *Myb* homólogos entre sí, *LHY* (del inglés, *LATE ELONGATED HYPOCOTYL*) y *CCA1* (del inglés, *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*). Las proteínas LHY y CCA1, se unen directamente al promotor del gen *TOC1*, reprimiendo su transcripción y completando el primer circuito de retro-alimentación negativa, Fig. 3 y Fig. 4 (Alabadí, D. *et al.*, 2001).



Fig. 3. Primer modelo del reloj biológico en *A. thaliana*: Al amanecer, la luz induce la transcripción de *CCA1* y de *LHY*. Estos factores de transcripción activan la expresión del gen *CAB* y, probablemente, de otros genes de fase matutina. Simultáneamente, reprimen la expresión de *TOC1*, y potencialmente la de otros genes de expresión nocturna. Con la disminución progresiva a lo largo del día de CCA1 y LHY, los niveles de ARNm de *TOC1* aumentan, alcanzando el máximo al final del día/ principios de la noche, cuando la expresión de *CCA1* y *LHY* es mínima. Luego, TOC1 induce la transcripción de *CCA1* y *LHY*, dando comienzo al ciclo nuevamente. Figura adaptada de Alabadí D. *et al.*, Science (2001).

Si bien las interacciones propuestas en ese primer modelo siguen siendo válidas, poco después de su aparición fue claro que no era suficiente para explicar el comportamiento complejo del reloj biológico y las respuestas que éste modula. Así, mediante el empleo de análisis matemáticos y algoritmos computacionales, en el año 2005 el grupo del Dr. Andrew Millar propuso un nuevo modelo de oscilador central, conformado por los componentes conocidos y postulando la existencia de actores adicionales que permitieran explicar las respuestas observadas experimentalmente (Locke, J.C.W. *et al.*, 2005), el cual fue mejorado y ampliado por su mismo grupo y por

otros (Locke, J.C.W. *et al.*, 2006; Zeilinger, M.N. *et al.*, 2006). Luego, numerosos trabajos confirmaron este modelo y poco a poco, fueron identificando algunos de los factores desconocidos y mostrando que los niveles de regulación exceden el nivel tanscripcional, e incluyen los niveles post-transcripcional, post-traduccional y epigenético (McClung, C.R., 2006; Harmer, S.L., 2009; Kojima, S. *et al.*, 2011). A pesar de estos adelantos, aún no es posible predecir con exactitud el comportamiento del reloj bajo determinadas circunstancias, indicando que aún quedan elementos y/o mecanismos de regulación por descubrir.

Actualmente, se modela el mecanismo central del reloj circadiano como tres circuitos de retro-alimentación negativa conectados entre sí, denominados, circuito (o *loop*) central, matutino y nocturno (Fig. 4). En ellos participan distintos miembros de la familia protéica PRR (del inglés, *PSEUDO RESPONSE REGULATOR*). La misma, está compuesta por cinco integrantes: PRR1 (también conocido como TOC1), PRR3, PRR5, PRR7 y PRR9. Todos ellos comparten dominios homólogos (PRR y CCT -cuyo nombre se debe a las proteínas en las que se identificó por primera vez-), señal de localización nuclear, son regulados por el reloj biológico y a su vez, participan en la regulación del mismo. Estudios genéticos han permitido determinar la existencia de redundancia funcional parcial entre PRR3, 5, 7 y 9, lo cual se evidencia a partir del fenotipo débil de las mutantes simples para cada uno de esos genes, y el fenotipo severo que presentan las mutantes múltiples, que combinan mutaciones para distintos PRR's (Harmer, S.L., 2009).

El *loop* central está formado por TOC1, CCA1 y LHY. Originalmente, cuando este *loop* fue descripto, se planteaba que TOC1 regulaba la expresión de los otros dos componentes, pero no se sabía si directa o indirectamente (Alabadí, D. *et al.*, 2001). Hasta el momento, no se ha podido caracterizar un dominio de unión al ADN en la proteína TOC1, lo cual sugiere que la regulación de ésta sobre los factores de transcripción CCA1 y LHY debería ser indirecta. Existe evidencia que sustenta esta hipótesis: CHE (del inglés, *CCA HIKING EXPEDITION*), un factor de transcripción perteneciente a la clase 1 de la familia TCP, se une específicamente al promotor de *CCA1* y regula negativamente su expresión. A su vez, la expresión de *CHE* es reprimida durante el amanecer por CCA1 y aumenta gradualmente a lo largo del día, llevando a *CCA1* al mínimo de expresión durante la noche. Al final del día, TOC1 interactúa con



Fig. 4. Simplificación del modelo molecular del reloj biológico. El "circuito central" o Loop A, fue el primero en ser identificado y está compuesto por CCA1 y LHY, que se unen directamente al promotor de TOC1, regulando negtivamente su expresión. TOC1 induce, directa o indirectamente (a través de "X") la expresión de los dos primeros. Por otro lado figura el Loop B, que se desarrolla mayormente durante la porción nocturna del día. Este último incluye a TOC1 y otros componentes de expresión vespertina, pero aún no está claro cuáles y cuántos son (en la figura: "Y"). El gen GI sería uno de los de "tipo Y", por lo que TOC1 reprimiría su expresión y la de otros componentes de ese circuito, que a su vez, son los encargados de inducir la expresión de TOC1. Interconectado con este circuito funciona el Loop D, que a diferencia de los anteriores la regulación se da a nivel posttraduccional. Aquí, ZTL induce la degradación vía proteasoma de TOC1. ZTL sería estabilizado en presencia de luz por GI. Tanto la unión de GI a ZTL, como la de PRR3 a TOC1, podría impedir la interacción entre ZTL y TOC1, teniendo esto un efecto negativo sobre la degradación de TOC1. Finalmente, el loop C o "loop matutino", está compuesto por genes cuyo pico de expresión se da durante la mañana. Entre ellos están, CCA1, LHY, PRR7 y PRR9. CCA1 y LHY regulan positivamente la expresión de PRR7 y PRR9. PRR7 y PRR9 modulan negativamente la transcripción de los dos primeros mediante la unión a su promotor. Por claridad, se han omitido otros genes implicados en el funcionamiento del reloj. Figura adaptada de Harmer S.L., Annu. Rev. Plant Biol. (2009) y McClung C.R. & Gutiérrez R.A., Curr. Opin. Genet. Dev. (2010).

CHE, reprimiendo su actividad, y permitiendo que los niveles de CCA1 aumenten al llegar la mañana y que el ciclo vuelva a comenzar (Pruneda-Paz, J.L. *et al.*, 2009). En resumen, el rol de TOC1 sobre la expresión de *CCA1* podría darse a través de la represión de un inhibidor. Por esto, CHE podría ser uno de los componentes hipotéticos, responsable de "cerrar" el *loop* central, representado en la Fig. 4 como el "componente X". Sin embargo, es probable que existan otros mecanismos de regulación que modulen la expresión de *LHY*, y que colaboren en el complejo y robusto accionar del oscilador central (McClung, C.R. & Gutiérrez, R.A., 2010).

Estrechamente relacionado al *loop* central, funciona el *loop* matutino (Fig. 4). En éste, CCA1 y LHY activan la expresión de *PRR7* y *PRR9* (Farré, E.M. *et al.*, 2005), dos factores de transcripción pertenecientes a la familia PRR, cuyo pico de expresión tiene lugar durante el día, aunque de manera secuencial: *PRR9* en la mañana temprana, y unas horas después, *PRR7*. Luego, durante la tarde, presenta máxima expresión *PRR5*. Estos tres genes, reprimen en forma conjunta la transcripción de *CCA1* y *LHY*, los que alcanzan niveles mínimos durante el comienzo de la noche. Así, la ausencia de CCA1 y LHY, provocaría la disminución en los niveles de PRR7 y 9, lo cual permitiría que el ciclo comience nuevamente.

Como puede observarse, en la Fig. 4 no se ha incluido en el *loop* matutino a PRR5. Esto se debe, en primer lugar, a que esa figura es una simplificación gráfica del mecanismo del reloj. En segundo lugar, PRR5 no es un actor exclusivo del *loop* matutino, ya que está vinculado al control post-traduccional de TOC1. Esto es posible ya que su máxima expresión, traducción y acumulación protéica, se da antes de la llegada de la noche, lo cual le permite actuar con integrantes de distintos circuitos de control. En particular, PRR5 interactúa con TOC1 a través de su dominio n-terminal en el citoplasma. Esa interacción, promueve la acumulación de TOC1 en el núcleo, posiblemente por un aumento en la importación hacia ese compartimento subcelular (Wang, L. *et al.*, 2010). Por otro lado, se sabe que TOC1 y PRR5 interactúan con ZTL (del inglés, *ZEITLUPE*), una proteína con dominio del tipo F-box que forma parte del complejo E3-Ubiquitin ligasa, e induce la degradación vía proteasoma de sus proteínas blanco (Mas, P. *et al.*, 2003; Kiba, T. *et al.*, 2007). Así, la oligomerización de PRR5 y TOC1, favorece el transporte de estas dos proteínas al núcleo, lo que impide su interacción con la ZTL citoplasmática, protegiéndolas de la degradación vía proteasoma

y convirtiendo este paso en un nuevo nivel de regulación. Sin embargo, la interacción PRR5/TOC1 en citoplasma induce la fosforilación de TOC1, lo cual a su vez promueve su interacción con ZTL (Wang, L. *et al.*, 2010). En resumen, existe un delicado equilibrio en la regulación post-traduccional de estas proteínas, que contribuye al funcionamiento robusto y preciso que presenta el reloj biológico.

Finalmente, como parte del oscilador central, puede describirse el *loop* nocturno compuesto por los *loops* B y D de la Fig. 4. Según los modelos matemáticos y el esquema propuesto de tres circuitos de retro-alimentación interconectados (Locke, J.C.W. *et al.*, 2006; Zeilinger, M.N. *et al.*, 2006), existiría un componente "Y" cuya acción sería la de inducir la expresión de *TOC1*. Asimismo, se predice que TOC1, CCA1 y LHY reprimirían la expresión de *"Y"*. Algunos datos experimentales, señalan a GI (del inglés, GIGANTEA) como posible candidato para cumplir el rol de "Y" (Locke, J.C.W. *et al.*, 2006). GI también participa en la regulación post-traduccional de TOC1: GI interactúa físicamente con ZTL. ZTL contiene un dominio de tipo LOV (del inglés, *LIGHT, OXYGEN OR VOLTAGE*), responsable de la unión a flavina, que actúa como fotorreceptor de luz azul. Así, la luz azul estimula la interacción ZTL-GI, lo cual estabiliza ambas proteínas e impediría que ZTL dimerice con otros blancos de acción, como ser TOC1 y PRR5 (Kim, W.Y. *et al.*, 2007; Harmer, S.L., 2009). En conclusión, en oscuridad se produciría una degradación más rápida de estas cuatro proteínas, PRR5, TOC1, ZTL y GI, que en presencia de luz.

TOC1 es blanco de una regulación adicional, además de las descriptas hasta el momento (transcripcional vía CCA1, LHY, GI y componentes hipotéticos; y posttraduccional por PRR5, GI y ZTL). En esta participa PRR3, un componente vinculado hasta el presente sólo con ésta pieza del reloj y cuya fase de expresión se da durante el atardecer (Matsushika, A. *et al.*, 2000), por lo que se lo ubica en el *loop* nocturno, Fig.4 (Harmer, S.L., 2009; McClung, C.R. & Gutiérrez, R.A., 2010). Se ha demostrado que PRR3 se une directamente a TOC1, de manera que interfiere con la interacción TOC1-ZTL, lo cual previene que TOC1 sea reclutado al complejo SCF y su consecuente degradación vía proteasoma (Para, A. *et al.*, 2007). Entonces, el rol de PRR3 sería estabilizar a TOC1, Fig.4 (Harmer, S.L., 2009; McClung, C.R. & Gutiérrez, R.A., 2010).

La sincronización del reloj circadiano

Dado que el período de los osciladores endógenos no es exactamente de 24 hs y, a la vez, el momento del día en el cual se produce la salida y la puesta del sol varía durante el año en regiones alejadas del ecuador, los relojes circadianos son sincronizados, ó "puestos en hora", diariamente. En efecto, los cambios diarios en los ciclos de luz-oscuridad y de temperatura ajustan el funcionamiento de los relojes endógenos de modo que distintos procesos mantengan una relación de fase apropiada con el amanecer y el atardecer (Harmer, S.L., 2009).

El mecanismo por el cuál las plantas sensan la temperatura no se ha descripto hasta el momento. Sin embargo, se conocen algunas de las piezas involucradas en la cadena de señalización que ese factor abiótico desencadena. Se sabe que la transcripción de *CCA1*, *LHY*, *TOC1* Y *GI*, es sensible a la temperatura (Harmer, S.L., 2009). Por otro lado, plántulas mutantes *prr7;prr9* han demostrado ser incapaces de sincronizarse en ciclos de temperatura, al menos en algunos experimentos, lo cual sugiere que esas dos proteínas tendrían un rol en la respuesta a la temperatura (Salomé, P.A. & McClung, C.R., 2005a).

La luz parece ser una de las señales más fuertes en cuanto a su papel en la sincronización del reloj endógeno. En los últimos años se ha proporcionado evidencia genética y fotobiológica que indica que distintos fotorreceptores, entre ellos fitocromos y criptocromos, tienen un rol importante en el ajuste diario de los ritmos circadianos en las plantas (Somers, D.E. *et al.*, 1998; Yanovsky, M.J. *et al.*, 2000a; Yanovsky, M.J. *et al.*, 2000b). Cabe destacar que los criptocromos también han sido implicados en la sincronización de los relojes biológicos en animales (Cashmore, A.R. *et al.*, 1999). A su vez, genes con cierta similitud a las fototropinas, otro grupo de fotorreceptores de plantas, regulan los ritmos en el hongo *Neurospora crassa* (Crosthwaite, S.K. *et al.*, 1997). En *Arabidopsis thaliana* se ha demostrado que la luz es percibida por fitocromos y criptocromos, y más recientemente se ha determinado que otros fotorreceptores participan en la percepción de la luz, colaborando a mantener al reloj "en hora". Estos, pertenecen a la familia de ZTL y al igual que ésta, poseen un dominio LOV de percepción de luz azul. Estas proteínas son LKP2 (del inglés, *LOV KELCH PROTEIN 2*) y FKF1 (del inglés, *FLAVIN-BINDING KELCH F-BOX 1*) (Salomé, P.A. &

McClung, C.R., 2005b; Demarsy, E. & Fankhauser, C., 2009). Así también, se ha corroborado que la luz regula la estabilidad de distintas proteínas centrales del reloj, como se ha explicado anteriormente, y que además modula la expresión de componentes fundamentales del reloj como *CCA1*, *LHY*, *PRR9* y *PRR7*, sugiriendo que éste podría ser parte del mecanismo de sincronización del reloj en plantas (McClung, C.R., 2008). Sin embargo, no se ha descripto aún la manera a través de la cual, fitocromos y criptocromos modulan el oscilador central.

Finalmente, es importante mencionar que existen otras señales capaces de sincronizar el reloj que no provienen del ambiente. Entre ellas podemos mencionar los niveles de metabolitos endógenos, por ejemplo intermediarios del nitrógeno orgánico, niveles hormonales, o citoquininas, brasinoesteroides y ácido abscísico (McClung, C.R. & Gutiérrez, R.A., 2010). Por otro lado, se ha propuesto que los niveles endógenos de sacarosa, podrían funcionar como señal de sincronización (James, A.B. *et al.*, 2008).

El reloj circadiano, mucho más que un mecanismo

Como se ha mencionado anteriormente, el oscilador endógeno es el mecanismo por el cual las plantas anticipan la llegada del amanecer y el atardecer, lo cual representa una ventaja adaptativa para los organismos (Dodd, A.N. *et al.*, 2005). Esto se debe a que el reloj circadiano regula numerosos procesos fisiológicos y de desarrollo, entre ellos el ritmo del movimiento de las hojas, la floración, el alargamiento del hipocotilo, los niveles hormonales, la apertura estomática, y otras actividades metabólicas como el intercambio de nitrógeno y carbono (Yanovsky, M.J. & Kay, S.A., 2002; McClung, C.R., 2006; Nozue, K. *et al.*, 2007; McClung, C.R., 2008; Harmer, S.L., 2009). Por ejemplo, en plantas cuyo reloj circadiano no funciona correctamente se ha medido un 40% de disminución en la tasa de fijación neta de carbono en comparación con las plantas salvajes, así como también un 40% de disminución en la biomasa (Dodd, A.N. *et al.*, 2005).

La posibilidad de que el reloj circadiano module tantas y tan diversas respuestas, podría explicarse ya que gran parte del genoma está bajo el control de este mecanismo. Se ha detectado, que hasta el 90% de los genes de *Arabidopsis thaliana* oscila a nivel transcripcional en condiciones ambientales cíclicas, donde la luz y/o la temperatura cambian entre el día y la noche (Michael, T.P. *et al.*, 2008b). En conjunto, estas observaciones reflejan la importancia del reloj circadiano en el control de procesos celulares básicos y también a nivel organísmico.

La luz, una señal importante

La luz es uno de los componentes abióticos del ambiente más importantes para las plantas, ya que provee la energía necesaria para realizar la fotosíntesis y actúa como fuente de información. Los cambios morfológicos y fisiológicos que se producen en respuesta al ambiente lumínico se denominan procesos fotomorfogénicos.

La luz provee distinto tipo de señales informativas para las plantas. Entre ellas se encuentran: 1) la irradiancia, que representa la cantidad de luz por unidad de tiempo y de superficie; 2) la calidad espectral, que varía principalmente por la presencia de plantas vecinas y, aunque en menor grado, en días nublados, en el amanecer y en el atardecer; 3) la dirección de incidencia, que depende del momento del día, de las estaciones, y de los claros en el canopeo vegetal; 4) el fotoperíodo, que se define como la cantidad de horas de luz que posee un ciclo de 24 horas, y que en regiones alejadas del ecuador varía según la estación del año (Fankhauser, C. & Casal, J., 2004).

Estudios genéticos y fotobiológicos realizados en *Arabidopsis thaliana*, han demostrado que las moléculas responsables de sensar la luz median gran cantidad de respuestas adaptativas, por ejemplo el fototropismo y el escape a plantas vecinas, y también controlan algunas de las transiciones del desarrollo, como la germinación y la floración (Kami, C. *et al.*, 2010).

La luz y el desarrollo vegetal

Una vez que las semillas son expuestas a la luz, se induce la germinación. En primera instancia, el desarrollo de las plántulas depende de las reservas presentes en la semilla. Si se desarrollan en oscuridad, el crecimiento de esas plántulas se caracteriza por presentar un fenotipo etiolado, es decir, hipocotilos largos y con gravitropismo negativo, raíz corta, gancho apical bien pronunciado, cotiledones cerrados y poco

expandidos, maquinaria fotosintética rudimentaria y escasa presencia de pigmentos (Casal, J.J., 2002). Este patrón de desarrollo en oscuridad se denomina escotomorfogénesis. El alargamiento observado en el hipocotilo, se debe a un proceso de elongación celular, y representa una ventaja para la supervivencia del organismo, ya que le permite a la plántula alcanzar la superficie del suelo y comenzar a percibir las señales lumínicas, lo cual desencadena una serie de cambios en el desarrollo, conocidos en su conjunto como des-etiolación. Este proceso incluye la rápida inhibición del alargamiento del hipocotilo (inhibición de la elongación celular), la inhibición del gravitropismo negativo del hipocotilo, la elongación de la raíz, la apertura del gancho apical, la expansión y apertura de cotiledones, el desarrollo de cloroplastos y el aumento de la síntesis de pigmentos (antocianinas, clorofilas y carotenoides). Durante la inhibición del alargamiento del hipocotilo, el reloj circadiano cumple una función importante, ya que modula la percepción de las señales lumínicas y las respuestas que éstas promueven (Nozue, K. et al., 2007). En conjunto, la des-etiolación permite que la plántula alcance la fotoautotrofía, estableciéndose un nuevo patrón de desarrollo, la fotomorfogénesis. Estos cambios morfológicos y fisiológicos de adaptación al nuevo ambiente son el resultado de la transducción de la señal lumínica desde los fotorreceptores correspondientes hasta sus efectores, lo cual provoca un cambio en el programa transcripcional de las células (Ma, L. et al., 2001; Tepperman, J. et al., 2001).

Las respuestas de des-etiolación y fotomorfogénesis han sido ampliamente estudiadas a lo largo de los años, ya que su análisis provee información fundamental para comprender cómo ocurre la percepción lumínica en las plantas, las señales que esto dispara, y los mecanismos que se utilizan con el fin de controlar las distintas respuestas.

La percepción de la luz

Las plantas superiores poseen varias familias de fotorreceptores que pueden monitorear un amplio rango del espectro lumínico, desde la luz UV-B (280-320 nm) hasta el rojo lejano (700-800 nm), Fig. 5. Estas moléculas les permiten sensar y responder a las fluctuaciones constantes de la luz, lo cual representa una ventaja adaptativa crucial, ya que como se ha explicado anteriormente, las plantas son



Fig. 5. Espectro lumínico. Longitud de onda (nm) de la luz y el nombre que recibe cada fracción. En general, el nombre coincide con el color percibido por el ojo humano.

organismos sésiles y fotoautotróficos, siendo la luz un factor determinante en su ciclo de vida (Kami, C. *et al.*, 2010).

Algunas respuestas fisiológicas son disparadas específicamente por un fotorreceptor. Sin embargo, en muchos casos, la participación de integrantes de distintas familias de fotorreceptores asegura una respuesta coordinada. También se ha visto que existe interacción entre las vías de señalización endógena disparadas en respuesta a distintos factores ambientales, en particular a la percepción de la luz, la temperatura y los patógenos (Kami, C. *et al.*, 2010).

En particular, la luz UV-B es capaz de inhibir la elongación del hipocotilo en *Arabidopsis thaliana* y regular la transcripción de un gran número de genes (Boccalandro, H.E. *et al.*, 2001), sin embargo, aún no se han identificado fotorreceptores específicos para estas longitudes de onda (Kami, C. *et al.*, 2010). La luz roja y roja lejana, es sensada por los fitocromos, mientras que existen tres familias de fotorreceptores de la luz UV-A y azul: los criptocromos, las fototropinas y los miembros de la familia ZEITLUPE.

En la especie *Arabidopsis thaliana*, se han descripto hasta el momento, cinco fitocromos (phyA-phyE). Análisis comparativos entre especies, han identificado loci cuyas secuencias presentan alto grado de identidad a esos genes en organismos muy diversos, desde algas hasta angiospermas, aunque los estudios realizados sugieren una divergencia temprana durante la evolución de las plantas con semilla para algunos de ellos (Quail, P.H. *et al.*, 1995; Kami, C. *et al.*, 2010). En relación a su función biológica, phyA y phyB son los fitocromos mejor caracterizados hasta el momento en *A. thaliana*. Estos controlan la germinación, el crecimiento del hipocotilo, la orientación gravitrópica del hipocotilo, la expansión y apertura de cotiledones, la apertura del

gancho apical, la elongación de la raíz principal, y la floración, entre otros procesos (Quail, P.H., 2010). A pesar de que los mecanismos moleculares subyacentes a las respuestas fisiológicas promovidas por los fitocromos, no se conocen en profundidad, se ha demostrado que éstos interactúan a nivel celular con diversos componentes, entre ellos factores de transcripción, lo cual desencadena en primera instancia la regulación de la expresión génica, y luego, vía la transducción de las señales, el fenotipo observado (Kami, C. *et al.*, 2010).

Como se ha mencionado anteriormente, existen distintos grupos de fotorreceptores de la luz UV-A y azul en A. thaliana. La familia de las fototropinas, constituida por PHOT1 y PHOT2 (del inglés, PHOTOTROPIN 1 y PHOTOTROPIN 2), participan principalmente en procesos de fototropismo, aunque también han sido involucradas en otras respuestas, como por ejemplo la expansión de cotiledones y de hojas, y el desarrollo estomático (Kami, C. et al., 2010). Por otro lado, se encuentran los fotorreceptores pertenecientes a la familia ZEITLUPE (ZTL, LKP2 y FKF1), que como se ha explicado previamente, participan en la sincronización del reloj circadiano, proporcionándole robustez, y también se los ha vinculado a la inducción de la vía fotoperiódica de la floración (Demarsy, E. & Fankhauser, C., 2009; Baudry, A. et al., 2010). Finalmente, podemos mencionar la familia de los criptocromos. Estos se encuentran no solo en plantas, sino también en animales, e incluso en el ser humano, siendo fotorreceptores ubicuos en todos los eucariotas superiores (Lin, C., 2002). Así también, estudios en cianobacterias, han determinado su presencia en procariotas (Hitomi, K. et al., 2000). La mayoría de las plantas estudiadas contienen múltiples criptocromos. En Arabidopsis thaliana se han descripto hasta el momento, tres componentes pertenecientes a esa familia: CRY1, CRY2 y CRY3, del inglés, CRYPTOCHROME 1, CRYPTOCHROME 2 y CRYPTOCHROME 3, respectivamente (Ahmad, M. & Cashmore, A.R., 1993; Hoffman, P.D. et al., 1996; Lin, C. et al., 1996; Kleine, T. et al., 2003). CRY1 y CRY2, participan durante el proceso de des-etiolación bajo luz azul (Lin, C., 2002). El rol de CRY3 aún no ha sido claramente establecido (Kleine, T. et al., 2003).

El control del tiempo a floración

Además de poseer mecanismos que coordinan procesos biológicos de modo que éstos ocurran en un momento particular del día, muchos organismos ajustan su desarrollo de modo que ciertas transiciones ocurran en las épocas más favorables del año gracias a su reloj o "calendario" biológico (Yanovsky, M.J. & Kay, S.A., 2003). En efecto, esa adaptación, confiere varias ventajas. Por ejemplo, en las plantas, la reproducción ajustada a la primavera, proporciona a la siguiente generación el mayor tiempo posible para establecerse antes de la llegada del invierno, cuando las condiciones suelen ser desfavorables. Esto conduce al aumento en la tasa de supervivencia y una clara ventaja para aquellos organismos que han desarrollado un sistema que les permite sensar diferencias estacionales, a través de la detección y respuesta a los cambios en las condiciones ambientales (Jackson, S.D., 2009).

Una de las señales que permite a plantas y animales anticipar el advenimiento de estaciones favorables o desfavorables son los cambios en el fotoperíodo, es decir la cantidad de horas de luz que posee un ciclo de 24 horas, o sea un día. Como ya se ha explicado, ese parámetro cambia a lo largo de las estaciones debido a la inclinación del eje del planeta Tierra. Entonces, la rotación anual de la Tierra alrededor del Sol provoca que los fotoperíodos para determinada latitud se repitan exactamente en el mismo momento del año, todos los años. Por esta razón, el fotoperíodo resulta una señal sumamente precisa y "confiable" como indicador de la época del año, mucho más que los cambios en la temperatura, que si bien fluctúan en relación a las estaciones anuales, esas variaciones son mucho menos predecibles (Jackson, S.D., 2009).

Desde hace casi 90 años se sabe que la floración de numerosas especies vegetales se ve afectada por el fotoperíodo, y se ha determinado que las especies vegetales pueden responder de distinta manera al largo del día: algunas plantas florecen solamente, o más rápidamente, cuando los días tienen un fotoperíodo mayor que cierto valor crítico (plantas de día largo), otras cuando el fotoperíodo es menor que cierto valor crítico (plantas de día corto) y un tercer grupo de plantas es insensible a esa señal (Thomas, B. & Vince-Prue, D., 1997).

El modelo más ampliamente aceptado para explicar el mecanismo de medición del fotoperíodo se conoce como modelo de coincidencia externa. De acuerdo a este modelo,

un organismo reconoce un día como largo cuando detecta la presencia de una señal externa, la luz, en un momento del día determinado por su reloj biológico (Yanovsky, M.J. & Kay, S.A., 2003). Teniendo esto en cuenta, resulta evidente la importancia del correcto funcionamiento del oscilador endógeno sobre la floración fotoperíodica de las plantas, y permite entender por qué muchas mutantes para genes del reloj circadiano poseen alterado el tiempo a floración (Fowler, S. *et al.*, 1999; Sato, E. *et al.*, 2002; Yamamoto, Y. *et al.*, 2003; Somers, D.E. *et al.*, 2004).

La utilización de la especie *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo para el estudio del control fotoperiódico de la floración ha permitido en los últimos años dar fuerte sustento experimental al modelo de coincidencia externa y, a su vez, ha permitido dilucidar en gran medida los mecanismos moleculares subyacentes al modelo. Así también, debido a que el tiempo a floración es una respuesta simple de medir, resulta útil como herramienta en el estudio de la percepción lumínica, el funcionamiento del reloj circadiano, el sistema de medición del largo del día y la interacción entre esos mecanismos (Guo, H. *et al.*, 1998; Yanovsky, M.J. & Kay, S.A., 2003).

Epigenética: otro nivel de regulación

Las distintas regulaciones epigenéticas han cobrado importancia en los últimos años ya que no sólo intervienen en una "memoria" a largo plazo, sino que participan en procesos fundamentales para el desarrollo de los organismos como lo son la replicación del ADN, la compactación cromosómica, la reparación del ADN, la trascripción, el *splicing* alternativo y el funcionamiento del reloj circadiano. Estos procesos celulares, también tienen implicancia directa sobre el comportamiento de los individuos, ya que por ejemplo, aseguran el éxito reproductivo mediante la floración en el caso de *Arabidopsis thaliana (Kouzarides, T., 2007; Perales, M. & Mas, P., 2007; Schmitz, R. et al., 2008; Schor, I.E. et al., 2009; Luco, R.F. et al., 2010).*

Desde un punto de vista molecular, los fenómenos epigenéticos pueden ser consecuencia de la modificación directa del ADN, o estar ligados a las histonas y a las modificaciones post-traduccionales de las que estas proteínas son blanco. Normalmente, el ADN se empaqueta formando nucleosomas, esto significa que se "enrosca" sobre un octámero de histonas en el cuál quedan expuestos los extremos amino-terminal de las mismas y son éstos los que sufren las distintas modificaciones. Actualmente, se sabe que las histonas pueden sufrir alguna o varias de las siguientes modificaciones posttraduccionales: acetilación, fosforilación, sumoilación, ubiquitinación, metilación, ADP ribosilación, deiminación e isomerización de prolinas. En particular, las más estudiadas son la acetilación y la metilación. La acetilación se da sobre el aminoácido lisina; mientras que la metilación puede encontrarse sobre lisina como mono-, di-, o trimetilación, y/o sobre la arginina, como mono-, o dimetilación. Esta última, puede ser simétrica o asimétrica. Tanto la acetilación como la metilación de histonas, han sido estudiadas principalmente en relación a su rol sobre el control de la transcripción génica (Kouzarides, T., 2007). La actividad transcripcional de un gen depende del conjunto de marcas que se encuentran sobre un mismo nucleosoma, y del estado de los nucleosomas "vecinos". Las modificaciones existentes en los extremos de las histonas tienen efecto sobre las nuevas marcas que pueden depositarse: pueden ser excluyentes, o favorecerse entre sí. En función de todo esto, se ha creado la expresión "código de histonas" para definir determinada combinación de modificaciones, y la capacidad de la célula para interpretar esa señal, dando como resultado determinada respuesta. Vale recordar, que aquellas enzimas capaces de "eliminar" una modificación, restableciendo el estado original de la histona, también poseen un rol determinante en el establecimiento del "código de histonas". Ejemplos de estas enzimas son las desacetilasas y las demetilasas (Liu, C. et al., 2010).

La epigenética y el desarrollo en Arabidopsis thaliana

Como se ha explicado en la sección precedente, en los últimos años ha mejorado nuestro entendimiento del rol que cumple la epigenética en el funcionamiento celular y la cantidad de procesos que modula. En esta sección, mencionaremos algunos ejemplos donde este novedoso mecanismo de control tiene consecuencias directas sobre respuestas fisiológicas, que afectan el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

Una de las respuestas fundamentales durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* e inicialmente vinculada a la regulación epigenética es la floración (Wu, K. *et al.*, 2000; He, Y. *et al.*, 2003). Originalmente, se encontraron pruebas que sugerían que la

transición del desarrollo vegetativo al reproductivo podría estar afectada por la acetilación de histonas (Wu, K. et al., 2000), y luego se demostró mediante herramientas genéticas, que la ausencia de una desacetilasa de histonas conduce a la hiper-acetilación de las histonas asociadas al promotor de FLC, un regulador negativo de la floración. Eso, a su vez, promueve el aumento en la expresión del mismo y el consecuente retraso en dicha respuesta (He, Y. et al., 2003). Desde ese momento hasta el presente, se han reportado distintas acetilasas y desacetilasas de histonas, vinculadas al control epigenético del tiempo a floración (He, Y. & Amasino, R.M., 2005; Deng, W. et al., 2007; Farinas, B. & Mas, P., en prensa). No obstante, existe otra marca posttraduccional importante en esa regulación: la metilación. Como en otras modificaciones epigenéticas, la respuesta desencadenada depende del equilibrio establecido por la presencia y ausencia de la marca, lo cual explica la importancia tanto de las enzimas capaces de introducir los grupos metilos, como de aquellas cuya actividad catalítica reside en eliminarlos. En primer lugar, se encuentran las proteínas que metilan el aminoácido lisina. Análisis comparativos, basados en las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de distintos organismos, han identificado en A. thaliana, 10 posibles genes cuyas proteínas podrían tener actividad de metilasa sobre lisinas de histonas (Avramova, Z., 2009). Hasta el momento, se ha reportado que tres de ellas (ATX1, ATX2 y ATXR7, del inglés ARABIDOPSIS TRITHORAX1, ARABIDOPSIS TRITHORAX2 y ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED7, respectivamente) estarían relacionadas con la regulación epigenética del tiempo a floración (Alvarez-Venegas, R. et al., 2003; Pien, S. et al., 2008; Tamada, Y. et al., 2009).

Por otro lado, existen las PRMTs (PRMTs, del inglés *PROTEIN ARGININE METHYL TRANSFERASE*) que catalizan la adición de grupos metilos al aminoácido arginina presente tanto en histonas, como en otras proteínas. Estas enzimas se encuentran presentes desde eucariotas unicelulares hasta humanos, incluyendo a *Drosophila melanogaster* y *Arabidopsis thaliana* (Bachand, F., 2007) y componen una familia muy conservada formada por dos grandes grupos, las metil-transferasas simétricas y las asimétricas, dependiendo de la ubicación que adoptan los grupos metilos sobre la arginina metilada, Fig. 6 (Liu, C. *et al.*, 2010). En *Arabidopsis thaliana* se encuentran presentes ambos tipos de PRMTs y se ha determinado que PRMT5, PRMT1b, PRMT4a, PRMT4b, y PRMT10 participan en el control de la floración (Niu,

L. et al., 2007; Pei, Y. et al., 2007; Scebba, F. et al., 2007; Wang, X. et al., 2007; Niu, L. et al., 2008).



Fig. 6. Metilación de argininas por PRMTs. Estructuras derivadas de la metilación de la arginina por arginin metil-transferasas de tipo I o tipo II. Figura adapatada de Liu C. *et al.*, Annu. Rev. Plant Biol. (2010).

El funcionamiento del reloj circadiano, también ha sido identificado como blanco del control epigenético. Durante las etapas iniciales de esta tesis, surgieron evidencias bioquímicas que postulaban que el oscilador endógeno sería blanco de regulación epigenética, en particular a través de la acetilación de la histona 3. Eso, alteraría la expresión del gen *TOC1*, una de las piezas claves del oscilador central (Perales, M. & Mas, P., 2007). Sin embargo, hasta ese momento y a diferencia de los conocimientos que se tenían sobre el control del tiempo a floración, no existían en *Arabidopsis thaliana* pruebas genéticas que vincularan los mecanismos epigenéticos al funcionamiento del reloj endógeno.

OBJETIVOS

Debido a la importancia que tiene el correcto funcionamiento del reloj circadiano en los seres vivos, y lo útil que sería para el ser humano poder manipularlo en especies vegetales con el fin de incrementar sus rendimientos, hemos determinado como objetivo general para esta tesis doctoral, mejorar nuestro conocimiento sobre el funcionamiento del reloj biológico. Para ello, nos hemos planteado como objetivo particular la identificación y caracterización de nuevos componentes regulatorios del oscilador endógeno en la especie modelo *Arabidopsis thaliana*.

HIPOTESIS

La hipótesis principal de esta tesis es que existen genes que forman parte del reloj circadiano y/o mecanismos regulatorios que aún no han sido descriptos. Por lo cual, predecimos que la identificación de esos nuevos componentes permitirá mejorar el entendendimiento sobre el funcionamiento de dicho mecanismo, y su capacidad de regular distintos procesos fisiológicos y de desarrollo.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La genética directa ha demostrado en los últimos años ser una herramienta sumamente útil para identificar genes involucrados en distintos procesos fisiológicos y morfológicos. Así mismo, la utilización de *Arabidopsis thaliana* como organismo de estudio provee grandes ventajas debido a la gran disponibilidad de material, tanto de individuos transgénicos y mutantes, como bioinformático. Es por esto que decidimos iniciar nuestro trabajo realizando una búsqueda a gran escala de mutantes de *Arabidopsis thaliana* cuyo reloj circadiano esté alterado.

<u>Materiales y Métodos</u>

MATERIALES Y METODOS

Búsqueda a gran escala de mutantes en A. thaliana

La búsqueda de mutantes cuyo reloj circadiano esté alterado, se realizó sobre una colección de semillas mutagenizadas al azar mediante la inserción de ADN foráneo: T-DNA. Esta, generada utilizando el ecotipo Columbia, cuenta aproximadamente con 20.000 líneas de mutantes independientes y se encuentra disponible en el ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*, Ohio State University, Columbia, USA). La colección es enviada al usuario fraccionada, es decir, en tubos que incluyen, cada uno, 100 líneas independientes de mutantes y 10 semillas de cada línea. Esto facilita la búsqueda, ya que sembrando un tubo, se evalúan 1.000 plántulas simultáneamente.

El T-DNA mencionado, ha sido construido con una serie de *enhancers* del virus del mosaico del coliflor, *35S*. Además, posee los elementos genéticos necesarios para insertarse en el genoma de la planta, y un minigen (región promotora – región codificante – terminador de la transcripción), que le confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio (BASTA). La presencia de dicho minigen, permite seleccionar fácilmente las plantas transgénicas. El T-DNA es transferido a la célula vegetal e introducido aleatoriamente al genoma de la misma por *Agrobacterium tumefacien*.

Las semillas fueron sembradas en cajas plásticas transparentes, sobre papel de filtro dispuesto por encima de un soporte de agar-agua al 0,8%. Las cajas fueron mantenidas durante 4-5 días en oscuridad a 4°C para reducir la dormición. Con el objetivo de inducir y sincronizar la germinación, las semillas fueron expuestas a 2 horas de luz blanca a 22°C, seguidas de 24 horas en oscuridad a 22°C. Posteriormente, las plántulas fueron cultivadas por 3 días en una cámara de cultivo emitiendo luz blanca provista por tubos fluorescentes Philips TLD 36W/54 a 22°C, con un fotoperíodo de 8 hs de luz, 16 hs de oscuridad, e irradiancia de aproximadamente 80 micromol.metro⁻².segundo⁻¹ (µmol.m⁻².s⁻¹). Una vez finalizado el tratamiento lumínico se seleccionaron, a simple vista, las plántulas que presentaban hipocotilos alargados en comparación con la media poblacional.

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en esta tesis son del ecotipo Columbia. Excepto que se indique lo contrario, las semillas se sembraron en cajas plásticas transparentes (40 x 33 mm, 15 mm altura) conteniendo 4 ml de agar-agua al 0,8% (p/v), y se incubaron por 3-4 días a 4°C en oscuridad para disminuir la dormición. Para inducir y sincronizar la germinación, las semillas se expusieron a luz blanca (2 horas) y luego se incubaron en oscuridad por 24 horas a 22°C antes de ser transferidas al correspondiente tratamiento.

Las plantas se cultivaron en macetas plásticas de 110 cm³ conteniendo una mezcla de perlita, vermiculita y turba (1:1:0,5), y el riego se realizó con solución nutritiva (Hakaphos Rojo, Compo) durante el período de crecimiento. La temperatura en las cámaras fue mantenida entre 22°C y 24°C. Las condiciones lumínicas en término de fotoperíodo e irradiancia, varía para cada experimento, por lo cual se detallará según corresponda.

Las mutantes empleadas fueron: *phyA-211*, *phyB* (SALK_069700), *cry1* (SALK_069292), *cry2-1*, *atprmt5-1* (SALK_065814), *atprmt5-2* (SALK_095085), *flc* (SALK_092716), *prr7-3* (SALK_030430), *prr9-1* (SALK_07551). Las semillas transgénicas que portan las construcciones *CAB2::LUC*, *TOC1::LUC* o *CCR2::LUC*, fueron gentilmente donadas por S. Harmer.

Las líneas "SALK" presentadas en este trabajo, provienen del *SALK Institute Genomic Analysis Laboratory* y son mutantes por inserción de T-DNA. La homocigosis de esa inserción fue verificada por PCR. Al realizar cruzamientos, se buscó en la progenie las plantas homocigotas para la mutación.

Experimentos fotomorfogénicos

Fuentes de luz y tratamientos lumínicos

La luz blanca fue provista por tubos fluorescentes Philips. El azul continuo fue suministrado por tubos fluorescentes de luz blanca filtrada por un filtro acrílico azul de 2 mm de espesor (Paolini 2031, La Casa del Acetato, Buenos Aires, Argentina). El rojo lejano continuo fue generado por cuatro lámparas incandescentes de 150 W (Philips

R95), en combinación con un filtro de agua (aislante térmico), un acetato rojo y seis filtros de acrílico azul (Paolini 2031). El rojo continuo fue provisto por diodos que emiten luz en el rango de 635-650 nm. Para lograr las distintas intensidades de azul, rojo lejano y rojo, se dispusieron hojas de papel blanco y liso sobre las cajas plásticas.

Medición del largo del hipocotilo

En este experimento, luego del pulso de luz que induce y sincroniza la germinación, se colocaron las cajas con las semillas en los tratamientos lumínicos por el lapso de tres días. Posteriormente, se midió el largo del hipocotilo con regla (precisión de 0,5 mm). Se realizaron 10 mediciones, a partir de las cuales se obtiene el promedio y se considera como una unidad experimental. Cada tratamiento cuenta con dos réplicas biológicas, y a su vez, se realizaron tres experimentos independientes (Fankhauser, C. & Casal, J., 2004).

Inhibición del gravitropismo negativo del hipocotilo modulado por la luz

Luego del pulso de luz que induce y sincroniza la germinación (igual al aplicado en los experimentos anteriores), se colocan las cajas en el correspondiente tratamiento lumínico, donde fueron dispuestas de modo que el agar quede en posición vertical. Pasados tres días de incubación en esas condiciones, se midió el ángulo del hipocotilo respecto del vector vertical con un transportador (precisión de 5 grados). Cada tratamiento consta de tres réplicas y de tres repeticiones independientes. El promedio calculado a partir de cada caja, fue considerado como una réplica (Fankhauser, C. & Casal, J., 2004).

Medición del porcentaje de germinación

Se sembraron 40 semillas por caja y fueron expuestas a un pulso de 10 minutos de rojo lejano para disminuir la forma activa del fitocromo, Pfr (formada durante el período que la semilla se encuentra en la planta madre) y transformarla en Pr. Luego, se transfirieron a 4°C por 3 días, se incubaron por dos horas en el tratamiento apropiado (rojo o rojo lejano) y finalmente, fueron transferidas a oscuridad. Después de 3 días, se contó el número de semillas germinadas de cada caja, considerando como germinadas

aquellas que presentan radícula. Se le restó el número de semillas germinadas del control de oscuridad. Cada caja fue considerada una réplica y cada tratamiento cuenta con 3 réplicas por genotipo. El experimento se repitió al menos, 3 veces.

Medición del tiempo a floración

Para los experimentos de tiempo a floración, se indujo la germinación de las semillas como se indicó previamente, y se colocaron en el fotoperíodo apropiado. Una vez establecidas las plántulas, éstas fueron transplantadas a las macetas mencionadas y crecidas según las condiciones descriptas. Los fotoperíodos empleados fueron: día corto (8 horas -H- de luz y 16H de oscuridad), día largo (16H de luz - 8H de oscuridad), y luz continua (24H de luz). La irradiancia fue ajustada en los distintos fotoperíodos para equiparar el total de micromoles de luz que reciben las plantas; así, independientemente de la cantidad de horas de luz, todas ellas reciben la misma cantidad de micromoles por día: 2 mol.metro⁻².día⁻¹. El número de hojas de la roseta fue determinado para cada planta, cuando el tallo principal alcanza 1 cm de alto. En cada experimento se cuantificaron las hojas de 10-15 plantas (como mínimo) para cada genotipo. Se realizaron, como mínimo, dos experimentos independientes. En los casos donde aparece el análisis estadístico, se realizó un análisis de la varianza de una vía (One way- ANOVA), seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples.

Análisis del reloj circadiano en A. thaliana

Medición del ángulo entre hojas

Con el objetivo de realizar este experimento, las semillas se sembraron directamente en macetas plásticas con forma de tubo (diámetro: 13mm, alto: 35mm) que contienen el sustrato ya especificado, y se colocaron en la condición de entrenamiento: fotoperíodo de día largo (16H de luz-8H de oscuridad). Después de aproximadamente 10-15 días, una vez que se detectó la aparición del primer par de hojas, las plántulas se transfirieron a condiciones de luz y temperatura continua, y se las fotografíó una vez por hora. Luego de terminado el experimento (alrededor de una semana de toma de imágenes), se procedió al análisis de los datos. Para ello, se midió el ángulo formado entre el primer
par de hojas, considerando como vértice de dicho ángulo, el ápice foliar que dio origen a las dos hojas. Esto se realizó empleando el *software ImageJ*.

Estimación del período

La estimación del período se realizó empleando el *software Brass 3.0*. Este programa calcula dicho parámetro aplicando el test de transformación no lineal de cuadrados mínimos *fast Fourier*, del inglés *fast Fourier transform–nonlinear least squares* (FFT-NLLS). Luego, se calcula el error (error estándar, representado en las figuras de esta tesis) y otro parámetro, denominado error de la amplitud relativa, que da idea de la confiabilidad de la oscilación de cierta respuesta, es decir, si realmente sigue un patrón circadiano. Estos cálculos pueden realizarse para cualquier respuesta medida.

Para comparar estadísticamente las diferencias observadas entre los distintos genotipos se realizó un análisis de la varianza de una vía (One way- ANOVA), seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples.

Medición de la bioluminiscencia

En este experimento las plántulas se cultivan directamente en medio Murashige & Skoog (Murashige, T. & Skoog, F., 1962), y en placas apropiadas para el uso en el luminómetro. Se siembra una semilla por pocillo, se coloca la placa en la condición de entrenamiento (en nuestros experimentos: fotoperíodo 12:12, 12H de luz-12H de oscuridad), y se permite que las plántulas emerjan. Después de aproximadamente 7 días, cuando se registra la aparición de los cotiledones, la placa completa se transfiere a condiciones de temperatura y luz (presencia o ausencia) continua, y se programa el luminómetro para que mida la bioluminiscencia emitida por cada plántula una vez por hora. Una vez terminado el experimento (alrededor de 5 a 6 días), se procede al análisis de los datos. Para ello, se emplea el *software Mikrowin 2000* (versión 4.29) (Mikrotek laborsysteme, Overath, Alemania). El luminómetro empleado es el modelo de microplacas, LB-960 (Berthold Technologies, Wildbad, Alemania).

Identificación de la mutación prmt5-5: Clonado posicional

El clonado posicional se realizó a partir de ADN extraído de plantas adultas, las cuales se cultivan tal como se describió anteriormente. La mutación que se deseaba identificar estaba en el ecotipo Columbia (Col). El fenotipo con el cual se buscó la co-segregación de los marcadores moleculares fue la floración tardía, evaluada en días largos. Ya que se conoce gran cantidad de marcadores moleculares que permiten distinguir Col de Landsberg *erecta* (L*er*), se eligió este otro ecotipo para realizar el mapeo. Los primers empleados para determinar los marcadores moleculares correspondientes a Col y/o L*er*, fueron diseñados a partir de la información disponible en el *TAIR* (*The Arabidopsis Information Resource*).

Para el mapeo grueso que permite identificar groseramente la ubicación de la mutación (por ejemplo, número de cromosoma y brazo izquierdo o derecho del mismo), se emplearon alrededor de 22 plantas con fenotipo, es decir, homocigotas para la mutación, ya que por datos genéticos, se sabe que la misma es recesiva. En relación a los marcadores moleculares, se utilizaron 20 que estuvieran distribuidos a lo largo de todo el genoma de *A. thaliana*. Para el mapeo fino se diseñaron, y emplearon 18 pares de primers. El número de plantas ronda en las 830, provenientes todas ellas de la población segregante (F2) obtenida de la cruza de *prmt5-5* (ecotipo Col) y Ler. En algunos casos, para lograr que los datos moleculares de esas plantas fueran informativos, hubo que estudiar la segregación del fenotipo en la siguiente generación (F3). El intervalo que contenía la mutación fue acotado a 430 kilobases. Según un análisis *in silico* a partir de la información disponible en el *TAIR*, se determinó que esa región contiene aproximadamente 160 loci.

Luego de identificar el gen candidato (At4g31120), se procedió a secuenciarlo con el fin de determinar si el mismo posee efectivamente alguna mutación, y de ser así, su ubicación y a qué clase pertenece. Para ello se diseñaron 13 pares de primers, que cubren el gen en cuestión, incluyendo 1700 pares de bases río arriba de su sitio de iniciación de la traducción y 650 pares de bases río abajo del codón de terminación.

Líneas de moscas y ensayos comportamentales

La línea mutante *dart5*, fue amablemente donada por el Dr. Greg Matera, mientras que la línea mutante *Csul*^{*RM50*}, fue provista por el Dr. Joël Anne. Antes de realizar los experimentos moleculares (qPCR, PCR radiactiva y *tiling-arrays*), la línea *dart5*, fue retrocruzada 5 veces por el genotipo salvaje w^{1118} , siendo éste último el empleado como control en tales experimentos. Las moscas w^{1118} fueron solicitadas al *Bloomington Stock Center*. Las mutantes *per*⁰¹ y *jrk* estaban disponibles en el laboratorio de la Dra. Fernanda Ceriani. Como esas mutantes se encuentran en el *background* genético de *yw*, fue ésta la línea utilizada como control.

Las moscas fueron crecidas y mantenidas a 25°C, bajo un régimen luz-oscuridad, con ciclos de 12:12. La actividad locomotora fue monitoreada bajo estas condiciones cíclicas por 4 días y luego, por 8 días en condiciones de oscuridad continua. Los datos fueron registrados por un monitor de actividad de *Drosophila* disponible comercialmente (TriKinetics, Waltham, MA). A partir de ellos, se construyeron actogramas de "trazado doble", donde los resultados de cada día se grafican por duplicado: una vez a continuación, y otra, por debajo de los datos del día previo. Esto facilita la lectura e interpretación de los mismos. La ritmicidad y el análisis *FFT* (del inglés, *fast Fourier transform*) se calcularon con el *software ClockLab* (Actimetrics, Evanston, IL), a partir de los datos colectados en condiciones de oscuridad continua. Aquellas moscas, cuya actividad locomotora presenta un pico simple sobre la significancia lineal en un test de *Chi* cuadrado (χ^2), fueron consideradas como rítmicas. Sin embargo, esto fue confirmado por inspección visual de los actogramas (Rezával, C. *et al.*, 2007). Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes. La comparación estadística de los datos, se realizó mediante un *t-test*.

Análisis de la expresión por PCR en tiempo real (qPCR)

Para el estudio de la expresión génica en *A. thaliana* mediante qPCR, el material biológico utilizado proviene de plántulas de aproximadamente 20 días, crecidas en macetas y según el tratamiento lumínico que se indica en cada caso.

Las muestras de *D. melanogaster*, fueron obtenidas a partir de moscas crecidas a 25°C en viales con alimento, entrenadas en un fotoperíodo de 12:12, y transferidas

luego a oscuridad constante. Durante el primer día en oscuridad continua, se recolectaron y homogeneizaron las cabezas de moscas, cada tres horas.

Con el fin de estudiar la expresión génica, el primer paso es purificar el ARN total del tejido de interés. Para ello, se utilizó RNeasy Miniprep kit (Quiagen) y TRIzol (Invitrogen) para las muestras provenientes de plantas y moscas, respectivamente. En ambos casos, se siguieron las instrucciones provistas por los fabricantes. El ARN purificado se sometió a un tratamiento con DNAsa, empleando la enzima RQ1 RNase-Free Dnase (Promega). A partir de 1 µg de ese ARN, se sintetizó cADN utilizando la enzima SuperScript III (Invitrogen) y oligo-dT primer.

La expresión de distintos genes fue medida, por PCR en tiempo real, la cual es una técnica semi-cuantitativa (del inglés: *quantitative* PCR; qPCR) y muy sensible. Para llevarla a cabo el cADN sintetizado previamente, fue amplificado utilizando SYBR Green Master (Roche) y el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Los genes *ACT* (*ACTIN8*) y *PP2A* (*Protein Phosphatase 2A Subunit A*) fueron empleados como control en la especie *A. thaliana*, para relativizar la expresión e independizarse de diferencias en la eficiencia de la reacción de retro-transcripción. En el caso de *D. melanogaster*, se usó como control el gen *ribosomal protein 49 (rp49*). El cálculo de la expresión se realizó utilizando una curva patrón.

Análisis global: Microarreglos de expresión en A. thaliana

Para realizar microarreglos de expresión, es necesario obtener el ARN total de las muestras vegetales a estudiar. En este caso, se utilizaron plantas cultivadas como se indicó anteriormente, pero en condiciones de luz y temperatura constante, sin la posibilidad de que el reloj circadiano se sincronice. Una vez que la roseta alcanzó las 8-9 hojas, antes de que florezcan, se cosechó la parte aérea. Cada réplica estuvo compuesta por 3-4 plantas crecidas en macetas distintas, y se obtuvieron 3 réplicas. Para obtener el ARN se procedió de la misma manera que para realizar qPCR. 5 µg de ARN correspondiente a cada muestra de genotipo salvaje o mutante, fue procesado e hibridado contra los microarreglos de expresión (Affymetrix: *GeneChip Arabidopsis ATH1 Genome Arrays*), según las instrucciones provistas por el fabricante. Fue posible comparar la señal de los microarreglos, después de normalizarla al promedio de la intensidad de la señal general de todas las sondas. Los datos se analizaron utilizando el algoritmo *MAS5*. Fueron sujeto de análisis, aquellos genes cuya señal resultó detectable en las 3 réplicas de al menos uno de los genotipos. La significancia estadística atribuible a la diferencia de señales, fue calculada empleando el *software SAM* (Tusher, V.G. *et al.*, 2001). Se realizaron dos clases de *t*-test no pareados sobre los valores de las señales, y para estimar la tasa de falsos descubrimientos, se utilizaron 100 permutaciones.

La distribución de fases de genes asociados al reloj fue evaluada utilizando el *software Phaser*, disponible en la página web de la Universidad del Estado de Oregon (http://phaser.cgrb.oregonstate.edu) (Michael, T.P. *et al.*, 2008a).

La categorización funcional de genes se realizó mediante la herramienta disponible en la página de internet de la universidad de Toronto, "*The Bio-Array Resource for Arabidopsis Functional Genomics*". Esta provee el valor absoluto de genes pertenecientes a cada categoría funcional, así como también la relación existente entre ese valor y el total de genes pertenecientes a esa categoría, presentes en el genoma.

Inmunoprecipitación secuencial de la cromatina (Re-ChIP)

Este experimento se realizó sobre plántulas de aproximadamente 20 días de desarrollo. Para ello, las semillas se sembraron en placas de Petry conteniendo medio Murashige and Skoog (Murashige, T. & Skoog, F., 1962), se estratificaron (4°C por 5 días), se dio un pulso de luz para inducir y sincronizar la germinación, y luego se incubaron en la condición de crecimiento: luz blanca y fotoperíodo 12:12. Pasados los 20 días, se cosechó cada genotipo y cada réplica por separado. Se realizaron al menos 2 réplicas biológicas por experimento, y al menos 2 experimentos independientes. El protocolo de la técnica de Re-ChIP fue adaptado a partir de trabajos previos (Métivier, R. *et al.*, 2003; Perales, M. & Mas, P., 2007), y ya ha sido publicado (Sanchez, S.E. *et al.*, 2010). La primera inmunoprecipitación se realizó con un anticuerpo anti-histona H4 y la segunda, con un anticuerpo anti-dimetil arginina simétrica (SYM10), ambos de la empresa Upstate Biotechnology. El ADN fue purificado usando "GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit" (General Electric) según el protocolo del fabricante. La

porción de ADN amplificada para *FLC*, corresponde a la región promotora (-523>-273), y se ha demostrado previamente que está sujeta a control epigenético (Bastow, R. *et al.*, 2004). Para evaluar el gen *PRR9*, se amplificaron dos regiones promotoras, -621>-443 y -61>83. Los productos de amplificación se corrieron electroforéticamente en un gel de agarosa, y fueron detectados por la tinción con SYBR green (Sigma-Aldrich) según las instrucciones del fabricante. Las imágenes fueron tomadas con el sistema *Kodak Digital Science*, y cuantificadas mediante los *softwares ImageQuant software* (Molecular Dynamics) y *Scion Image*. Vale mencionar que dentro del rango de ADN utilizado, esta técnica resulta semi-cuantitativa, pudiendo hacer una estimación de los productos amplificados.

Detección de distintas isoformas de splicing por PCR radiactiva

Para detectar las distintas isoformas de un mismo mensajero mediante PCR radiactiva, se procedió a realizar una reacción de PCR que contiene 1,5 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen), buffer 1X (suministrado por el proveedor de la Taq), 2 mM MgCl2, 200 μ M dNTPs, 2UCi [α -³²P]dCTP y 200 μ M de primers en un volumen final de 50 μ l. Como templado se utiliza cADN obtenido de la misma forma que para qPCR. El producto de amplificación obtenido se siembra en geles de acrilamida 8%, se realiza la corrida electroforética y se detecta por autoradiografía. Las cuentas radiactivas emitidas por cada banda se miden en un contador de centelleo (método de Cerenkov). Los primers empleados para amplificar los mensajeros del gen *per*, son los descriptos por John Majercak (Majercak, J. *et al.*, 2004).

Construcción de líneas sobre-expresantes (PRR9_B OX)

El primer paso para obtener las líneas sobre-expresantes es clonar la secuencia de interés en el vector adecuado, para luego transformar la planta huésped, donde el vector se integrará al genoma y producirá la sobre-expresión. El clonado se realizó utilizando la tecnología Gateway (Invitrogen). Esta, se basa en el sistema de recombinación sitio-específica del fago λ , la cual permite trasladar un segmento de ADN entre diferentes vectores, y mantener la orientación y el marco de lectura correcto, sin el uso de ligasas y

endonucleasas de restricción, lo que aumenta la eficiencia del clonado. La construcción de PRR9_B OX, se generó mediante la síntesis artificial del fragmento de ADN doble cadena de interés, esto es, desde el codón de iniciación hasta el codón STOP prematuro de la traducción que se forma tanto en la isoforma PRR9_B, como en la PRR9_D. Ese fragmento contiene también, los sitios de recombinación específica necesarios para emplear la tecnología Gateway. Este, se incubó con el vector de clonado pDON/Zeo en presencia de la enzima BP Clonase II. El plásmido resultante de la reacción de recombinación se utilizó para transformar bacterias electrocompetentes de la cepa DH-5a de Escherichia coli. Los clones positivos fueron seleccionados en placas con medio LB y el antibiótico zeocina (50 µg/ml). Después de confirmar la presencia del inserto, el plásmido se purificó utilizando Wizard miniprep DNA purification system (Promega) y se incubó con el vector de sobre-expresión pEarlyGate100 (Earley, K.W. et al., 2006) en presencia de la enzima LR Clonase II. El plásmido resultante fue clonado en bacterias DH-5α. Los clones positivos fueron seleccionados en placas con medio LB y el antibiótico espectinomicina (100 µg/ml), confirmados por colony PCR y secuenciados para confirmar su identidad y que no se han introducido mutaciones. Este vector binario fue purificado e introducido por electroporación en la cepa GV3101 de Agrobacterium tumefaciens. Luego, se transformaron plantas salvajes de Arabidopsis (ecotipo Columbia) siguiendo el método de "floral dip" (Clough, S.J., Bent, A.F., 1998). Las plantas transformadas fueron seleccionadas en medio Murashige and Skoog (Murashige, T. & Skoog, F., 1962) conteniendo 15 mg/litro del herbicida PPT (phosphinothricin o glufosinato de amonio). Se obtuvieron alrededor de 30 líneas transgénicas independientes (T1), a las cuales se les evaluó el funcionamiento del reloj circadiano y se cuantificó el nivel de sobre-expresión por qPCR. Vale aclarar que en los experimentos realizados para estimar el período del ritmo circadiano de las plantas PRR9_B OX, se utilizaron como control plantas transgénicas que también presentan resistencia a PPT, pero que llevan otra construcción, la cual no afecta al reloj circadiano, ni la expresión de PRR9 comparado con plantas salvajes.

Análisis global: tiling-arrays

Para realizar los *tiling-arrays* es necesario obtener ARN total de las muestras. Para ello, en *A. thaliana* se procedió igual que para los microarreglos de expresión, tanto a las condiciones de crecimiento de las plantas, como a la extracción de ARN. 5 µg de ARN correspondientes a cada muestra de genotipo salvaje o mutante, fueron procesados e hibridados contra los *tiling-arrays* (Affymetrix: *GeneChip*® *Arabidopsis Tiling 1.0R Array*), según las instrucciones provistas por el fabricante.

Para realizar los *tiling-arrays* en *D. melanogaster*, se utilizó el ARN purificado para los experimentos de qPCR. Sin embargo, una porción de cada una de las muestras provenientes de distintos momentos de la curva de tiempo, fue combinada, constituyendo una nueva muestra "combinada". Cada una de esas muestras, fue hibridada contra los *tiling-arrays* (Affymetrix: *GeneChip*® *Drosophila Tiling 1.0R Array*) según el procedimiento indicado por el vendedor.

La hibridación de las muestras arroja una enorme cantidad de datos, que requiere de un procesamiento complejo mediante *softwares* específicos, capaces de manipular toda la información obtenida simultáneamente, antes de poder concluir a partir de ellos. Por esto, el análisis de los datos obtenidos para ambos organismos, fue realizado por el Dr. Justin Borevitz y la Dra. Xu Zhang, ambos con experiencia previa en este área.

Así, el primer paso fue transformar logarítmicamente la intensidad de la señal de cada sonda. Luego se ajustó a un modelo lineal: intensidad = genotipo + error, donde el término genotipo contrasta salvaje y mutante. El arreglo "*The Arabidopsis tiling 1.0R array*", contra el cual fueron hidridadas las muestras de *A. thaliana*, ya había sido anotado previamente (Zhang, X. *et al.*, 2008). Por otro lado, la anotación para el arreglo de *D. melanogaster* (*Drosophila tiling 1.0R array*), fue "megablasteada" contra la versión 5 del genoma de *Drosophila*. Así, y restringiendo el número de oligonucleótidos según su nivel de apareamiento, se trabajó con un total de 2.930.433 sondas. Estas se mapearon sobre los ARNm anotados y se anotaron como exones, intrones, regiones intergénicas, o como sondas que exceden los límites de anotación de esa versión del genoma. Este último tipo de sondas, así como las que corresponden a regiones intergénicas, o aquellas que hibridan con múltiples transcriptos, fueron eliminadas del análisis del transcriptoma de *D. melanogaster*

Para el análisis del *splicing* de exones, se empleó la intensidad de señal de las sondas, corregida por la media de la expresión génica. La tasa de falsos descubrimientos fue determinada mediante 20 permutaciones (Zhang, X. *et al.*, 2008).

Análisis bioinformático de las secuencias dadoras de splicing

La frecuencia genómica de cada nucleótido para cada posición en la secuencia dadora del *splicing*, 5'SS, fue obtenida del sitio web *SpliceRack* (Sheth, N. *et al.*, 2006). La sub o sobre –representación de un nucleótido particular, con respecto a la frecuencia genómica y el valor *P*, fueron calculados utilizando el test hipergeométrico. La frecuencia de los nucleótidos fue representada en forma de pictogramas, los cuales se construyeron mediante el uso del *software WebLogo* (Crooks, G.E. *et al.*, 2004).

<u>Resultados</u>

RESULTADOS

Búsqueda de mutantes cuyo reloj circadiano se encuentre alterado

Con el objetivo de identificar nuevos componentes que participen o modulen el funcionamiento del reloj circadiano, se decidió realizar una búsqueda a gran escala de mutantes en la especie modelo Arabidopsis thaliana. Para ello, se utilizó una colección de semillas mutagenizadas al azar mediante la inserción de ADN foráneo (T-DNA), el cual ha sido construido con una serie de *enhancers* del virus del mosaico del coliflor, 35S. Esta colección, generada utilizando el ecotipo Columbia, cuenta aproximadamente con 30.000 líneas de mutantes independientes y se encuentra disponible en el ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center). Así, la inserción del T-DNA en el genoma, puede generar en la planta transgénica un fenotipo aberrante por distintas razones. En primer lugar, el enhancer 35S podría inducir la sobre-expresión de un gen endógeno; esto tiene dos ventajas comparado con la búsqueda de mutantes por pérdida de función: 1) existen genes que codifican para proteínas con redundancia funcional, por lo que su ausencia no necesariamente conduce a un fenotipo alterado, impidiendo así vincular esos genes a los procesos que regulan mediante mutantes nulas; la sobre-expresión, en cambio, suele conducir a fenotipos aberrantes; 2) la ausencia de algunos genes resulta letal para la planta, por ende, sólo se los podrá vincular a los mecanismos que regulan, mediante su sobre-expresión. Por otro lado, la integración del T-DNA puede interrumpir la secuencia de un gen, provocando entonces, una mutante del tipo de pérdida de función o de dominancia negativa, en el caso de expresar una proteína truncada. Luego de aislar las mutantes que presenten el fenotipo buscado, será de interés conocer el gen afectado y el tipo de mutación responsable del mismo.

Al momento de realizar la búsqueda, no se contaba en el laboratorio con herramientas que permitieran realizar un análisis rápido y eficiente a gran escala del funcionamiento del reloj circadiano, por ello, decidimos emplear una estrategia alternativa. Como se sabe, la inhibición del alargamiento del hipocotilo durante la desetiolación es una respuesta controlada tanto por la percepción de las señales lumínicas como por el reloj circadiano, y por la interacción entre esos dos mecanismos (Dowson-Day, M.J. & Millar, A.J., 1999). De esta forma, aislar plántulas que posean hipocotilo de distinta longitud comparado con el resto de la población, sugiere que esos individuos poseen una mutación en un gen que participa directa o indirectamente en los procesos citados anteriormente. Por otro lado, la elongación del hipocotilo es una respuesta de simple y rápida determinación. Así, decidimos que nuestra búsqueda consistiría en encontrar plántulas cuyos hipocotilos fueran "altos" (al menos, más altos que la media), en condiciones de crecimiento donde normalmente se maximizan las diferencias, esto es en ciclos de luz/oscuridad, en particular en fotoperíodos de día corto (DC: 8 hs de luz blanca y 16 de oscuridad).

Aproximadamente 5.000 líneas de T-DNA fueron sembradas, sometidas al tratamiento descripto y evaluadas. De cada línea, se siembran 10 individuos, por lo cual el número total de semillas analizadas es de alrededor de 50.000 (para más detalles referirse a "Materiales y Métodos"). Alrededor de 100 plántulas fueron seleccionadas por presentar hipocotilo alargado. La siguiente generación fue sometida al mismo análisis, para corroborar su fenotipo. Así aislamos, entre otras, la mutante *prmt5-5* (del inglés, *PROTEIN ARGININE METHYL TRANSFERASE 5*), cuya caracterización fisiológica y molecular, se presenta en esta tesis.

Caracterización inicial de la mutante

Con el objetivo de corroborar el fenotipo de la mutante aislada y obtener una caracterización inicial de la misma, se decidió evaluar la inhibición del alargamiento del hipocotilo durante la des-etiolación, debido a que ésta es una de las respuestas controladas tanto por el reloj circadiano como por la percepción de las señales



Fig. 7. La mutante *prmt5-5* es hiposensible a distintas longitudes de onda. Longitud del hipocotilo relativizado al valor obtenido en oscuridad para cada genotipo bajo distintas calidades de luz: luz roja (A), luz roja lejana (B) y luz azul (C). Los valores (n=6) representan la media y la barra de error, \pm el error estándar.

lumínicas. En particular, se estudió la capacidad de respuesta de la mutante *prmt5-5* frente a distintas longitudes de onda y bajo diferentes flujos lumínicos, en condiciones de luz continua. Como control del tratamiento, se midieron mutantes conocidas que son insensibles o hiposensibles a las respectivas longitudes de onda, esto es: la mutante para el gen *PHYTOCHROME B* (*phyB*) para rojo, *PHYTOCHROME A* (*phyA*) para rojo lejano y finalmente, para los genes *CRYPTOCHROME 1* y *CRYPTOCHROME 2* (*cry1* y *cry2* respectivamente) para azul. Por otro lado y como control de crecimiento, se cultivaron plantas en oscuridad y esos datos se utilizaron para relativizar las mediciones. En la Fig. 7 puede observarse que la mutante *prmt5-5* es hiposensible a las tres longitudes de onda probadas, al menos bajo determinadas irradiancias.

Para mejorar la caracterización de las respuestas fotomorfogénicas en la mutante *prmt5-5*, se evaluaron otros dos procesos fisiológicos relacionados con la percepción de la luz: la disrupción del gravitropismo negativo que presenta el hipocotilo durante la escotomorfogénesis y la germinación (Fig. 8). El experimento que permitió evaluar la respuesta gravitrópica se realizó de forma análoga al de la Fig. 7., empleando en este caso luz roja continua (R) y rojo lejana continua (RL). Es interesante aclarar que este experimento no se realizó en luz azul, ya que en ese caso, no podría estudiarse la inhibición del gravitropismo negativo del hipocotilo, debido a la inducción del fototropismo positivo mediado por las fototropinas (fotorreceptores de luz azul). Por otro lado, con el objetivo de medir el porcentaje de germinación, se utilizaron dos condiciones: un pulso de R o de RL de 2 Hs. Como se observa en la Fig. 8A y 8B la mutante *prmt5-5* también resulta hiposensible a la luz comparado con plantas salvajes,



Fig. 8. La mutante *prmt5-5* presenta reducida la inhibición del gravitropismo negativo, pero no diferencias en el porcentaje de germinación. Medición del ángulo formado entre el hipocotilo y la vertical en oscuridad (n=9), en luz roja (A) y roja lejana (B). C: Cálculo de porcentaje de semillas germinadas bajo tratamientos de oscuridad, con un pulso previo de rojo lejano o rojo (n=9). Los valores representan la media y la barra de error, el error estándar.

en la respuesta de inhibición del gravitropismo negativo mediado por luz. Esto se concluye a partir de la orientación que adoptan los hipocotilos al ser expuestos a rojo o rojo lejano, ya que si bien presentan un desvío de la posición vertical observada en oscuridad, no presenta el mismo grado de aleatorización que presentan las plántulas salvajes. Por otro lado, la Fig. 8C sugiere que el gen *PRMT5* no participa en el proceso de germinación, ya que no se observan diferencias significativas entre las plantas salvajes y las mutantes en ninguno de los tratamientos efectuados.

A continuación se decidió estudiar otros fenotipos de la mutante *prmt5-5*. Como puede observarse en la Fig. 9A la mutante *prmt5-5* presenta a simple vista algunas diferencias en relación a la planta salvaje (WT). Entre ellas pueden destacarse el color y la morfología de sus hojas, así como también el momento en el que florecen.

Controlar el momento en el que las plantas florecen, es fundamental para asegurar el éxito reproductivo de la especie. Como consecuencia, el tiempo que tardan en florecer está regulado por distintas señales, entre ellas, la vernalización y el fotoperíodo. Para medir el efecto de la mutación *prmt5-5* sobre el tiempo a floración, se usó como estimador de éste la cantidad de hojas presentes en la roseta al momento que el tallo principal alcanza 1 cm de alto, ya que de esa forma, se puede conocer el tiempo biológico que tarda en florecer independizándose de los defectos en el desarrollo (en particular la mutante *prmt5-5* crece lento). Para ello se crecieron plantas del genotipo salvaje (WT) y *prmt5-5*, en tres fotoperíodos: día corto, día largo (DL: 16 Hs. de luz - 8 Hs. de oscuridad), y luz continua. Tal como se ve en la Fig. 9B la mutante *prmt5-5*, presenta floración tardía con respecto a la planta salvaje en cualquiera de los tres fotoperíodos puestos a prueba.

Con el fin de evaluar el fenotipo circadiano de la mutante aislada, se realizó un experimento en el cual se mide el ángulo formado por el primer par de hojas de las plántulas y cómo éste va cambiando a lo largo del día. Para esto, se cultivan las plantas en determinado fotoperíodo, lo cual se conoce como período de entrenamiento (en nuestro caso fueron entrenadas en días largos). Una vez que alcanzan el estado de desarrollo apropiado (aproximadamente 10 días), se ubican en condiciones de "libre curso", es decir luz y temperatura continua, donde se realiza la medición. Tal como se

ve en la Fig. 9C la mutante *prmt5-5* presenta un período circadiano más largo que el de las plantas salvajes. Esto se deduce ya que durante las primeras horas del experimento ambas curvas parecen tener el mismo perfil, lo cual indica que no habría diferencias en la fase del oscilador endógeno. No obstante, al comparar lo que sucede luego, se ve que las curvas se desfasan debido a que la mutante presenta un período más largo y se va "atrasando" en relación al comportamiento de las plantas salvajes.



Fig. 9. El tiempo a floración y el ritmo del movimiento de hojas, se encuentran alterados en la mutante. A: *Arabidopsis thaliana* salvaje (WT, izquierda) y mutante *prmt5-5* (derecha) crecidas en día largo por dos meses. **B:** Medición de las hojas de la roseta en tres fotoperíodos distintos (n=22-24). **C:** Medición del ángulo formado por el primer par de hojas (en grados) cuando las plántulas son entrenadas en día largo y sometidas luego, a condiciones de libre curso (H: horas; n=6). Los valores representan la media y la barra de error, el error estándar.

Identificación del gen afectado

Tal como se explicó anteriormente, la búsqueda de plantas con fenotipo aberrante se realizó sobre una colección de mutantes disponible en el *Arabidopsis Biological Resource Center*, generadas por inserción aleatoria de ADN foráneo (T-DNA). Entonces, para identificar el gen alterado se probaron técnicas clásicas tales como TAIL-PCR (Liu, Y.G. et al., 1995) y PCR invertida (Zhou, A. et al., 2004), que permiten determinar la ubicación en el genoma del T-DNA. Sin embargo, luego de localizar el T-DNA, se determinó que el mismo no era el responsable del fenotipo observado debido a la falta de co-segregación inserto-fenotipo. A continuación, se realizó el cruzamiento con la planta salvaje del mismo ecotipo (Columbia), se obtuvieron plantas con el fenotipo caracterizado y sin la inserción de T-DNA identificada anteriormente. Sobre esos individuos, se determinó la ausencia de otras inserciones de T-DNA que pudieran ser responsables del fenotipo. Debido a nuestro interés por la mutante prmt5-5, cuyo fenotipo estaría dado por la alteración en un único locus según los datos obtenidos en experimentos de genética clásica, que coinciden con una segregación de tipo mendeliana y de carácter recesivo, se decidió utilizar la técnica de clonado posicional para determinar la localización y el tipo de mutación asociada al fenotipo observado. Las alteraciones genéticas que podrían encontrarse son: deleciones, mutaciones puntuales, o tal vez un re-arreglo o inserción de un fragmento de T-DNA, el cual podría no haberse detectado por las técnicas empleadas.

La técnica de clonado posicional se basa en el análisis de la co-segregación del fenotipo de interés con marcadores moleculares conocidos. Para llevarla a cabo es necesario obtener una población de plantas segregante que lleve marcadores moleculares distinguibles, además de la mutación a identificar. Para eso se realizó la cruza de la mutante prmt5-5 (ecotipo Col) con una planta salvaje del ecotipo Landsberg erecta (Ler). Para ubicar en qué cromosoma y en qué región se encuentra la mutación, se realizó un "mapeo grueso" en el que se emplearon alrededor de 22 plantas y 20 marcadores moleculares distribuidos a lo largo de todo el genoma de A. thaliana. A partir de ese análisis, se determinó que la mutación se localizaba entre las bases número 12 y 18 millones del cromosoma cuatro. El paso siguiente se basó en un mapeo más "fino", para lo cual se diseñaron marcadores aprovechando deleciones presentes en Ler y ausentes en Col ya descriptas en bases de datos públicas (The Arabidopsis Information Resource). Para ello se procedió con la siguiente metodología: se eligió el par de marcadores más cercanos a la mutación, pero que la "encierran", es decir, que se encuentran uno hacia el 5' y otro hacia el 3' de la mutación. Se diseñó un nuevo marcador ubicado entre los dos anteriores, determinando luego, si la mutación estaba río arriba o río abajo del nuevo marcador. Este procedimiento se repitió de manera iterativa, hasta diseñar 18 marcadores, acotando así el intervalo de ADN dentro del cual se localiza la mutación causante del fenotipo. Para la realización de este mapeo se utilizaron aproximadamente 830 plantas. Dado el carácter recesivo de la mutación, para que algunos de los individuos utilizados fueran "informativos", hubo que evaluar a partir de la segregación fenotípica de la siguiente generación si ambos alelos del locus a mapear eran salvajes, o se encontraban en heterocigosis. Cuando teníamos acotado el intervalo en el cual podía ubicarse la mutación aproximadamente a 430 kilobases, que comprenden alrededor de 160 loci, identificamos un gen candidato, el *At4g31120*, gracias a que la descripción bibliográfica del fenotipo de un mutante nulo para este gen era similar al fenotipo de la mutante *prmt5-5*. Sin embargo, el grupo de investigación del Dr. Chon K. (Wang, X. *et al.*, 2007), quien la describe, se centra en aspectos bioquímicos de la proteína codificada por ese gen, más que en la caracterización de procesos fisiológicos afectados en las plantas mutantes.

A continuación, se secuenció el gen candidato completo: desde 1700 pares de bases río arriba de su sitio de iniciación de la traducción hasta 650 pares de bases río abajo del codón de terminación de la traducción. De este modo, se determinó que la mutante *prmt5-5* posee una mutación puntual, la cual da origen a un codón de terminación de la traducción prematuro en el transcripto del gen *At4g31120*, el cual interrumpe el dominio funcional de la proteína (Fig. 10A y 10B). El locus mutado codifica para PRMT5 (del inglés, *PROTEIN ARGININE METHYL TRANSFERASE 5*), una enzima que cataliza la adición de grupos metilos al nitrógeno ubicado en el aminoácido arginina de otras proteínas y es la única metil transferasa simétrica descripta hasta el momento en *Arabidopsis thaliana (Liu, C. et al., 2010)*.

Con el objetivo de demostrar que el gen candidato es el responsable del fenotipo alterado de floración, se evaluó la respuesta de otros dos alelos mutantes para el gen *PRMT5* que llevan una inserción de T-DNA (Fig. 10A), los cuales están disponibles en el *ABRC*: *prtm5-1* y *prtm5-2*, ambos descriptos anteriormente como alelos nulos (Pei, Y. *et al.*, 2007). Como puede observarse en la Fig. 10C, los tres alelos mutantes para el gen *PRMT5* presentan diferencias significativas con respecto a plantas salvajes en el tiempo que tardan en florecer, pero no presentan diferencias significativas entre ellos. Por otro lado, como se indicó anteriormente, se sabe que la mutación responsable de los

fenotipos es recesiva. Entonces, sólo si ambos alelos del gen están afectados, se verá un fenotipo mutante. Empleando este razonamiento, si se cruza la mutante *prmt5-5* por la mutante *prmt5-1*, la descendencia inmediata (F1), presentará los mismos fenotipos que



Fig. 10. *PRMT5* es el locus responsable del fenotipo de floración tardía. A: Estructura del gen *PRMT5*. Los intrones están representados por líneas y los exones por rectángulos; las porciones grises indican regiones codificantes y las negras, no codificantes. Se muestran las distintas mutantes utilizadas en esta tesis: *prmt5-1* y *prmt5-2*, mutantes por inserción de T-DNA; y *prmt5-5*, mutante por una mutación sin sentido, cuyo cambio de base se representa en rojo. **B:** Esquema de la proteína PRMT5 (642 aa): el óvalo contorneado en verde representa el dominio funcional. La línea roja señala la posición del Stop prematuro codificado por la mutante *prmt5-5*. **C:** Medición de las hojas de la roseta para distintos genotipos. Los valores representan la media y la barra de error, el error estándar (*** *P*<0,001, n=20). **D:** *Arabidopsis thaliana* salvaje (WT), mutante *prmt5-5*, F1: [*prmt5-5* x *prmt5-1*] y mutante *prmt5-1* (de izquierda a derecha) crecidas en día largo por 45 días.

ambos parentales, sólo si ambos poseen alterado el mismo locus. Así, para confirmar por genética clásica que el fenotipo de floración se debe a la alteración del gen *At4g31120*, se realizó la cruza entre esos dos genotipos y se analizó la descendencia (Fig. 10D). Tal como era de esperar, se obtuvo un fenotipo similar al de ambos parentales, confirmando al gen *PRMT5* como responsable de la diferencia en el tiempo a floración, y blanco de nuestro clonado posicional.

No obstante, debido a que para realizar el clonado posicional el fenotipo que se empleó fue el de floración tardía, fue necesario evaluar si las alteraciones fotomorfogénicas y circadianas observadas en la mutante en estudio, estaban asociadas también a la mutación en el gen identificado. Para eso, se trabajó en paralelo con los tres alelos mutantes de *PRMT5*: *prtm5-1*, *prtm5-2* y *prtm5-5*. Con ellos se evaluó la inhibición del alargamiento del hipocotilo durante la des-etiolación y el período de movimiento de las hojas. En la Fig. 11 (A-C) se muestra el resultado del alargamiento del hipocotilo, relativizado al control cultivado en oscuridad. Este experimento se hizo de forma análoga al de la Fig. 7, pero sólo se analizó un flujo de luz para cada longitud



Fig. 11. *PRMT5* es el locus responsable de los fenotipos aberrantes de inhibición de la elongación del hipocotilo y el período circadiano. Medición del hipocotilo relativizado al valor obtenido en oscuridad, en luz roja (10 µmoles.m⁻².seg⁻¹) (**A**), roja lejana (15 µmoles.m⁻².seg⁻¹) (**B**) y azul (10 µmoles.m⁻².seg⁻¹) (**C**). **D**: Medición del ángulo formado por el primer par de hojas cuando las plántulas son entrenadas en día largo y sometidas luego, a condiciones de luz continua (H: horas). **E**: Estimación del período del reloj circadiano calculado a partir del ritmo del movimiento de hojas (*** p<0,001; ** p<0,01). Los valores representan la media y la barra de error, el error estándar (n=6).

de onda. Tal como puede observarse, el fenotipo hiposensible de *prmt5-5* a las tres calidades de luz empleadas es similar al que muestran los otros alelos mutantes de *PRMT5*. En la Fig. 11 (D y E) se muestra el ángulo formado por el primer par de hojas en condiciones de luz continua (plántulas entrenadas en días largos) y la estimación del período, tanto para plantas salvajes, como para los distintos alelos mutantes de *PRMT5*. Tal como puede observarse, no hay diferencias significativas entre *prmt5-5* y los mutantes *prmt5-1* y *prmt5-2*.

Estos resultados, en conjunto, sugieren que el gen *PRMT5* estaría involucrado no sólo en la floración, sino también en el control del reloj circadiano y en la respuesta fotomorfogénica.

Caracterización del reloj circadiano de la mutante

A continuación, con el objetivo de evaluar si el efecto observado en el reloj circadiano es general o si se restringe exclusivamente al movimiento de hojas, se analizaron otras respuestas. A nivel molecular, hay un grupo de genes muy estudiados cuya expresión oscila durante el día y se sabe que esa regulación está dada por el reloj circadiano. Entre ellos figuran CAB2, CCR2 y TOC1 como genes controlados por el reloj, de los cuales TOCI, también forma parte del oscilador central. Una herramienta muy utilizada para medir la expresión de estos genes se basa en clonar el promotor de cada uno de ellos río arriba de un reportero. En los últimos años, la luciferasa ha sido uno de los genes reporteros más empleados, ya que cuando esta enzima cataliza la oxidación de un sustrato agregado exógenamente (luciferina), emite fotones que pueden ser cuantificados como indicador del nivel de expresión del gen cuyo promotor se está estudiando. Esta es una técnica simple y sensible, que cuenta con una ventaja adicional, la posibilidad de medir un mismo organismo por períodos largos de tiempo, por ejemplo a lo largo de una semana, sin la necesidad de destruirlo para detectar la bioluminiscencia emitida. Por lo anterior, y con el objetivo de evaluar el perfil de expresión de los genes mencionados, se obtuvieron plantas que portan las construcciones necesarias, es decir, el promotor de cada uno los genes (CAB2, CCR2, y *TOC1*) río arriba de la luciferasa. Luego, se realizaron cruzas entre la mutante *prmt5-5* y plantas transgénicas para cada una de las construcciones. Finalmente, se seleccionaron en la segunda generación, aquellas plantas homocigotas tanto para la mutación en el gen *PRMT5*, como para el transgen. Las plántulas descendientes fueron entrenadas en un fotoperíodo de 12:12 (12 Hs. de luz y 12 Hs. de oscuridad) y sometidas a condiciones de libre curso. Como puede observarse en la Fig. 12A-C, la mutante *prmt5-5* muestra un período circadiano más largo que la planta salvaje en condiciones de luz continua para los tres genes estudiados. Esto sugiere que PRMT5 afecta el oscilador central y no sólo los "caminos de salida", ya que se ven alteradas respuestas fisiológicas (el movimiento de las hojas) y moleculares (la expresión de genes), e incluso se encuentra alterada la expresión de un gen central del reloj como lo es *TOC1*. Por otro lado, se puede notar que el efecto de *prmt5-5* sobre el período de *CCR2*, un gen cuya oscilación de la expresión en plantas salvajes se mantiene tanto en condiciones de luz como de oscuridad continua, es similar en ambas condiciones (Fig. 12C-D). Estos datos sugieren, que la mutante tendría afectado el oscilador central tanto en luz como en oscuridad,



Fig. 12. El ritmo circadiano de la expresión de genes vinculados con el oscilador central, se ve afectado en la mutante Medición de bioluminiscencia emitida por plántulas que llevan la construcción *CAB2::LUC* (**A**), *TOC1::LUC* (**B**) o *CCR2::LUC* (**C-D**), cuando éstas son entrenadas en fotoperíodo de 12:12 y sometidas luego, a condiciones de libre curso: luz (**A** - **C**) u oscuridad (**D**) continua; el tiempo se considera 0, cuando comienzan las condiciones de libre curso (H: horas). La bioluminiscencia se calculó como el valor detectado dividido el máximo. Los valores representan la media y la barra de error, el error estándar (n=6-10). Las barras blancas y rayadas, indican el día y la noche subjetiva, respectivamente. Las barras negras y grises, indican la noche y el día subjetivo, respectivamente.

siendo el gen *PRMT5* necesario para el correcto funcionamiento del mismo, aunque no indispensable para mantener la ritmicidad del organismo.

En siguiente lugar, se decidió evaluar la expresión de genes que forman parte del oscilador central mediante el uso de PCR en tiempo real (qPCR), una técnica cuantitativa y de alta sensibilidad. Los genes medidos fueron CCA1, LHY, y la familia de genes PRR (pseudo-response regulator): TOC1/PRR1, PRR3, PRR5, PRR7 y PRR9, cuyos transcriptos oscilan alternadamente controlando su propia expresión (Matsushika, A. et al., 2000; Farré, E.M. et al., 2005; Farré, E.M. & Kay, S.A., 2007) (ver introducción y Fig. 4). Para ello, se emplearon plántulas del genotipo mutante y salvaje, en distintas condiciones de entrenamiento. Por un lado, se emplearon plántulas crecidas y muestreadas en días largos (Fig. 13). Por otro lado, y con el objetivo de analizar el funcionamiento del reloj endógeno en condiciones de libre curso, se realizó el experimento cuyos resultados se muestran en la Fig. 14. En este caso, se midió la expresión de los genes de la misma forma que en la Fig. 13, con la diferencia que las plántulas fueron entrenadas en condiciones de luz-oscuridad (12 hs de luz y 12 hs de oscuridad) y luego situadas en condiciones de libre curso, donde el perfil de expresión de los genes depende exclusivamente del reloj endógeno. Este experimento permite visualizar efectos que pasan desapercibidos en condiciones de entrenamiento, en las que los estímulos re-sincronizan diariamente al reloj. Como muestra la Fig. 13, todos los genes estudiados parecen tener su pico de expresión retrasado en prmt5-5 en relación a lo observado en la planta salvaje. En la Fig. 14 se observa que todos estos genes oscilan en la mutante con un período más largo que el de la planta salvaje. Con respecto a los niveles de expresión, la Fig. 13 sugiere que los mensajeros de CCA1 y LHY se encontrarían en menor abundancia. Sin embargo, eso no se observa en condiciones de libre curso (Fig. 14A-B). Esto último, sumado a reportes previos que indican que la ausencia de alguno de estos genes conduce a plantas de período corto (Green, R.M. & Tobin, E.M., 1999; Alabadí, D. et al., 2002), es poco probable que la diferencia observada tenga algún significado fisiológico. Por otro lado, en las dos condiciones estudiadas, PRR9 presenta en prmt5-5 niveles elevados de expresión. A partir de los datos hasta aquí presentados, no es posible determinar, si el aumento en la expresión de este gen es causa o consecuencia del fenotipo circadiano observado. A pesar de esto, se sabe que la sobre-expresión constante de *PRR9* provoca plantas de período corto



Fig. 13. PRMT5 afecta el momento de expresión de genes del oscilador central en condiciones de luzoscuridad. Expresión de *CCA1* (A), *LHY* (B), *TOC1* (C), *PRR3* (D), *PRR5* (E), *PRR7* (F) y *PRR9* (G) medida por la técnica de PCR en tiempo real en plántulas crecidas en días largos. Los datos fueron relativizados a los valores registrados para el gen *ACTIN8* y normalizados al máximo de cada gen. Los datos representan la media y la barra de error, el error estándar (n=5). El tiempo en día largo se considera 0, cuando comienza el período de luz (H: horas).



Fig. 14. PRMT5 afecta el momento de expresión de genes del oscilador central en condiciones de libre curso. Expresión de CCA1 (A), LHY (B), TOC1 (C), PRR3 (D), PRR5 (E), PRR7 (F) y PRR9 (G) medida por qPCR en plántulas entrenadas en ciclos de luz-oscuridad y luego sometidas a condiciones de luz continua. Los datos fueron relativizados a los valores registrados para el gen de ACTIN8 y normalizados al máximo de cada gen. Los datos representan la media y la barra de error, el error estándar (n=4). El tiempo se considera 0, cuando comienza el período de luz continua; H: horas. Las barras blancas y rayadas, indican el día y la noche subjetiva, respectivamente.

(Matsushika, A. *et al.*, 2002), mientras que la mutante de *prmt5-5* posee un período circadiano más largo. Esto se profundizará en la sección "PRMT5 y su relación con *PRR9*".

En síntesis, los datos de las Fig. 13 y Fig. 14, coinciden con lo observado para los otros fenotipos circadianos (Fig. 9 y Fig. 12), es decir, que la mutante posee un período largo (alrededor de 27,5 horas). Así también, estos experimentos permiten concluir, que en la mutante *prmt5-5* el oscilador central está afectado, ya que se encuentra alterada la expresión de genes centrales del reloj, de los cuales depende el correcto funcionamiento del mismo.

Dado que PRMT5 parece regular de alguna forma el oscilador central, nos preguntamos si la propia expresión del gen *PRMT5* estaría controlada por el reloj circadiano. La estrategia empleada para responder esta pregunta, fue medir la abundancia de ARNm de *PRMT5* mediante la técnica de qPCR, en distintos momentos del día. Para ello, se realizaron dos curvas de tiempo: una en condiciones de libre curso, y otra en ciclos de luz-oscuridad, bajo fotoperíodos de día corto, donde se sabe que *PRMT5* muestra mayor expresión (Michael, T.P. *et al.*, 2008b). Como puede apreciarse en la Fig. 15, los niveles de expresión de *PRMT5* oscilan en ambas condiciones, lo cual



Fig. 15. *PRMT5* presenta un perfil circadiano de expresión. Expresión de *PRMT5* medida por qPCR en plántulas crecidas en ciclos de luz-oscuridad (Día Corto; **A**) o cuando éstas son entrenadas en fotoperíodo 12:12 y sometidas luego, a condiciones de luz continua (**B**); el tiempo se considera 0, cuando comienza el último período de luz. H: horas. Los datos fueron relativizados a los valores registrados para el gen *ACTIN8* y normalizados al máximo; éstos representan la media y la barra de error, el error estándar (n=4). Las barras blancas y rayadas, indican el día y la noche subjetiva, respectivamente. La barra negra indica el período de oscuridad.

sugiere que podría formar parte de un circuito (o *loop*) regulatorio del reloj circadiano desconocido hasta el momento.

Análisis a gran escala: cambios de expresión globales en la mutante

La función bioquímica de PRMT5, es decir, la capacidad de transferir grupos metilos a las argininas presentes potencialmente en cualquier proteína celular, tanto en núcleo como en citoplasma, convierte a esta enzima en un poderoso factor de regulación. De hecho, se sabe que es capaz de metilar histonas, y que esto controla epigenéticamente la expresión del gen FLC (Wang, X. et al., 2007; Schmitz, R. et al., 2008). Esto nos hace suponer, que la diversidad de fenotipos observados podría deberse, al menos en parte, a que existe una gran cantidad de genes regulados por PRMT5, ya sea a través de la metilación de las histonas asociadas a sus promotores, o a través de algún mecanismo indirecto. Entonces, con la intención de identificar cuáles son los genes cuya expresión es controlada por PRMT5, directa o indirectamente, y a su vez, que eso nos permita mejorar nuestro entendimiento sobre el rol de PRMT5 a nivel celular y los fenotipos asociados, decidimos analizar los cambios globales en la expresión de miles de genes en la mutante prmt5-5 y compararlos con el nivel de expresión de la planta salvaje. Para ello llevamos a cabo un experimento de microarreglos. Debido a que la mutante prmt5-5 posee un período circadiano más largo que el de las plantas salvajes, muestrear en un punto particular del día podría llevarnos a conclusiones erradas, ya que los perfiles de expresión en un genotipo y otro serán distintos, no necesariamente porque ese gen sea regulado por PRMT5, sino porque está bajo el control del reloj circadiano. Para evitar este inconveniente se realizó el experimento utilizando plantas crecidas en luz continua sin previo entrenamiento, es decir, que no hubieran recibido estímulos capaces de sincronizar su reloj circadiano, independizando así los niveles de expresión génica del funcionamiento del oscilador central. Después del análisis estadístico, se establecieron dos grupos de genes: aquellos cuya expresión se encuentra aumentada al menos 1,5 veces en prmt5-5 respecto de la planta salvaje (355 genes - Tabla 1 del Apéndice), y aquellos cuya expresión se encuentra disminuida al menos 1,5 veces (190 genes – Tabla 2 del Apéndice). Luego, se decidió realizar una categorización funcional de ambos grupos de genes. Para ello se

utilizó la herramienta disponible en la página de internet de la universidad de Toronto, "The Bio-Array Resource for Arabidopsis Functional Genomics", que permite calcular: 1) el número de genes pertenecientes a cada categoría funcional; 2) si la cantidad de genes dentro de cierta categoría se encuentra sub o sobre-representada en relación al número total de genes pertenecientes a ese rubro, presentes en todo el genoma de Arabidopsis thaliana. Esto permitiría vincular a la mutante con determinado grupo de genes blanco y así entender en qué procesos está involucrada. Como puede verse en la Fig. 16A, donde se analizan los genes cuya expresión está aumentada en prmt5-5 comparado con plantas salvajes, las categorías de "Unión a Acidos Nucléicos" y "Unión a ADN o ARN", entre otras, se encuentran sobre-representadas. En el análisis de los genes disminuidos en prmt5-5, Fig. 16B, puede notarse que, entre otras, la categoría "Metabolismo de ADN o ARN" se encuentra sub-representada. Estos datos, coinciden con lo esperado, ya que existe bibliografía que vincula a PRMT5 con el procesamiento de ARN (Friesen, W. et al., 2001) y, como ya se ha discutido, con la metilación de histonas. Por otro lado, genes involucrados en procesos vitales para la supervivencia de la planta, como lo son los procesos de desarrollo, la respuesta a distintos estímulos y



Fig. 16. Categorización funcional de genes cuya expresión es regulada por PRMT5. Genes cuya expresión aumenta (**A**) o disminuye (**B**) en *prmt5-5*. Se encuentran representadas las categorías funcionales que estarían sub o sobre-presentadas en relación al genoma de *Arabidopsis thaliana*. Este valor se calcula normalizando el porcentaje de genes afectados en *prmt5-5* pertenecientes a una categoría funcional al porcentaje de genes de todo el genoma pertenecientes a esa misma categoría funcional. El error se calcula aplicando el método de *bootstrap* y se representa \pm la desviación estándar.

funciones bioquímicas esenciales, se encuentran alterados. Esto sugiere, al igual que los datos fisiológicos obtenidos hasta ahora, que PRMT5 es una enzima involucrada en la regulación de diversos procesos.

A continuación, se decidió analizar si existe alguna relación entre los genes regulados por PRMT5 y aquellos cuya expresión se encuentra bajo el control del reloj circadiano. Para esto se eligieron aquellos genes cuya expresión se ve alterada al menos 1,5 veces en la mutante *prmt5-5* y aquellos ya identificados como regulados por el reloj (Edwards, K.D. *et al.*, 2006). La fase de cada uno de estos genes se encuentra disponible (Michael, T.P. *et al.*, 2008a), y fue estimada a partir de datos obtenidos en condiciones de libre curso (segundo y tercer día en luz continua). El cálculo de sobre-representación



Fig. 17. Distribución de fase de aquellos genes regulados por el reloj circadiano y cuya expresión se ve alterada en plantas mutantes para *prmt5-5*. Nivel de enriquecimiento para distintas fases de genes cuya expresión oscila de manera circadiana y su expresión se encuentra aumentada (A) o disminuída (B) en *prmt5-5* (H, horas). Valor Z calculado para el enriquecimiento en cada fase de aquellos genes aumentados (C) o disminuídos (D) en *prmt5-5*. El análisis se realizó con aquellos genes cuya expresión cambia al menos 1,5 veces en *prmt5-5* respecto de las plantas salvajes y posee regulación circadiana. El valor Z es un parámetro que permite determinar el valor estadístico del enriquecimiento. Valores de Z cercanos o superiores a 3 indican un enriquecimiento significativo de los datos observados en relación a la media esperada por azar.

para cada fase se realizó con el *software Phaser*, disponible en la página de internet de la Universidad *Oregon State*. Tal como puede observarse en la Fig. 17, dentro de los genes cuya expresión aumenta en la mutante, existe un enriquecimiento en aquellos cuyo pico de expresión se da durante el día subjetivo de la planta. De manera opuesta, el grupo de genes cuyo nivel de expresión disminuye en la mutante, presenta un enriquecimiento en aquellos cuya fase de expresión se da durante la noche subjetiva. Esto sugiere, que PRMT5 podría contribuir a modular el perfil transcripcional de los genes bajo el control del reloj circadiano. Por ello, sería de crucial importancia el control que ejerce el reloj sobre la propia expresión de *PRMT5*.

Por otro lado, se analizó si alguno de los genes asociados al reloj circadiano, ya sea aquellos que componen el oscilador central, o los que forman parte de los circuitos de regulación secundarios, presentan diferencias significativas en su expresión al comparar plantas salvajes y mutantes *prmt5*. Los únicos 2 genes afectados resultaron ser *PRR7* y *PRR9*, presentando ambos aumento de expresión en la mutante *prmt5*. La implicancia de este resultado se profundizará en la sección "PRMT5 y su relación con *PRR9*".

Finalmente, tal como se había reportado anteriormente (Pei, Y. *et al.*, 2007; Wang, X. *et al.*, 2007; Schmitz, R. *et al.*, 2008), se detectó en la mutante *prmt5-5* un incremento en la expresión del gen *FLC* de alrededor de cinco veces. *FLC* codifica para una proteína del tipo MADS box que retrasa la floración al estar incrementados sus niveles y ha sido previamente asociada al funcionamiento del reloj circadiano en altas temperaturas (Edwards, K.D. *et al.*, 2006). Por esto, decidimos obtener la doble mutante *flc; prmt5-5*, con el fin de determinar si alguno o todos los fenotipos observados están asociados al aumento en la expresión de *FLC*. Como puede observarse en el experimento de tiempo a floración (Fig. 18A), introducir la mutación *flc* en el genotipo *prmt5-5*, es decir, la doble mutante *flc; prmt5-5*, rescata parte del fenotipo salvaje, sin embargo, no lo hace completamente. Esto indica que parte del fenotipo aberrante se debe al aumento de la expresión de *FLC*, pero que también habría algún otro mecanismo involucrado en el retraso de la floración. Posteriormente, evaluamos el funcionamiento del reloj circadiano, dejando en evidencia que el alargamiento del período circadiano observado en *prmt5-5* es independiente de FLC, ya que la doble

mutante *flc; prmt5-5* también presenta un período circadiano más largo que el de plantas salvajes y no presenta diferencias significativas con *prmt5-5* (Fig. 18B-C).



Fig. 18. FLC es parcialmente responsable del fenotipo de floración, pero no del alargamiento del ritmo circadiano en la mutante *prmt5-5*. A: Medición de las hojas de la roseta presentes en el momento de aparición de los primeros pimpollos; fotoperíodo: día largo (n=22-24). B: Medición del ángulo formado por el primer par de hojas (en grados) cuando las plántulas son entrenadas en día largo y sometidas luego, a condiciones de luz continua (H: horas, n=6). C: Período del reloj circadiano calculado a partir del ritmo del movimiento de hojas (****P* <0,001; ***P* <0,01; n=6). Los valores representan la media y la barra de error, el error estándar.

PRMT5 y su relación con PRR9

Al evaluar la lista de genes cuya expresión se ve aumentada en la mutante *prmt5-5* en el experimento de microarreglos, encontramos que aquel que muestra mayor cambio es *PRR9*, aumentando 6,5 veces el nivel de su expresión (Fig. 19). Esto coincide cualitativamente con los datos obtenidos por qPCR (Fig. 13 y Fig. 14). Por ello, y sabiendo que PRMT5 regula epigenéticamente la transcripción génica, decidimos evaluar si el promotor de *PRR9*, presenta dimetilación simétrica (sDMA) en la/las arginina/s de la histona 4 (H4). Para ello, empleamos la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (del inglés, *Chromatine Immunoprecipitation* – ChIP), la cual consta de dos etapas: la inmunoprecipitación de la cromatina asociada a una proteína y luego, la determinación de presencia o ausencia de una secuencia de ADN candidata en ese precipitado. En nuestro caso, se realizaron dos inmunoprecipitaciones (Re-ChIP). En primer lugar, una dirigida contra la histona 4, y en segundo lugar, una precipitación



Fig. 19. Expresión de *PRR9***.** Niveles de expresión obtenidos para el gen *PRR9* mediante la técnica de microarreglos para plantas salvajes y mutantes *prmt5-5***.** Los datos representan la media y la barra de error, el error estándar (n=3).

contra aquellas moléculas que estuvieran dimetiladas simétricamente. Como sustrato para las inmunoprecipitaciones se emplearon plántulas del genotipo salvaje y mutantes prmt5-5, crecidas en condiciones de luz-oscuridad (fotoperíodo 12:12) y cosechadas en dos momentos contrapuestos del día: a las 8 y a las 20 horas, donde la expresión de PRMT5 en las plantas salvajes, es máxima y mínima respectivamente. De esta forma, se obtuvieron los resultados presentes en la Fig. 20. En ellos se observa que en plántulas salvajes, hemos sido capaces de inmunoprecipitar la región promotora de FLC, lo que sugiere la interacción de moléculas de histona 4 dimetilada simétricamente con la región regulatoria de dicho gen. Sin embargo, no hemos detectado la presencia de dicha marca en histonas asociadas al promotor de PRR9, independientemente del momento del día. Sorprendentemente, en la mutante prmt5-5, aunque en menor medida, se detecta marca de dimetilación simétrica, lo cual podría explicarse por redundancia génica, es decir, que exista en A. thaliana, otra PRMT del tipo II capaz de dimetilar simétricamente la histona 4 incluso en ausencia de PRMT5. En Drosophila melanogaster y en células humanas, se ha demostrado que PRMT7 posee esa actividad bioquímica (Lee, J.H. et al., 2005; Gonsalvez, G.B. et al., 2008; Reiter, R.J. et al., 2010), sin embargo, aunque existe en Arabidopsis thaliana una proteína homóloga a la



Fig. 20. Dimetilación simétrica por PRMT5. La dimetilación simétrica en H4 asociadas a regiones regulatorias de *PRR9* y *FLC* fue evaluada mediante un ensayo de Re-ChIP, en dos momentos del día: a las 8 y a las 20 horas (H), siendo 0, el comienzo de la etapa lumínica. Se muestran bandas representativas obtenidas a partir de PCR convencional. (-), control sin ADN. (+), control donde se emplea como templado la cromatina aislada sin precipitar.

PRMT7 de moscas, no se ha demostrado que ésta posea la misma actividad enzimática. Más allá de lo observado en *prmt5-5*, los datos sugieren que el control que ejerce PRMT5 sobre los niveles de expresión de *PRR9*, no estaría dado a través de la metilación de histonas.

Independientemente del mecanismo por el cual PRMT5 regula la expresión de PRR9, resulta llamativo encontrar este aumento en los niveles de mensajero de dicho gen, ya que, datos previos indican que sobre-expresar PRR9 genera plantas de período corto tanto en caracteres moleculares como fisiológicos (Matsushika, A. et al., 2002), mientras que la mutante prmt5-5 posee período largo. En función de esta aparente incongruencia, y teniendo presente que PRMT5: 1) ha sido asociada a la metilación de proteínas Sm del spliceosoma (complejo que cataliza el splicing) en Drosophila melanogaster (Gonsalvez, G. et al., 2006; Anne, J. et al., 2007); 2) en células humanas, actúa junto con el complejo SMN (Survival Motor Neuron) regulando el ensamblado del spliceosoma (Chari, A. et al., 2008); y 3) en ratones, mutaciones en SMN, afectan el splicing alternativo de manera específica (Zhang, Z. et al., 2008), decidimos evaluar las bases de datos que poseen información sobre los transcriptos presentes en Arabidopsis thaliana. Esto, reveló que PRR9 posee más de un transcripto maduro (Fig. 21A). Puede observarse que existen dos eventos distintos de *splicing* alternativo, que al combinarse, dan origen a cuatro isoformas posibles: el empleo de un sitio dador 5' alternativo en el segundo exón, y la retención del tercer intrón. Entonces, decidimos confirmar la presencia de esas variantes de *splicing* en nuestras condiciones de crecimiento. Con tal fin, comenzamos una colaboración con el grupo de investigación del Dr. Alberto Kornblihtt, en particular con el Lic. Ezequiel Petrillo, quienes cuentan con basta experiencia en el estudio del splicing alternativo y las técnicas apropiadas para su estudio. En la Fig. 21A se representan las isoformas de PRR9 y los tamaños de las bandas correspondientes, en función de los primers que se utilizarán para su detección durante la reacción de PCR radiactiva. Como se muestra en la Fig. 21B, la existencia de las cuatro isoformas predichas para el gen PRR9. En la Fig. 21B, y en la correspondiente cuantificación (Fig. 21C), puede observarse que en plantas salvajes, el transcripto que cuenta con mayor abundancia es PRR9_A, el cual da origen a la proteína de largo completo, ya que las otras tres isoformas de PRR9 (PRR9_B a PRR9_D), codifican proteínas truncadas. En oposición a esto, la mutante prmt5-5 muestra



Fig. 21. PRMT5 afecta el splicing alternativo de *PRR9.* **A**: Esquemas de las distintas isoformas de *PRR9 (PRR9_A a PRR9_D)* y sus respectivos tamaños. **B**: Medición de las variantes de ARNm de *PRR9* por PCR radiactiva. **C**: Cuantificación de (**B**) y cálculo de la relación entre la isoforma A y el total de las isoformas detectadas para *PRR9.* **D**: Medición de las variantes de ARNm de *PRR9* por PCR radiactiva en plantas salvajes, y mutantes *prmt5-5* y *prmt5-1*, otro alelo mutante de *PRMT5*. Expresión de *PRR9_A* (**E**) y *PRR9_D* (**F**) medida por qPCR en plántulas entrenadas en ciclos de luz-oscuridad (12:12) y luego sometidas a condiciones de luz continua. Los datos fueron relativizados a los valores registrados para el gen *ACTIN8* y normalizados al máximo de cada gen. Los datos representan la media y la barra de error + el error estándar. El tiempo (H: horas), se considera 0, cuando comienza el período de luz continua. Las barras blancas y rayadas, indican el día y la noche subjetiva, respectivamente (n=4). **C,E-F**: Los valores representan la media y la barra de error, el error estándar (**C**: ****P*<0,0001).

mayor abundancia de *PRR9_D*. A continuación, nos preguntamos si la diferencia observada en el procesamiento del transcripto primario de *PRR9*, sería debido al rol de PRMT5, o alguna característica particular del alelo mutante en estudio, *prmt5-5*. Con el fin de resolver esta duda, realizamos un experimento análogo al anterior, en el que se evaluó la presencia de las distintas isoformas de *PRR9*, en plantas salvajes y en dos alelos mutantes de PRMT5, *prmt5-5* y *prmt5-1*, todas ellas crecidas en luz continua, sin entrenamiento previo. El resultado obtenido, a pesar de haber empleado un gel de menor resolución, que no logra distinguir entre el uso alternativo del sitio dador 5', permite de todas formas confirmar, que las diferencias observadas en el *splicing* alternativo de *PRR9*, son atribuibles a PRMT5, ya que en la Fig. 21D, se evidencia que la proporción entre las isoformas es equivalente para ambos alelos mutantes de *PRMT5*, y es a su vez, distinta de la que presentan las plantas salvajes.

Dado que los experimentos anteriores se realizaron sobre plantas crecidas en condiciones de luz continua, sin previo entrenamiento, se decidió evaluar por qPCR la expresión de las dos isoformas mayoritarias (*PRR9_A* y *PRR9_D*) en los genotipos salvaje y *prmt5-5*, a lo largo de un día en condiciones de libre curso, después de haber sido entrenadas en un fotoperíodo de 12:12. Como puede observarse en la Fig. 21E y F, las plantas salvajes, presentan un patrón de expresión de *PRR9_A* equivalente al observado para *PRR9* total (Fig. 14G), mientras que apenas se detecta expresión de *PRR9_D*. En contraposición a esto, la mutante *prmt5-5*, presenta menores niveles de *PRR9_A* y un perfil circadiano distinto al de las plantas salvajes, dado que el pico de expresión se ve desfasado con respecto a éstas últimas. Asimismo, puede notarse que los niveles de expresión de *PRR9_D* son más altos en la mutante, a pesar de estar regulados de manera circadiana.

A partir de los resultados anteriores, y sabiendo que hay ejemplos de proteínas que al expresarse de manera truncada actúan como dominantes negativos (Faigon-Soverna, A. *et al.*, 2006), decidimos evaluar si el aumento de *PRR9_D* puede explicar la alteración del reloj circadiano observada en las mutantes *prmt5*. Para llevar a cabo ese análisis, se construyeron a partir de plantas salvajes, líneas transgénicas que portan una construcción que permite sobre-expresar la proteína truncada codificada por *PRR9_B* y por *PRR9_D*, ya que ambos mensajeros poseen la misma región codificante debido a un codón prematuro. En primer lugar, se obtuvieron alrededor de 30 líneas T1

independientes (*PRR9_B OX*). A continuación, se estableció el período del movimiento de hojas de esas líneas, usando como control plantas salvajes y se cuantificó, mediante qPCR, el nivel de expresión de *PRR9* (endógeno más exógeno). Luego, se calculó el valor medio de la expresión para plantas salvajes, y se empleó para normalizar el nivel de expresión de *PRR9* de todas las muestras. En la Fig. 22, se grafica este experimento (en ese caso, n=5). Como puede observarse, el período de las plantas transgénicas no se ve alterado comparado con el de las salvajes, a pesar de tener aumentada la expresión de *PRR9_B*. Esto indica, que la sobreexpresión de una forma truncada de la proteína PRR9 no sería responsable del fenotipo aberrante observado en las mutantes *prmt5*. De este modo, a pesar de los altos niveles de expresión de *PRR9* detectados en *prmt5*, la mutante presenta niveles reducidos del transcripto que codifica para la proteína funcional (por tener afectado el *splicing* alternativo), lo cual podría conducir a menores niveles de la proteína funcional y contribuir así, con el fenotipo de período largo observado en la mutante.

A continuación, nos preguntamos si el efecto de PRMT5 sobre el reloj se da exclusivamente a través de PRR9. Para responder ese interrogante, obtuvimos las dobles mutantes *prr9;prmt5*, y analizamos el funcionamiento del reloj circadiano calculando el período del movimiento de hojas. Como puede observarse en la Fig. 23, la mutación



Fig. 22. La sobre-expresión de *PRR9_B* no afecta el ritmo circadiano del movimiento de las hojas en plántulas de *A. thaliana*. Período circadiano (H: horas) calculado a partir del movimientos de las hojas en condiciones de libre curso, en plántulas salvajes y sobre-expresantes de *PRR9_B*. Las plantas que sobreexpresan *PRR9_B* son líneas T1 independientes. El período se grafica en función del nivel de expresión de *PRR9*, tanto de las isoformas endógenas como exógenas, medido por qPCR. Los valores fueron relativizados a *PP2A* y normalizados a la media obtenida para las plantas salvajes. La línea de puntos, indica el valor de la media del período de plantas salvajes.

prmt5-5 prolonga el período del reloj circadiano, tanto en *prr9*, como en plantas salvajes. Esto indica que el efecto observado sobre el oscilador, no se debe exclusivamente a la alteración en la regulación de *PRR9*. Puesto que PRR9, presenta redundancia funcional con PRR7, decidimos evaluar el efecto de *prmt5*, sobre el doble mutante *prr7;prr9*. Tal como indica la Fig. 23, el período del movimiento de las hojas de plantas mutantes *prr7;prr9* es significativamente mayor al período de plantas salvajes, pero no presenta diferencias significativas con el de la triple mutante *prr7;prr9;prmt5*. También puede observarse que sí existen diferencias significativas entre *prr7 y prr7;prmt5*. En conjunto, los experimentos de genética clásica sugieren que el rol de PRMT5 sobre los ritmos circadianos, estaría dado simultáneamente vía PRR7 y PRR9.



Fig. 23. PRMT5 afecta el funcionamiento del reloj circadiano a través de PRR7 y PRR9. Período circadiano (H: horas) calculado a partir del movimientos de las hojas en condiciones de libre curso, en plántulas salvajes y las distintas mutantes. Los valores representan la media y la barra de error, el error estándar. ***P < 0,001, n=6.

En función de los datos anteriores, decidimos re-evaluar la regulación de *PRR7*. Los datos de expresión obtenidos en los microarreglos, indicaron un aumento de aproximadamente dos veces en la mutante *prmt5* con respecto a la planta salvaje. Sin embargo, los datos de qPCR indican, tanto en condiciones de ciclos de luz-oscuridad, como en luz continua (Fig. 13F y Fig. 14F), que *PRR7* tendría un desfasaje en su pico de expresión, pero que en condiciones en las que el reloj ha tenido oportunidad de sincronizarse, los niveles de mensajero no estarían necesariamente elevados. Con el objetivo de determinar si el control transcripcional de *PRR7* por PRMT5, se da a través de la dimetilación simétrica en la histona 4 realizamos la técnica de Re-ChIP (la misma empleada para obtener la Fig. 20). Pese a los esfuerzos realizados, no fuimos capaces de detectar dimetilación simétrica en la histona 4, en los nucleosomas ensamblados en la
región promotora de *PRR7*. Vale aclarar que sí pudimos detectar esa marca epigenética en otras regiones (región promotora de *FLC*, ver Fig. 20).

En resumen, los datos de esta sección sugieren que PRMT5 afecta los ritmos circadianos en *Arabidopsis thaliana* a través de PRR9 y PRR7. Probablemente, esto se dé regulando la expresión y el *splicing* alternativo de *PRR9*, y modulando el momento de expresión de *PRR7* y/o la función de PRR7.

PRMT5 y el splicing alternativo

PRMT5 es capaz de metilar histonas, así como otras proteínas. Por ejemplo, se ha demostrado que en *Drosophila melanogaster*, es capaz de modificar proteínas Sm. Estas forman parte del spliceosoma, el complejo responsable de catalizar el *splicing* (Gonsalvez, G. *et al.*, 2006; Anne, J. *et al.*, 2007). Este descubrimiento sugiere que PRMT5 podría estar vinculada, al menos en *D. melanogaster*, al procesamiento del ARNm prematuro (pre-ARNm). Por otro lado, durante nuestra investigación demostramos que la mutante *prmt5-5* posee alterado el *splicing* alternativo de *PRR9*. Esto nos llevó a preguntarnos si la alteración sobre el *splicing* alternativo sería algo puntual sobre el gen identificado, o sería un efecto más general.

Así, decidimos utilizar una técnica que nos permitiera analizar globalmente los transcriptos presentes en plantas salvajes y en mutantes para *PRMT5*. La misma se denomina, del inglés, *tiling-arrays* y se basa en el mismo principio que la técnica clásica de microarreglos, siendo la principal diferencia el tipo de sondas contra las que se hibridará la muestra. En esta metodología, las sondas son de igual longitud a las de los microarreglos de expresión tradicionales (25 bases), pero representan prácticamente todo el genoma, tanto las regiones codificantes, como las no codificantes (por ej. intrones, regiones promotoras y regiones intergénicas), a diferencia de los *arrays* de expresión que sólo poseen sondas que hibridan con la región 3' de los genes allí representados. Finalmente, la distancia entre el área sobre la que se diseña una sonda y la siguiente, es de sólo 10 pares de bases. En conjunto, esto permite estudiar no sólo el *splicing* alternativo, sino también, la expresión de loci aún no identificados como genes, de secuencias de ARN regulatorias como los pequeños ARNs, etc.

En este experimento, siguiendo la misma lógica que para el de microarreglos (ver sección "Análisis a gran escala: cambios de expresión globales en la mutante"), se utilizaron plantas salvajes y mutantes para PRMT5 crecidas en luz y temperatura continuas, no permitiendo que el reloj endógeno se sincronice. Luego del procesamiento estadístico de los datos, se encontró que 471 de los 67.791 intrones analizados, presentan señales de hibridación más altas en la planta mutante que en la salvaje. Ese aumento en la señal de hibridación sugiere que prmt5-5 retiene los intrones representados por esas sondas más que la planta salvaje (Tabla 3 del Apéndice). Teniendo en cuenta que un grupo acotado de intrones son retenidos, sólo 471 de los 67.791 evaluados, y que no todos los intrones dentro de un mismo gen presentan diferencias entre los dos genotipos (Fig. 24), podría concluirse que la mutante no posee alterado el mecanismo de splicing, sino el splicing alternativo. Como puede verse en la Fig. 24, dónde se muestran algunos ejemplos de genes con retención de intrón en prmt5-5, el aumento en la señal de hibridación es bien acotado, y se da en intrones específicos. Es importante mencionar que este tipo de análisis también permitiría analizar cambios en los niveles de expresión génica, ya que los valores obtenidos en distintas muestras pueden ser comparados promediando el valor obtenido para los exones correspondientes a cada gen.

El *splicing* alternativo de pre-ARNm ha demostrado ser un proceso fundamental para el funcionamiento celular, ya que aumenta significativamente la diversidad del proteoma (Nilsen, T.W. & Graveley, B.R., 2010). Por ejemplo, la mayoría de los genes codificados por el genoma humano dan origen a más de un transcripto a partir de este mecanismo. Por otro lado, se ha asociado la falla de este proceso a distintas enfermedades, manifestando la importancia de su especificidad a nivel organísmico (Luco, R.F. *et al.*, 2010). Desde un punto de vista mecanístico, existen distintos tipos de *splicing* alternativo, ellos son: exclusión de exón, inclusión o retención de intrón, selección alternativa del sitio de reconocimiento de *splicing* 5' (5'SS) y selección alternativa del sitios de reconocimiento del *splicing* -sitios dadores- los cuales son "leídos" por la maquinaria que lleva adelante el corte y empalme de las distintas secciones del pre-ARNm (Nilsen, T.W. & Graveley, B.R., 2010).



Fig. 24. La mutante *prmt5-5* **presenta retención de intrones. A-C**: Ejemplo de tres genes identificados por *tiling-arrays* que presentan alteraciones en el procesamiento del pre-ARNm en las mutantes *prmt5-5*. Las señales de hibridación de las sondas representan el promedio de tres réplicas biológicas y se grafican en escala logarítmica. Los recuadros grises indican los intrones que presentan diferecias en la intensidad de la señal entre ambos genotipos estudiados. El esquema ubicado por encima del eje de las abscisas muestra los modelos de genes (y sus distintas isoformas) registrados en la octava versión del *TAIR*, donde los intrones están representados por líneas y los exones por rectángulos; las porciones negras indican regiones codificantes y las grises, no codificantes. La posición de cada cromosoma se indica en pb (pares de bases).

Llamativamente, mediante el uso de *tiling-arrays* sólo encontramos alterada la retención de intrones. Algunos de esos eventos fueron confirmados por RT-PCR convencional, tal como se muestra en la Fig. 25. Sin embargo, hay que tener en cuenta



Fig. 25. Confirmación de la retención de algunos intrones en la mutante. A: Esquema de la ubicación de los primers (flechas negras) en relación al intrón a evaluar mediante PCR. **B**: Validación por RT-PCR convencional de los eventos de retención de intrón identificados por *tiling-arrays*. ADNg, ADN genómico (control); "+RT" indica las reacciones realizadas con transcriptasa reversa (RT). Como control, se realizaron reacciones sin RT ("-RT"). La banda superior corresponde a la forma que retiene el intrón (equivalente al ADNg) y la inferior al mensajero al cual se le ha removido el intrón. Los datos representan uno de tres experimentos independientes.

una limitación de la técnica empleada para la evaluación global del transcriptoma. Particularmente, los eventos de 5'SS y 3'SS alternativo pueden dar como resultado modificaciones de unos pocos nucleótidos en el mensajero maduro. Por otro lado, durante el análisis de los datos obtenidos en los *tiling-arrays*, se establecen ciertos criterios con el fin de evitar resultados espurios, provocados por la imprecisión de la señal proveniente de la hibridación de algunas sondas. Así, se estableció que sólo si tres o más sondas contiguas dan diferencias en la señal de hibridación, ya sea aumento o disminución de la misma, esa región sería considerada dentro del análisis estadísitco. Teniendo en cuenta que cada sonda es de 25 nucleótidos, y la separación entre ellas (en el genoma) corresponde a 10 pares de base, para que determinada región pueda ser considerada como diferencialmente expresada, la misma deberá tener al menos, 95 bases. En conjunto, esto permite la existencia de falsos negativos, es decir de subestimar las alteraciones en algunos eventos de *splicing* alternativo.

Con la intención de analizar en mayor detalle los eventos de *splicing* alternativo, incluyendo alteraciones de pocos nucleótidos, el grupo con el que colaboramos en esta

parte del trabajo realizó una técnica de alta resolución. La misma permite evaluar diferencias incluso de un nucleótido, y de muchos eventos de *splicing* a la vez (Simpson, C.G. *et al.*, 2008; Raczynska, K.D. *et al.*, 2010). De este modo, se analizaron 288 eventos de *splicing* alternativo descriptos previamente, y se encontró que 44 de ellos estaban alterados en la mutante *prmt5-5* en comparación con plantas salvajes. Si bien los cambios observados se extienden a los cuatro tipos de *splicing* alternativo, un análisis estadístico mostró un enriquecimiento en los eventos 5'SS modificados en las plantas mutantes (datos no mostrados).

Vale recalcar que defectos en el reconocimiento del sitio 5'SS podrían tener consecuencias no sólo sobre la selección alternativa de ese sitio dador, sino también en la correcta eliminación de los intrones. Visto de otra forma, el no reconocer un sitio 5' del *splicing* haría que el intrón río abajo permaneciera en el mensajero maduro. Efectivamente, todos los eventos alterados en *prmt5-5* detectados mediante los *tiling-arrays* fueron retenciones de intrones.

Es importante mencionar que los intrones se clasifican según la conformación del complejo que cataliza su eliminación del pre-ARNm, es decir, por la composición del spliceosoma, dependiendo de si éste es del tipo U2 o del tipo U12. La mayor parte de los intrones *spliceados* por el tipo U2, tienen además el dímero GT como primeras bases (5'-3'), y un alto porcentaje de ellos tiene también el dímero AG como últimas bases del exón río arriba, Fig. 26 (Sharp, P.A. & Burge, C.B., 1997). La gran mayoría de los intrones presentes en A. *thaliana* son del tipo GT_AG_U2.

A continuación, se llevó a cabo un estudio bioinformático, con el objetivo de determinar si existe algún patrón que explique qué eventos de *splicing* alternativo están alterados en la mutante *prmt5*. Esto nos acercaría a comprender el rol funcional de PRMT5. Con tal fin, y empleando los datos obtenidos en los *tiling-arrays*, se compararon los sitios consenso 5'SS de los 115.401 intrones del tipo GT_AG_U2 presentes en *A. thaliana*, con los sitios 5'SS de los 50 intrones que presentan mayor nivel de cambio (significativo) entre plantas *prmt5-5* y salvajes (Tabla 4 del Apéndice). En la Fig. 26 se muestran los resultados obtenidos, donde los tamaños de las letras en cada posición (que simbolizan los nucleótidos), representan la frecuencia de las mismas en cada conjunto de intrones estudiados. Allí puede observarse que en la posición -1,



Fig. 26. Los intrones retenidos en *prmt5-5* son aquellos cuyos sitios 5' de reconocimiento del *splicing* son más débiles. Pictogramas que muestran la frecuencia de distribución de los nucleótidos presentes en el 5'SS (sitio 5' de reconocimiento del splicing) calculada para los 115.401 intrones de tipo GT_AG_U2 presentes en *A. thaliana* (panel superior) o para los 50 eventos de *splicing* alternativo significativamente más alterados en la mutante *prmt5-5* (panel inferior). El tamaño de las letras representa la frecuencia. El FR (factor de representación) se calcula como la relación entre la frecuencia del nucleótido mayoritario para cada posición del 5'SS en el panel superior y la frecuencia de ese mismo nucleótido en el panel inferior. Los números ubicados arriba del pictograma representan la posición de cada base: los valores negativos corresponden a las bases del exón, siendo el -1 la base más hacia el 3' del exón.; los valores positivos se asignan a los nucleótidos de los intrones, siendo el +1, el que está ubicado hacia el 5' del intrón.

hay un descenso en la frecuencia, donde según el consenso, la "G" es predominante. También hay cambios en las posiciones -2, -1 y +5, donde se tiende hacia la aleatorización de los nucleótidos, perdiendo el predominio presente en el consenso. Los sitios 5'SS que más se acercan al consenso son denominados "fuertes", y a medida que se alejan de ese arreglo se denominan "débiles". Los resultados ponen en evidencia que los intrones cuyos *splicing* está más alterado en las mutantes *prmt5-5* son aquellos cuya secuencia 5'SS se aleja del consenso, es decir que poseen sitios 5' SS débiles. En conjunto, esto sugiere que PRMT5 regularía el *splicing* alternativo, al menos en parte, modulando el reconocimiento de los sitios 5'SS débiles.



Fig. 27. El splicing de RCA está alterado en distintos alelos mutantes de *PRMT5*. Relación entre las variantes de ARNm de *RCA*, medidas por qPCR en plantas salvajes, mutantes *prmt5-5* y *prmt5-1*. Los datos representan la media y la barra de error, el error estándar (**P < 0,01, n=3).

Luego, evaluamos si los defectos registrados en el *splicing* alternativo, ocurren también en otro alelo mutante para *PRMT5*: el mutante *prmt5-1*. Para ello, seleccionamos el gen *RCA* (del inglés, *RUBISCO ACTIVASE*), identificado por la técnica de alta resolución como alterado en la mutante *prmt5-5*. Asimismo, ya se ha descripto la existencia de dos isoformas para este gen y se ha demostrado la funcionalidad biológica de las mismas: la isoforma corta, codifica una proteína capaz de ser regulada por la intensidad lumínica; mientras que la variante larga de ARNm, da origen a una proteína de menor peso molecular que la anterior, incapaz de ser regulada por luz (Zhang, N. *et al.*, 2002). Así, confirmamos que la relación entre ambas isoformas difiere en la mutante *prmt5-5* de la observada en plantas salvajes (Fig. 27). *prmt5-1* demostró tener proporciones de mensajeros equivalentes a *prmt5-5*, lo que confirma el rol de PRMT5 como regulador de este evento de *splicing alternativo*.



Fig. 28. La oscilación del *splicing* de RCA está alterado en la mutante *prmt5-5*. Relación entre las variantes de ARNm de *RCA* (ARNm largo y corto) medidas por qPCR en plántulas crecidas en día corto. Los datos fueron normalizados al máximo detectado para el WT, representan la media, y la barra de error, el error estándar (n=4). El tiempo se considera 0, cuando comienza el período de luz; H: horas. Las barras blancas y negras, indican el día y la noche, respectivamente.

Teniendo en cuenta que la transcripción de *PRMT5* está modulada por el reloj circadiano, y que la proteína PRMT5 participaría en la regulación del *splicing* alternativo, nos preguntamos si esta molécula podría actuar como nexo entre el reloj circadiano y el *splicing* alternativo. Con la intención de responder esa pregunta, evaluamos en primer lugar si la proporción de isoformas del gen *RCA* oscila a lo largo del día en plantas salvajes. Para ello se cultivaron plantas en días cortos y se calculó la relación entre ambas isoformas que se muestra en la Fig. 28, donde puede verse que efectivamente la proporción entre ellas oscila a lo largo del día. Al comparar los genotipos estudiados en la Fig. 28, queda en evidencia que la mutante *prmt5-5* no sólo posee alterado el *splicing* alternativo del gen *RCA*, sino que también pierde la oscilación existente en la relación entre las variantes de ARNm. Esto podría tener un rol fisiológico, ya que durante el día hay una mayor cantidad de aquella isoforma que origina la proteína regulable por la intensidad lumínica.



Fig. 29. El *splicing* **de** *RCA* **está alterado en** *prmt5*, **aunque no en otras mutantes del reloj circadiano.** Relación entre las variantes de ARNm de *RCA* en plantas salvajes (**A**), *prmt5-5* (**B**), *prr7;prr9* (**C**), y *prr7;prr9;prmt5* (**D**). Ambas isoformas (ARNm largo y corto) fueron medidas por qPCR en plántulas entrenadas en ciclos de luz-oscuridad y luego sometidas a condiciones de luz continua. Los datos fueron normalizados al máximo detectado para el WT, representan la media, y la barra de error, el error estándar (n=4). El tiempo se considera 0, cuando comienza el período de luz continua; H: horas. Las barras blancas y rayadas, indican el día y la noche subjetiva, respectivamente.

Más tarde, evaluamos si los cambios observados en la oscilación del *splicing* alternativo para *RCA* se dan en otras mutantes del reloj circadiano. Para ellos medimos dicho parámetro en luz continua (luego del entrenamiento de las plantas en día corto) en distintos genotipos: plántulas salvajes, mutantes *prmt5*, *prr7;prr9* y *prr7;prr9;prmt5* (Fig. 29). Allí puede observarse que el *splicing* alternativo de *RCA* está alterado y resulta arrítmico tanto en *prmt5*, como en la triple mutante *prr7;prr9;prmt5*. La mutante *prr7;prr9*, en cambio, parece mantener la oscilación, aunque con menor amplitud. Vale aclarar que en condiciones de luz continua, esta doble mutante tiene un período mucho más largo que el de plantas salvajes (Farré, E.M. *et al.*, 2005), por lo que existe la posibilidad de que en el lapso de tiempo estudiado, no se haya detectado el pico de la curva; por otro lado, debido a que el experimento se realizó durante el segundo día en condiciones de libre curso, es probable que la oscilación de distintos fenotipos, por



Fig. 30. El splicing de *RSp31* y la oscilación del mismo están alterados en la mutante *prmt5-5*. Relación entre dos de las isoformas (mRNA3 y mRNA1) de *RSp31* en plantas salvajes (A), *prmt5-5* (B), *prr7;prr9* (C), y *prr7;prr9;prmt5* (D). Ambos ARNm fueron medidos por RT-PCR radiactiva en plántulas entrenadas en ciclos de luz-oscuridad y luego sometidas a condiciones de luz continua. Los datos fueron normalizados al máximo detectado para *prmt5-5*, representan la media, y la barra de error, el error estándar (n=4). El tiempo se considera 0, cuando comienza el período de luz continua; H: horas. Las barras blancas y rayadas, indican el día y la noche subjetiva, respectivamente.

ejemplo el que estamos estudiando aquí, se vea atenuada. Sin embargo, en conjunto, estos datos sugieren que PRMT5 tendría un rol directo en el control del *splicing* alternativo, en lugar de un efecto secundario a través de su regulación del reloj circadiano.

Finalmente, analizamos el *splicing* alternativo de otros dos genes, que también mostraron estar regulados por PRMT5 en la técnica de alta resolución detallada con anterioridad. Uno de ellos, *RSp31*, presenta más de dos isoformas, las cuáles han sido descriptas previamente (Kalyna, M. *et al.*, 2006). Tal como se muestra en la Fig. 30, la relación entre las isoformas mRNA3 y mRNA1 oscila en plantas salvajes, y ese patrón cambia en las otras tres mutantes estudiadas: parece haber un desfasaje en la mutante *prr7;prr9*, y un cambio en la forma de la oscilación tanto en *prmt5*, como en *prr7;prr9; prmt5*. Esto refuerza la conclusión alcanzada anteriormente: el *splicing* alternativo estaría controlado por el reloj circadiano a través de PRMT5.

Por otro lado, el gen *At5g57630*, presenta diferencias en las proporciones de sus isoformas entre el genotipo salvaje y *prmt5*, pero no muestra un patrón circadiano (Fig. 31). Esto puede deberse a diversas razones, entre ellas a la distinta estabilidad de los mensajeros.



Fig. 31. El *splicing* **del gen** *At5g57630* **está alterado en la mutante** *prmt5-5.* Relación entre la isoforma que emplea el sitio 5'SS distal (más hacia el 5' del intrón), y el total de mensajeros detectados para el gen *At5g57630*. Las distintas isoformas fueron medidas por RT-PCR radiactiva en plántulas entrenadas en ciclos de luz-oscuridad y luego sometidas a condiciones de luz continua. Los datos fueron normalizados al máximo detectado para el WT, representan la media, y la barra de error, el error estándar (n=4). El tiempo se considera 0, cuando comienza el período de luz continua; H: horas. Las barras blancas y rayadas, indican el día y la noche subjetiva, respectivamente.

PRMT5 en Drosophila melanogaster

Como se ha mencionado anteriormente, PRMT5 es una proteína conservada en todo el reino eucariota, y se ha demostrado que posee la misma función bioquímica en diferentes organismos. Por otro lado, dos alelos mutantes para el gen *prmt5*, *dart5* y *csul*^{*RM50*}, fueron identificados previamente en *Drosophila melanogaster* (Gonsalvez, G. *et al.*, 2006; Anne, J. *et al.*, 2007), aunque en esos estudios PRMT5 no fue asociada al funcionamiento del reloj circadiano o al control del *splicing* alternativo. Por esto, decidimos realizar un análisis comparativo entre mutantes para el gen *PRMT5* en *A. thaliana* y *D. melanogaster*, con el fin de determinar si su rol biológico se encuentra conservado para dichas especies. Para ello, contamos con la ayuda del grupo de investigación de la Dra. Fernanda Ceriani, quién es especialista en el trabajo con la mosca de la fruta y el reloj circadiano. Vale mencionar, que *D. melanogaster* es un organismo modelo clásico del reino animal.

En primer lugar nos preguntamos si los mutantes descriptos poseen alterado su reloj biológico, y en particular alguna respuesta controlada por dicho mecanismo. En la mosca de la fruta, una de las respuestas comportamentales más estudiadas, es la actividad locomotora. Para medirla se encierra a cada individuo en un cilindro, el cual es atravesado por una luz láser que registra el movimiento del mismo. Así, en moscas salvajes, lo que se observa es actividad durante el día (o día subjetivo del organismo) excepto por la tarde, momento de la "siesta". Los datos obtenidos se representan en un actograma, donde las barras negras representan la actividad y la ausencia de dichas barras, el descanso (ver detalle en "Materiales y Métodos"). El primer alelo mutante que analizamos es *dart5*, y ya que éste es recesivo, se compararon moscas heterocigotas y homocigotas para dicho locus. Como puede observarse en la Fig. 32A, el mutante dart5 presenta ritmos circadianos débiles en su actividad locomotora, incluso en condiciones cíclicas de luz-oscuridad (primeros tres "renglones" -y mitad izquierda del cuarto- del actograma). Esto se concluye por el aspecto "errático" que poseen las rayas negras que representan la actividad de esas moscas (Fig. 32A-panel derecho), al compararlas con el patrón más claro y definido de los individuos heterocigotas para la mutación (Fig. 32Apanel izquierdo). Esta característica es aún más marcada en condiciones de libre curso (Fig. 32A: nueve "renglones" inferiores del actograma). Finalmente, la arritmicidad descripta, es respaldada por los parámetros calculados en la Fig. 32B-C, donde se



Fig. 32. La mutante *dart5* presenta alterada la actividad locomotora. A: Actograma representativo, de trazado doble, para los genotipos indicados. Las moscas se mantuvieron en un fotoperíodo de 12:12 por cuatro días después de la eclosión, y luego se las transfirió a condiciones de libre curso (oscuridad continua), lo cual se indica con una flecha. Las barras blancas y negras superiores, indican el día y la noche, respectivamente. Las barras negras y grises inferiores, indican la noche y el día subjetivo, respectivamente. Porcentaje de moscas rítmicas (**B**) y FFT promedio, como medida de la robustez de los ritmos (**C**), calculados para ambos genotipos en condiciones de oscuridad continua. Los valores representan la media y la barra de error, el error estándar; n=70; ****P* <0,001; ***P*<0,01.

grafica, respectivamente, el porcentaje de moscas rítmicas para cada genotipo y el promedio del FFT (del inglés, *fast Fourier transform*), que da idea de la robustez del ritmo de la respuesta medida.

Paralelamente, se confirmó el rol de PRMT5 en el control circadiano de la actividad locomotora de *D. melanogaster* empleando otro alelo mutante: *Csul*^{*RM50*}. Para ello se realizó un experimento, análogo al descripto en la Fig.32, empleando para el mismo moscas cuyo genotipo fuera *Csul*^{*RM50*} en heterocigosis (Fig. 33A-panel izquierdo) y en homocigosis (Fig. 33A-panel derecho). Las conclusiones de éste son similares a las



Fig. 33. PRMT5 regula los ritmos circadianos de la actividad locomotora en *D. melanogaster*. A: Actograma representativo, de trazado doble, para los genotipos indicados. Las moscas se mantuvieron en un fotoperíodo de 12:12 por cuatro días después de la eclosión, y luego se las transfirió a condiciones de libre curso (oscuridad continua), lo cual se indica con una flecha. Las barras blancas y negras superiores, indican el día y la noche, respectivamente. Las barras negras y grises inferiores, indican la noche y el día subjetivo, respectivamente. Porcentaje de moscas rítmicas (**B**) y FFT promedio, como medida de la robustez de los ritmos (**C**), calculados para ambos genotipos en condiciones de oscuridad continua. Los valores representan la media y la barra de error, el error estándar; n=53-73; **P < 0,01; *P < 0,05.

obtenidas previamente: 1) en esta mutante la ritmicidad también se ve comprometida tanto en condiciones cíclicas de luz-oscuridad, como de oscuridad constante (Fig. 33A); 2) el porcentaje de moscas rítmicas en condiciones de oscuridad constante es significativamente menor al determinado para el genotipo control (Fig. 33B); 3) la robustez de los ritmos en la actividad locomotora (en términos del parámetro FFT), es menor para las moscas homocigotas mutantes (Fig. 33C).

A continuación, decidimos estudiar la ritmicidad de otras respuestas. En particular, nos interesamos en el patrón de expresión de algunos de los genes que componen el

oscilador central en Drosophila melanogaster. En este organismo, al igual que en Arabidopsis thaliana, el reloj biológico está compuesto por múltiples loops de retroalimentación negativa, organizados en un circuito central y otros periféricos. Estos a su vez, son blanco de regulaciones transcripcionales, post-traduccionales, y de procesamiento del ARNm. El loop central del oscilador está formado por los genes per, tim, clk y cyc, del inglés, period, timeless, clock y cycle, respectivamente. Por otro lado, los genes *cwo* (del inglés, *clockwork orange*), *Pdp1* (del inglés, *par domain protein 1*), y vri (del inglés, vrille), junto con sus respectivos productos de expresión, conforman un circuito secundario, directamente conectado con el loop central, el cual es necesario para el correcto funcionamiento del reloj circadiano en esta especie (Allada, R. & Chung, B.Y., 2010). Finalmente, el funcionamiento del reloj biológico en D. melanogaster posee diferencias con el de A. thaliana, especialmente a nivel de su organización tisular y la forma de modular las respuestas fisiológicas y comportamentales de este organismo. En particular, se sabe que el oscilador central en Drosophila melanogaster está localizado y restringido a aproximadamente 150 neuronas del cerebro de estas moscas. Desde allí, sincroniza otros osciladores periféricos, que se consideran engranajes necesarios, pero dependientes del oscilador central (Allada, R. & Chung, B.Y., 2010). Si bien los detalles del funcionamiento de este complejo sistema exceden al interés del presente trabajo, es importante tener este hecho presente, ya que en determinados experimentos, por ejemplo la determinación de los patrones de expresión de genes pertenecientes al oscilador central, no se emplea todo el organismo, sino sólo la cabeza de los mismos. Idealmente, debería medirse la expresión a partir de los mensajeros presentes en las células en las que funciona el oscilador central. Sin embargo, experimentalmente eso es sumamente difícil de llevar a cabo, y por ello se emplea como estrategia alternativa la utilización de las cabezas.

Teniendo presente todo lo explicado anteriormente, decidimos evaluar el perfil de expresión circadiana de los genes *per*, *tim*, *clk* y *Pdp1* en moscas salvajes y en mutantes *dart5*. Para ello, se entrenaron individuos de ambos genotipos en ciclos de luz-oscuridad (fotoperíodo 12:12), y luego se los sometió a condiciones de libre curso (temperatura y oscuridad constantes). El resultado obtenido se grafica en la Fig. 34, donde se evidencia un leve desfasaje en el perfil de expresión de los cuatro genes analizados al comparar la mutante *dart5* con moscas salvajes. Sin embargo, los niveles de expresión y la amplitud



Fig. 34. Las mutantes *dart5* presentan diferencias en el patrón de expresión circadiana de genes centrales del reloj biológico. Expresión de *per* (A), *clk* (B), *tim* (C), y *Pdp1* (D) medida por qPCR en cabezas de moscas entrenadas en ciclos de luz-oscuridad (12:12) y luego sometidas a condiciones de oscuridad continua. Los datos fueron relativizados a los valores registrados para el gen rp49 y normalizados al máximo de cada gen. Los datos representan la media y la barra de error, + el error estándar (n=4). El tiempo se considera 0, cuando comienza el período de oscuridad.

de la oscilación se mantienen equivalentes, lo que sugiere que la arritmicidad observada en la actividad locomotora en mutantes *dart5*, no sería atribuíble a la falta de ritmicidad del oscilador central. En cambio, podría indicar que PRMT5 regula la actividad locomotora, modulando la conexión entre el oscilador central y el control de las respuestas comportamentales. En función de los cambios observados en la expresión de los genes estudiados (Fig. 34), es difícil determinar la función de PRMT5 sobre el oscilador central: el desfasaje detectado podría sugerir que dicha proteína cumple cierto rol sobre el oscilador central, regulando su fase, o bien ese desfasaje podría ser la consecuencia de un período circadiano más largo en las moscas mutantes que en las salvajes, pero que sólo se observa en algunas respuestas (oscilación de la expresión de ciertos genes), mientras que otras resultan arrítmicas (respuestas comportamentales). Para determinar si efectivamente la oscilación de los genes presenta un período alterado en los distintos genotipos, sería necesario estudiar dicha respuesta en condiciones de "libre curso", pero por intervalos más prolongados de tiempo, idealmente por dos o tres días, y más distantes de las condiciones de entrenamiento, con lo cual se pone en evidencia el funcionamiento del oscilador endógeno.

Luego, nos preguntamos cuál sería el perfil de expresión del gen *prmt5* en *D. melanogaster*. Para responder esta incógnita, empleamos un diseño experimental idéntico al anterior y medimos por qPCR la expresión del gen de interés. En la Fig. 35 puede observarse que, al menos en las condiciones estudiadas, *prmt5* no presenta un patrón circadiano de oscilación. Esto sugiere que en *D. melanogaster*, PRMT5 no participaría de un *loop* asociado al oscilador central como sucede en *A. thaliana*, ya que su control sobre los genes centrales del reloj es más difusa, y su transcripción, tampoco parece estar bajo el control de este mecanismo.



Fig. 35. *prmt5* **no presenta un perfil de expresión circadiano.** Expresión de *prmt5* medida por qPCR en cabezas de moscas entrenadas en ciclos de luz-oscuridad (12:12) y luego sometidas a condiciones de oscuridad continua. Los datos fueron relativizados a los valores registrados para el gen rp49 y normalizados al máximo. Los datos representan la media y la barra de error, el error estándar (n=4). El tiempo se considera 0, cuando comienza el período de oscuridad continua.

Siguiendo la lógica de nuestra comparación, resultó de interés evaluar si las moscas mutantes para el gen *prmt5*, presentan alteraciones en el procesamiento de su pre-ARNm. Para ello, elegimos como un gen candidato, *per*, cuyo *splicing* alternativo ya se ha descripto y sigue un patrón circadiano. Además, el procesamiento de su pre-ARNm estaría vinculado a la sincronización del oscilador en respuesta a cambios en el

fotoperíodo, y principalmente en la temperatura. Si bien se han secuenciado más de dos isoformas, las más abundantes y con aparente rol fisiológico, serían las variantes A y B', que retiene o excluye el intrón 8 del pre-ARNm, respectivamente (Collins, B.H. *et al.*, 2004; Majercak, J. *et al.*, 2004; Low, K.H. *et al.*, 2008). Tal como ha sido reportado previamente, nuestros resultados muestran la oscilación circadiana en la relación calculada entre las variantes alternativas de ARNm para moscas salvajes (Fig. 36). Sin embargo, las mutantes *dart5*, presentan un alto nivel de la isoforma B', que retiene el intrón 8, independientemente del momento del día (Fig. 36). Esto se asemeja a los resultados obtenidos en *A. thaliana* para las mutantes *prmt5* y hace inevitable preguntarse, si la alteración en el *splicing* alternativo en *D. melanogaster*, se restringe al gen *per* o es, al igual que en el caso de las plantas, un rol de PRMT5 más general que modula el funcionamiento de este importante mecanismo celular.



Fig. 36. PRMT5 regula el *splicing* **alternativo de** *per***.** Relación entre las variantes de ARNm de *per* (A/B') medidas por PCR radiactiva en cabezas de moscas entrenadas en ciclos de luz-oscuridad (12:12) y luego sometidas a condiciones de oscuridad continua. Los datos representan la media y la barra de error, el error estándar (n=4). El tiempo se considera 0, cuando comienza el período de oscuridad continua. Las barras negras y grises, indican la noche y el día subjetivo, respectivamente.

Teniendo presentes los datos obtenidos hasta aquí en *D. melanogaster*, decidimos realizar experimentos de *tiling-arrays* en este organismo, comparando individuos salvajes con mutantes *dart5*. En este caso, no hemos realizado un análisis previo de la expresión global, por lo tanto, realizar los *tiling-arrays* nos permitirá no sólo evaluar el

splicing alternativo, sino también el transcriptoma de los genotipos puestos a prueba. Esto nos dará información relativa a los genes regulados positiva o negativamente por PRMT5 a nivel transcripcional, lo cual a su vez, podría acercarnos a comprender el fenotipo de arritmicidad observado en la actividad locomotora (Fig. 32 y Fig. 33).

Al igual que en el caso de plantas, elegir las muestras que se hibridarán contra los *tiling-arrays* es de suma importancia. Por esto, para obtener cada muestra, se combinó una alícuota de ARN obtenido para cada momento del día. Esta estrategia intenta minimizar los falsos positivos, es decir que las diferencias observadas en la señal de la hibridación se deban a un efecto secundario de la mutación sobre el reloj circadiano (por ejemplo arritmicidad o cambio en la fase de expresión), y no a diferencias atribuibles a PRMT5.

Así, el análisis global de los efectos de PRMT5 sobre el control transcripcional del genoma de *D. melanogaster* mostró que 315 genes poseen menores niveles de expresión, al menos 1,5 veces, en la mutante *dart5* comparado con los niveles presentes en las moscas salvajes (Tabla 5A del Apéndice), y que 85 genes presentan aumentada su expresión (Tabla 5B del Apéndice). Vale mencionar, que en ninguno de esos dos grupos de genes, existe una sobre-representación entre ellos y el conjunto de loci regulados circadianamente. Esto es coherente con el perfil de expresión de *prmt5*, que tampoco sigue un patrón circadiano. A su vez, apoya la hipótesis de que en las moscas, PRMT5 no estaría vinculada tan cercanamente al oscilador central como lo está en el caso de *A. thaliana*.



Fig. 37. Expresión de *to.* Niveles de expresión obtenidos para el gen *to* mediante la técnica de *tiling-arrays* para moscas salvajes y mutantes *dart5.* Los datos representan la media y la barra de error, el error estándar (n=3).

Por otro lado, uno de los genes con mayor nivel de cambio entre *dart5* y moscas salvajes, es *to* (del inglés, *takeout*), cuya expresión está controlada por el reloj circadiano, y es responsable de mediar la regulación del oscilador sobre el comportamiento locomotor y de alimentación (Sarov-Blat, L. et al., 2000). Como puede observarse en la Fig. 37, *dart5* posee incrementados alrededor de nueve veces los niveles de ARNm comparado con moscas salvajes.

El incremento en los niveles de ARNm de *to* en la mutante *dart5* fue confirmado por qPCR a lo largo de una curva de tiempo en condiciones de libre curso. Como puede observarse en la Fig. 38, la mutante para el gen *prmt5*, también posee alterado el perfil de expresión de *to*, mostrando un pequeño retraso en la fase del mismo, similar a lo detectado para los genes que forman parte del oscilador central (Fig. 34).



Fig. 38. La mutante *dart5* presenta alterado el nivel y el perfil de expresión del gen to. Expresión de to medida por qPCR en cabezas de moscas entrenadas en ciclos de luzoscuridad (12:12) y luego sometidas a condiciones de oscuridad continua. Los datos fueron relativizados a los valores registrados para el gen rp49 y normalizados al máximo registrado para el genotipo salvaje. Los datos representan la media y la barra de error, el error estándar (n=4). El tiempo se considera 0, cuando comienza el período de oscuridad. Las barras negras y grises, indican la noche y el día subjetivo, respectivamente.

Finalmente, procedimos a evaluar el procesamiento de pre-ARNm en las mutantes *dart5* a partir de los datos de los *tiling-arrays*. Los resultados muestran que en las moscas salvajes existen 30 eventos de retención de intrón y 65 eventos de exclusión de exón comparado con moscas *dart5* (Tablas 6A y 7A del Apéndice). En cambio, *dart5* presenta 417 eventos de retención de intrón (ver ejemplo en la Fig. 39) y 4 eventos de exclusión de exclusión de exón comparado con moscas salvajes (Tablas 6B y 7B del Apéndice).



Fig. 39. La mutante *dar5* presenta retención de intrones. Ejemplo de un gen cuyo procesamiento de pre-ARNm está alterado en la mutante *dart5*, identificado por *tiling-arrays*. Las señales de hibridación de las sondas representan el promedio de tres réplicas biológicas y se grafican en escala logarítmica. El recuadro gris indica el intrón que exhibe diferecias en la intensidad de la señal entre ambos genotipos estudiados. El esquema ubicado por encima del eje de las abscisas muestra las dos isoformas registradas para ese gen, donde los intrones están representados por líneas y los exones por rectángulos; las porciones negras indican regiones codificantes y las grises, no codificantes. La posición que este locus ocupa en el genoma, está indicada en pb (pares de bases).

En primera instancia, podemos destacar que al igual que en *A. thaliana*, en *D.* melanogaster, el tipo de *splicing* alternativo que presenta mayor nivel de cambio entre individuos salvajes y mutantes para *prmt5* es la retención de intrón. Entre los genes que exhiben retención de intrón en las moscas *dart5* se encuentran *to*, cuya función biológica ya ha sido explicada, *slowpoke* y *norpA*. Sabiendo que el gen *norpA*, está involucrado en el entrenamiento del reloj circadiano (Glaser, F.T. & Stanewsky, R., 2005), y que los ritmos circadianos de la actividad locomotora han demostrado estar comprometidos cuando se muta el gen *slowpoke* (Ceriani, M.F. *et al.*, 2002), en conjunto, la alteración en el *splicing* alternativo de estos tres genes, junto a los cambios en la expresión de *to*, podrían explicar, al menos parcialmente, el fenotipo arrítmico de la actividad locomotora observado en mutantes *dart5*.

A continuación, se procedió a confirmar algunos de los eventos de retención de intrón, determinados mediante *tiling-arrays*, que presenta *dart5*. Los genes evaluados fueron: *to*, *CG14180*, y *CG7199* (Fig. 40).



Fig. 40. La mutante *dart5* presenta alterado el procesamiento del pre-ARNm. Relación entre las variantes de ARNm (largo/corto: inclusión o exclusión de intrón, respectivamente) medidas por PCR radiactiva para distintos genes, en muestras obtenidas de igual manera que aquellas empleadas para los *tiling-arrays*. Los datos representan la media y la barra de error, el error estándar (n=3). Los valores han sido normalizados a la relación máxima obtenida para las moscas salvajes.

Luego, y con el objeto de confirmar que los efectos observados hasta aquí en el procesamiento de pre-ARNm en *dart5* no son consecuencia de alteraciones en el reloj circadiano, se evaluó el *splicing* alternativo de dos de los genes cuya retención de intrón se confirmó en la Fig.40 en moscas mutantes para genes centrales del reloj: *per* y *clk*. Para ello se emplearon los alelos mutantes *per*⁰¹ para el gen *period*, y el alelo *jrk*, para el gen *clock*. Debido a que el *background* genético de estos mutantes es *yw*, se usó este genotipo como control en ese experimento. Como se observa en la Fig. 41, no hay diferencias significativas en los niveles de retención de intrón entre estas dos mutantes



Fig. 41. Eventos de *splicing* alternativo regulados por PRMT5, no están alterados en mutantes arrítmicas del reloj circadiano. Relación entre las variantes de ARNm (largo/corto: inclusión o exclusión de intrón, respectivamente) medidas por PCR radiactiva para los genes *to* (A) y *CG14180* (B), en cabezas de moscas entrenadas en ciclos de luz-oscuridad (12:12) y luego sometidas a condiciones de oscuridad continua. CT (tiempo circadiano) se considera 0, cuando comienza el período de oscuridad continua. Los datos representan la media y la barra de error, el error estándar (n=2, representativo de 2 experimentos independientes). Los valores han sido normalizados a la relación máxima obtenida para las moscas salvajes (CT=2). *yw* es el genotipo salvaje, sobre el cual se han construido las mutantes *per⁰¹ y jrk*.

arrítmicas y el genotipo salvaje, en ninguno de los dos momentos del día subjetivo estudiados (CT2 y CT14). Esto sugiere que PRMT5 es responsable de las alteraciones en el *splicing* alternativo identificadas en las mutantes *dart5*, en lugar de ser una consecuencia secundaria de la arritmicidad provocada por la ausencia del gen *prmt5*.

Finalmente, se decidió realizar un análisis bioinformático similiar al realizado para *A. thaliana* (Fig. 26), con el fin de determinar si existe algún patrón particular en la secuencia dadora del *splicing* alternativo 5'SS, que explique el rol de PRMT5 en el procesamiento del pre-ARNm. Para ello se utilizaron los datos obtenidos en el experimento de *tiling-arrays* y los resultados se muestran en la Fig. 42. Estos fueron obtenidos comparando el sitio 5'SS consenso de los 42.629 intrones del tipo



Fig. 42. Los intrones retenidos en *dart5* son aquellos cuyos sitios 5' de reconocimiento del *splicing* son más débiles. Pictogramas que muestran la frecuencia de distribución de los nucleótidos presentes en el 5'SS (sitio 5' de reconocimiento del splicing) calculada para los 42.629 intrones de tipo GT_AG_U2 presentes en *D. melanogaster* (panel superior) o para los 50 eventos de *splicing* alternativo significativamente más alterados en la mutante *dart5* (panel inferior). El tamaño de las letras representa la frecuencia. El FR (factor de representación) se calcula como la relación entre la frecuencia del nucleótido mayoritario para cada posición del 5'SS en el panel superior y la frecuencia de ese mismo nucleótido en el panel inferior. Los números ubicados arriba del pictograma representan la posición de cada base: los valores negativos corresponden a las bases del exón, siendo el -1 la base más hacia el 3' del exón; los valores positivos se asignan a los nucleótidos de los intrones, siendo el +1, el que está ubicado hacia el 5' del intrón.

GT_AG_U2 presentes en *D. melanogaster*, con el sitio 5'SS consenso de los 50 intrones del tipo GT_AG_U2 que presentan mayor nivel de retención (significativo) entre moscas mutantes *dart5* y salvajes (Tabla 8 del Apéndice). Al igual que en plantas, encontramos que los intrones más afectados se alejan del consenso, es decir que son más débiles. En particular, se observa una disminución en la frecuencia del nucléotido "G", dominante en la posición -1. En las posiciones -2, 4, 5, y 6, se registra una aleatorización, de manera similar a lo observado en *A. thaliana*. Esto sugiere que el rol de PRMT5 en el *splicing* alternativo, sería modular el reconocimiento de los sitios dadores del splicing 5'SS en ambos organismos estudiados en esta tesis.

<u>Discusión</u>

DISCUSION

En esta tesis, no sólo se ha identificado y caracterizado una planta mutante para un gen que codifica para un nuevo componente del oscilador endógeno, sino también se ha logrado vincular dos procesos tan importantes en el funcionamiento celular, como lo son el *splicing* alternativo y el reloj circadiano.

El objetivo general planteado en el presente trabajo fue el de mejorar nuestro conocimiento sobre el oscilador central. Esto resulta de interés gracias a la importancia que posee este mecanismo en los seres vivos. Se ha determinado que organismos lejanamente emparentados desde un punto de vista evolutivo, como lo son hongos, mamíferos, moscas y plantas, poseen un reloj endógeno aunque, aparentemente, de distinta composición molecular y complejidad (Dunlap, J.C. et al., 2007; Harmer, S.L., 2009; Dibner, C. et al., 2010; Tomioka, K. & Matsumoto, A., 2010). Es tema de abierto debate si estos osciladores poseen un origen común, o son el resultado de un proceso de convergencia, al que se ha llegado debido a la ventaja adaptativa que representa para todos los organismos el anticiparse a los cambios recurrentes del ambiente (Michael, T.P. et al., 2008b; Rosbash, M., 2009). En particular, en las plantas, se sabe que el reloj circadiano controla numerosos procesos fisiológicos, y que lo logra mediante la regulación de miles de genes (Dodd, A.N. et al., 2005; Michael, T.P. et al., 2008b). Durante la caracterización de la mutante aislada, encontramos que el oscilador central de Arabidopsis thaliana modula el splicing alternativo, otro mecanismo celular cuya importancia se ha subestimado por muchos años. En particular, el reloj circadiano regula la proporción de distintas isoformas de un gen a lo largo del día, impactando sobre la actividad biológica que el mismo posee. Por otro lado, el nuevo componente del reloj aislado en esta tesis, es parte de de los circuitos que componen y/o modulan el oscilador central, y participa de la regulación circadiana del splicing alternativo. En particular, media la retención de intrones en Arabidopsis thaliana, a través del reconocimiento de las secuencias dadoras del splicing. Nuestros datos sugieren que esa retención estaría vinculada al rol de PRMT5 en la metilación de proteínas del spliceosoma, lo cual alteraría bioquímicamente esos factores y modularía su actividad biológica, como se detallará más adelante.

Por otro lado, se encontró que en *Drosophila melanogaster* la proteína PRMT5, homóloga a su par de *Arabidopsis thaliana*, también está involucrada en el funcionamiento del reloj circadiano. No obstante, ésta parecería controlar principalmente algunas de las respuestas *output* del reloj, o la conexión entre el oscilador central y dichas respuestas, sin ser una pieza clave para el funcionamiento del mismo, o al menos sin formar parte de un *loop* regulatorio del mismo. Por otro lado, los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren que en *Drosophila melanogaster*, el rol de PRMT5 en el *splicing* alternativo sería equivalente al observado en *Arabidopsis thaliana* y participaría en la regulación del reconocimiento de los sitios dadores de *splicing*.

A continuación, se discutirá cada uno de los elementos resumidos anteriormente, y se argumentará sobre ellos.

PRMT5 y el desarrollo de Arabidopsis thaliana

En primer lugar, se aisló un nuevo alelo mutante para el gen *PRMT5* de *Arabidopsis thaliana (prmt5-5)*. La actividad bioquímica de la proteína codificada por ese locus había sido descripta previamente, y también había sido involucrada en la regulación del tiempo a floración (Pei, Y. *et al.*, 2007; Wang, X. *et al.*, 2007; Schmitz, R. *et al.*, 2008). Sin embargo, no había sido vinculada a la percepción de la luz y a los ritmos circadianos. La caracterización fisiológica de *prmt5-5* realizada en este trabajo, demostró que la proteína PRMT5 participa en el proceso de des-etiolación de las plántulas. Esto se ve reflejado en la respuesta hiposensible que presenta dicha mutante a la inhibición del alargamiento del hipocotilo, y a la inhibición del gravitropismo negativo para distintas calidades de luz (Fig. 7, Fig. 8A y Fig. 8B). Vale mencionar que un trabajo publicado durante los últimos meses, reporta un nuevo alelo mutante para el gen *PRMT5*. Este estaría involucrado en la percepción lumínica, sin embargo, no mostró cambios durante la inhibición del alargamiento del hipocotilo bajo tratamientos de luz roja (Hong, S. *et al.*, 2010). Esto difiere de nuestros resultados y podría deberse a que

ellos estudian un alelo distinto. No obstante, en ambos casos se mide la mutante *prmt5-*2, cuya respuesta resulta equivalente a la mutante *prmt5-54* y a *prmt5-5*, descriptas por Hong S. *et al.* (*Hong, S. et al., 2010*), y por este trabajo, respectivamente. Esto sugiere que efectivamente habría alguna diferencia entre ambos experimentos. Esa discordancia podría explicarse debido a que las condiciones de crecimiento utilizadas son levemente distintas: la temperatura varía algunos grados, y la luz es proporcionada por diodos de distintas características, emiten con alrededor de 35nm de diferencia.

Nuestros resultados indican que la percepción de la luz está alterada en las tres longitudes de onda puestas a prueba, lo cual sugiere que esta proteína no sería una de las primeras en la cadena de transducción de la señal lumínica, sino que estaría río abajo, probablemente conectando distintas vías se sañelización. Por otro lado, si bien se encontró que la respuesta fotomorfogénica posee dos aspectos afectados (inhibición del alargamiento del hipocotilo, e inhibición del gravitropismo negativo), se demostró que la metil-transferasa PRMT5 no participaría en la regulación por luz de la germinación de las semillas, un proceso inducido por la percepción de luz roja y mediado por los fitocromos (Seo, M. *et al.*, 2009). Esto sugiere que los efectos observados en plantas mutantes para *PRMT5* no son completamente pleiotrópicos, ya que modulan ciertas respuestas vinculadas a la luz, pero no todas.

Finalmente, durante el desarrollo vegetativo de las plantas mutantes *prmt5-5*, se observan diferencias morfológicas en las hojas en cuanto a su coloración y a su forma, siendo su lámina de un color verde más oscuro, y de forma más aserrada y "ondulada" que aquellas de plantas salvajes. Por otro lado, el tiempo a floración, estimado como cantidad de hojas en la roseta al momento de florecer, es mayor para las mutantes (Fig. 9A-B). Estas características ya habían sido descriptas para los otros alelos, por lo que nuestros datos no resultan novedosos, pero sí congruentes con lo previamente reportado (Pei, Y. *et al.*, 2007; Wang, X. *et al.*, 2007; Schmitz, R. *et al.*, 2008). Así también, el fenotipo de floración tardía se ve parcialmente recuperado al introducir en *prmt5*, un alelo mutante para el gen *FLC* (Fig. 18A). Sin embargo, no se ha logrado explicar hasta aquí, por qué las dobles mutantes *prmt5;flc*, siguen presentando defectos en la floración al compararlas con plantas salvajes en condiciones de día largo (fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad). Este punto se discutirá en la siguiente sección.

PRMT5 y el reloj circadiano

Mediante la estrategia de trabajo propuesta, alcanzamos el objetivo particular de esta tesis: identificar y caracterizar, al menos parcialmente, un nuevo componente y/o modulador del reloj biológico de *Arabidopsis thaliana*. En primer lugar, se mostró que una respuesta controlada por el oscilador endógeno, el movimiento de las hojas, se encuentra alterada en la mutante aislada (Fig. 9C). A nivel molecular, se evaluó el perfil de expresión de dos genes cuya transcripción está bajo el control del oscilador central y se determinó que la correcta oscilación de ambos depende de la presencia de PRMT5 (Fig. 12A, 12C y 12D). Eso mismo sucede con el patrón de expresión de *TOC1*, uno de los actores principales en el funcionamiento del reloj circadiano de la planta en estudio (Fig. 12B, 13C y 14C). El control de PRMT5 sobre el oscilador central se confirmó estudiando, bajo distintas condiciones, la abundancia de los transcriptos de algunos de los genes que conforman dicho circuito (Fig. 13 y Fig. 14). Por otro lado, los resultados obtenidos muestran que la expresión de *PRMT5* es, a su vez, regulada de manera circadiana (Fig. 15). En conjunto, los datos indican que esta proteína forma parte de un circuito de retro-alimentación, ensamblado directamente con el oscilador central.

En resumen, este trabajo muestra por primera vez, que la única PRMT simétrica descripta hasta el momento en *Arabidopsis thaliana* (PRMT5), está íntimamente ligada al funcionamiento del reloj biológico. Así también, fue el primero en postular que la metilación post-traduccional del aminoácido arginina, tiene un rol regulatorio en el reloj circadiano (Sanchez, S.E. *et al.*, 2010). Esto no se había planteado anteriormente para ningún organismo. Sin embargo, vale mencionar que poco después de publicar los datos de esta tesis, apareció otro reporte que vincula a PRMT5 con el funcionamiento del oscilador central (Hong, S. *et al.*, 2010). Por último, podemos mencionar que este rol, aparentemente no estaría conservado en toda la familia de PRMTs, ya que estudios preliminares de nuestro laboratorio, muestran que mutantes simples para algunas de las PRMTs asimétricas, no presentan diferencias en su comportamiento circadiano.

En diversos organismos se ha establecido que las modificaciones posttraduccionales representan elementos de importancia en el control del reloj circadiano. Por ejemplo, como se ha mencionado en la introducción, muchos componentes del reloj son fosforilados luego de su traducción, lo cual impacta sobre su actividad biológica. Esto tiene lugar no sólo en plantas (Fujiwara, S. *et al.*, 2008), sino también en organismos que van desde las cianobacterias, hasta los seres humanos (Mehra, A. *et al.*, 2009). Existe una segunda marca post-traduccional ampliamente utilizada por las células, que proporciona estabilidad (o la falta de ella) a las proteínas blanco, la ubiquitinación (Fujiwara, S. *et al.*, 2008; Harmer, S.L., 2009; Mehra, A. *et al.*, 2009). De hecho, en muchos casos las dos modificaciones mencionadas actúan en conjunto, ya que la fosforilación promueve la ubiquitinación (McClung, C.R. & Gutiérrez, R.A., 2010). Además, el rol de la fosforilación puede estar asociado a la interacción proteína-proteína, proteína-ADN, entre otros (McClung, C.R. & Gutiérrez, R.A., 2010). Con estas observaciones, se intenta recalcar que la metilación post-traduccional de argininas se suma a la lista de modificaciones protéicas conocidas que contribuyen a ajustar y sintonizar el reloj circadiano.

Desde otro enfoque, es importante mencionar la aparición de dos reportes de investigación muy recientes, publicados durante el final de esta tesis doctoral, en los que se asocia a dos demetilasas de histonas al funcionamiento del reloj circadiano. El grupo de la Dra. Elaine Tobin describe la función de JMJ30 en el reloj de Arabidopsis thaliana, determinando que mutantes para ese gen poseen período corto y que la transcripción del mismo, está directamente regulada por CCA1 y LHY (Lu, S.X. et al., 2011). Por otro lado, se reportan datos en los que mutantes para el gen JMJD5 de A. thaliana, presentan período corto para las respuestas evaluadas. Lo mismo sucede, con células humanas cuyo gen ortólogo a JMJD5 está alterado (Jones, M.A. et al., 2010). Estas evidencias, que señalan la existencia de proteínas demetilasas de histonas involucradas en el control del reloj circadiano, representan la contracara de nuestro trabajo. De hecho, mutantes para PRMT5 (una metilasa de histonas y otras proteínas), presentan período alargado; y mutantes para los genes JDJ30 y JDJD5, demetilasas de histonas, muestran un período más corto que el de plantas salvajes. Esto, en conjunto, apoya la metilación de histonas y/u otras proteínas, como un nuevo mecanismo de control del reloj circadiano.

No obstante, aún quedan preguntas interesantes por hacerse. Se ha visto que la dimetilación simétrica en argininas tiene consecuencias sobre el funcionamiento del reloj circadiano, ¿es porque las histonas resultan modificadas por PRMT5, lo que implica un control epigenético del reloj circadiano?, ¿son otras las proteínas blancos de

esta enzima que cumplen un rol en el oscilador endógeno?, o ¿ambos mecanismos están involucrados? La respuesta certera a estas preguntas no se conoce, pero intentaremos adentrarnos en el largo proceso que será encontrarla. En principio, la presencia de demetilasas de histonas apunta hacia un rol epigenético sobre el reloj circadiano, del cual PRMT5 podría formar parte. Cabe destacar, no obstante, que las metilasas, demetilasas, acetilasas y desacetilasas, no sólo tienen como blanco de acción a histonas, sino que en muchos casos pueden modificar otro tipo de proteínas. En particular, evidencias de nuestro propio trabajo, sugieren un rol citoplasmático no vinculado con la remodelación de la cromatina, para PRMT5 en la regulación del delicado oscilador circadiano (ver más adelante, sección "PRMT5 y el *splicing* alternativo").

Finalmente, desde un punto de vista más general, la alteración del oscilador endógeno en mutantes *prmt5-5*, podría explicar el fenotipo de floración tardía observado en la doble mutante *prmt5;flc* (Fig. 18A). Esta última, al crecer en condiciones de día largo florece más tarde que las plantas salvajes, aunque no tanto como las mutantes *prmt5*. Ese "rescate parcial" del fenotipo salvaje podría deberse a que el reloj circadiano no funciona correctamente, interfiriendo en la vía fotoperiódica del control de la floración. Así también, la respuesta hiposensible que presenta la inhibición del alargamiento del hipocotilo en mutantes *prmt5-5*, podría efectivamente explicarse por una falla en la percepción lumínica, o por la alteración de la percepción lumínica (Nozue, K. *et al.*, 2007). Recordemos que la mayor parte de las mutantes para genes del reloj circadiano poseen alterado el proceso de des-etiolación (Dowson-Day, M.J. & Millar, A.J., 1999; Kato, T. *et al.*, 2007), y muchas de ellas también el tiempo a floración (Fowler, S. *et al.*, 1999; Sato, E. *et al.*, 2002; Yamamoto, Y. *et al.*, 2003; Somers, D.E. *et al.*, 2004).

Mecanismo de acción de PRMT5

Una vez caracterizado el rol de PRMT5 sobre el desarrollo, la fisiología y el reloj circadiano de *Arabidopsis thaliana*, nos preguntamos cuál es su mecanismo de acción. Probablemente, la respuesta a esa incógnita sea amplia, ya que es de esperar que una

proteína tan versátil, capaz de metilar sustratos tan diversos, no actúe de la misma forma sobre todos los procesos que controla.

En términos generales, la metilación de arginina en las proteínas, podría disminuir la cantidad de puentes de hidrógeno potenciales del residuo modificado, e incluso cambiar su forma. Teniendo en cuenta que los puentes de hidrógeno de la arginina modulan su capacidad de interactuar con ácidos nucléicos, con grupos fosfatos (por ejemplo en un *loop* de ARN), y la estabilidad de la interacción con otras proteínas, es evidente la importancia de esta modificación sobre la actividad biológica de las proteínas blanco (Bedford, M.T. & Clarke, S.G., 2009). Por otro lado, ya se ha mencionado que PRMT5 metila una gran diversidad de sustratos (Bedford, M.T. & Clarke, S.G., 2009; Deng, X. *et al.*, 2010; Liu, C. *et al.*, 2010). Estas dos observaciones, demuestran la diversidad de mecanismos de acción que podrían estar asociados al rol de PRMT5.

En función a lo referido, decidimos centrar nuestra atención en el reloj circadiano. Planteando una serie de hipótesis y experimentos, encontramos que el efecto de PRMT5 sobre el oscilador endógeno es dependiente de la presencia de los genes PRR7 y PRR9, ya que en un background genético donde estos dos loci están mutados, no se evidencia fenotipo adicional al introducir la mutación en PRMT5 (Fig. 23). Analizando en conjunto los resultados obtenidos, podríamos decir que el rol de PRMT5 sobre PRR9 está dado mediante la regulación transcripcional, y el control del procesamiento de su pre-ARNm. Nuestros datos muestran que la expresión de PRR9 está bajo el control de PRMT5 (Fig. 13G, 14G y 19), pero que no sería a nivel epigenético, ya que no se detectó enriquecimiento de la marca característica realizada por PRMT5 (dimetilación simétrica en la arginina 3 de la histona 4), en los nucleosomas posicionados sobre el promotor, ni sobre la región codificante del gen PRR9 (Fig. 20 y, datos no mostrados). Por otro lado, se detectó que la abundancia de las isoformas descriptas para este gen está alterada en mutantes prmt5-5 comparada con plantas salvajes (Fig. 21). Esto no descarta que también exista algún efecto sobre la proteína, sin embargo, eso no fue puesto a prueba. Finalmente, con respecto a PRR7, se encontró que el perfil de expresión de este gen, está levemente alterado en mutantes prmt5-5 comparado con plantas salvajes. Si bien no hay diferencia en la amplitud de la oscilación, se determinó que la abundancia de ARNm llega a su máximo nivel y tarda más en decrecer en mutantes prmt5-5 que en plantas salvajes (Fig. 13F). Evaluando distintas condiciones de crecimiento, se encontró un desfasaje en el pico de expresión de *PRR7* (Fig. 14F). A continuación, se evaluó la dimetilación simétrica de las histonas que conforman los nucleosomas ensamblados sobre *PRR7*. Así también, se constató la posibilidad de que el procesamiento de los transcriptos de este gen fuera distinto entre plantas mutantes y salvajes. Sin embargo, los experimentos realizados no revelaron diferencias entre los genotipos estudiados (datos no mostrados). Esto sugiere que el efecto a través de *PRR7*, estaría dado por las diferencias observadas en la abundancia de ARNm, o tal vez, por algún cambio a nivel protéico, consecuencia directa o indirecta de PRMT5, sobre PRR7. No obstante, esta posibilidad no fue examinada.

La regulación del reloj circadiano mediante el *splicing* alternativo de una de las piezas claves del mismo, resulta un novedoso mecanismo de control. Sin embargo, no es el primer caso descripto, ya que en enero del año 2010, el grupo del Dr. Todd Mockler reportó que los pre-ARNm del gen *CCA1* sufren *splicing* alternativo, produciendo dos isoformas: una de ellas codifica para la proteína completa, mientras que la otra origina un polipéptido incompleto (Filichkin, S.A. *et al.*, 2010). Si bien no se ha demostrado la relevancia fisiológica de estas isoformas, es sugestivo que una de ellas genere una proteína truncada, potencialmente no funcional. Así, nuestro descubrimiento suma *PRR9* a la lista de genes centrales del reloj biológico que son blanco del *splicing* alternativo. Una lista que, al parecer, podría crecer vertiginosamente.

PRMT5 y el splicing alternativo

Hasta el momento de comenzar los experimentos vinculados con el *splicing* alternativo, existían reportes provenientes de diversos modelos de estudio, que sugerían la relación entre PRMT5 y el procesamiento de ARNm. Por un lado, se sabía que PRMT5 metila proteínas Sm del spliceosoma en *Drosophila melanogaster* (Gonsalvez, G. *et al.*, 2006; Anne, J. *et al.*, 2007), y que en células humanas actúa además, junto con el complejo SMN (*Survival Motor Neuron*), siendo indispensable para el ensamblado de los spliceosomas (Chari, A. *et al.*, 2008). Por otro lado, estaba demostrado que en ratones, mutaciones en *SMN*, afectan el *splicing* alternativo de manera específica (Zhang, Z. *et al.*, 2008). Sin embargo, este trabajo es el primero en presentar evidencias genéticas de la vinculación entre PRMT5 y el *splicing* alternativo.

En función de las evidencias recién mencionadas, y que el correcto procesamiento del pre-ARNm de *PRR9* es dependiente de PRMT5 en *Arabidopsis thaliana*, decidimos investigar si el efecto de dicha metil-transferasa sobre el *splicing* es generalizado, o está restringido a ese único gen. Los resultados indican que las mutantes *prmt5-5* presentan alterado el *splicing* alternativo de un acotado grupo de genes, lo cual insinúa algún tipo de especificidad (Fig. 24, Fig. 25 y Tabla 3). Así también, un análisis bioinformático de los datos obtenidos sugiere que PRMT5 participa en el control del reconocimiento de las secuencias dadoras de *splicing* (5'SS), y colabora en procesar aquellas que se alejan del consenso, es decir, los "sitios débiles" (Fig. 26 y Tabla 4). Esto conduce a la pregunta ¿cómo logra PRMT5 modular el reconocimiento de los sitios de *splicing*?

Recientemente, se ha determinado que los cambios epigenéticos tienen un rol regulatorio sobre el *splicing* alternativo en distintos organismos (Kolasinska-Zwierz, P. *et al.*, 2009; Schor, I.E. *et al.*, 2009; Luco, R.F. *et al.*, 2010), y ese control estaría mediado por distintos mecanismos de acción. En primer lugar, se encuentra la compactación de la cromatina, que depende de la disposición que adoptan los nucleosomas sobre la secuencia de ADN (regiones promotoras, exones o intrones), y eso a su vez, es modulado por las marcas epigenéticas presentes en cada uno de ellos. En segundo lugar, las modificaciones post-traduccionales introducidas sobre las histonas, podrían influir sobre el reclutamiento de distintos componentes de la maquinaria de transcripción y de procesamiento de pre-ARNm. Finalmente, el ensamblado de los nucleosomas tendría un rol sobre la procesividad y la tasa de elongación de la ARN-polimerasa II, lo cual también modula el *splicing* alternativo (de la Mata, M. *et al.*, 2003). Estos datos apoyan la hipótesis que postula al *splicing* como un mecanismo co-transcripcional (Luco, R.F. *et al.*, 2011).

Por otro lado, el *splicing* alternativo está regulado por el ensamblado del spliceosoma sobre los precursores de los transcriptos. Este es un complicado proceso que se inicia en el citoplasma celular, y está organizado en pasos sucesivos. En primer lugar, un grupo de proteínas denominadas Sm se acopla de manera ordenada formando un heptámero en forma de anillo sobre una hebra corta de ARN denominada snRNA (del inglés, *small nuclear RNA*). Así, en conjunto con otras proteínas, se constituye un

complejo denominado snRNP -del inglés, *small nuclear RiboNucleoParticle*-, esquematizado en la Fig. 43A. Se conocen cinco cadenas de snRNA: U1, U2, U4, U5, y U6; y el snRNP en formación se denomina según el snRNA: por ejemplo snRNP U1 (Meister, G. *et al.*, 2001; Pomeranz Krummel, D.A. *et al.*, 2009). Se ha visto que en células de mamíferos, el ensamblado de los snRNPs es dependiente de la metilación de las proteínas Sm por parte de PRMT5 (Gonsalvez, G.B. *et al.*, 2007), mientras que en *Drosophila melanogaster*, se ha documentado la metilación de proteínas Sm, pero eso parece no ser esencial para el formación de los snRNPs (Gonsalvez, G. *et al.*, 2006; Gonsalvez, G.B. *et al.*, 2008). Finalmente, los snRNPs son transportados al núcleo y constituyen las unidades básicas a partir de las cuales se construirá sobre el ARN prematuro, una y otra vez el spliceosoma. Este fenómeno es reiterado, ya que una vez



Fig. 43. Ensamblado del spliceosoma. A: Ensamblado citoplasmático de los snRNPs: el esquema representa un snRNA y proteínas Sm en la vecindad. Luego, aquellas Sm blanco de PRMT5 son dimetiladas simétricamente en arginina (sDMA). Más tarde, se ensambla el heptámero de proteínas Sm formando un anillo sobre el snRNA formando el snRNP. Finalmente, el snRNP ya acoplado, se transportará al núcleo con la ayuda de otros complejos protéicos. **B:** Esquema representativo del reconocimiento nucleótido-específico entre la secuencia dadora del *splicing* presente en el pre-ARNm, y el extremo 5' del snRNA. Es importante notar que, con el fin de señalar el apareamiento, se ha graficado el pre-ARNm en sentido 3'-5', por lo que el exón que se observa es en realidad, el que se encuentra hacia el 5' del intrón. Las dos bases que no varían para este tipo de intrón (dímero GU -o GT en el genoma- ubicado en el extremo 5' del intrón), se muestran en rojo.

escindido el intrón, el complejo del spliceosoma se separa, las subunidades que lo conforman (snRNPs) quedan en la vecindad, y vuelve a ensamblarse cuando hay reconocimiento de la siguiente secuencia dadora del *splicing* (Rino, J. & Carmo-Fonseca, M., 2009). El apareamiento nucleótido-específico del extremo 5' del snRNA, con el sitio dador del *splicing* ubicado en el pre-ARNm (Fig. 43B), constituye el primer paso del ensamblado del spliceosoma sobre el mensajero a procesar, y representa un evento crucial en el reconocimiento del sitio de *splicing* (Pomeranz Krummel, D.A. *et al.*, 2009; Wahl, M.C. *et al.*, 2009).

Por lo que se ha descripto hasta aquí sobre el funcionamiento del *splicing* alternativo y sus mecanismos de regulación, PRMT5 podría estar involucrada tanto en la modificación epigenética de los genes que presentan alterado el procesamiento de sus pre-ARNm, como así también en la metilación de las proteínas Sm.

Durante nuestra investigación, no encontramos evidencias que avalen la hipótesis del control epigenético del *splicing* alternativo. Sin embargo, existen correlaciones a favor de que PRMT5 regula el procesamiento de pre-ARNm mediante la metilación de proteínas Sm. En primer lugar, se ha demostrado que en levaduras, durante la interacción ARN-ARN establecida por el snRNA U1 y el sitio 5'SS del pre-ARNm, las proteínas SmB, SmD1, y SmD3 interactúan directamente con los pre-ARNm, cerca de dicha región de reconocimiento, estabilizando el apareamiento (Zhang, D. et al., 2001). En paralelo, análisis estructurales, han agregado evidencia que apoya la relevancia de las proteínas Sm en el reconocimiento de los sitios 5'SS (Pomeranz Krummel, D.A. et al., 2009). Así, podemos hipotetizar que la metilación de las proteínas Sm por parte de PRMT5 en Arabidopsis thaliana, podría facilitar el reconocimiento de determinadas secuencias dadoras del splicing, estabilizando la interacción ARN-ARN débil formada por el U1 snRNA y el sitio 5'SS. Esto explicaría porqué las mutantes prmt5-5, carentes de dimetilación simétrica en las argininas de las proteínas Sm, fallan en eliminar los intrones cuyas secuencias 5'SS son débiles. En segundo lugar, recientemente se ha demostrado que en Arabidopsis thaliana, diversas Sm son metiladas por PRMT5 (Deng, X. et al., 2010), lo cual apoya nuestra hipótesis.

No obstante, independientemente de la metilación de proteínas Sm, existe la posibilidad que al menos parte de las alteraciones en el *splicing* alternativo observadas en las mutantes *prmt5-5*, se deban directa o indirectamente a defectos epigenéticos.

El splicing alternativo y su rol fisiológico en Arabidopsis thaliana

Además de su efecto mecanístico sobre el *splicing* alternativo, este trabajo nos permitió identificar un evento de *splicing* alternativo con implicancias fisiológicas para el desarrollo de las plantas. Ese es el caso del gen *RCA* (del inglés, *RUBISCO ACTIVASE*), cuyas variantes de *splicing* y su rol fisiológico han sido descriptas (Zhang, N. *et al.*, 2002), sin embargo aquí hemos demostrado que la relación existente en la abundancia de cada una de ellas sigue un patrón circadiano (Fig. 28). Ese dato pone en evidencia que el reloj circadiano modula el *splicing* alternativo, lo cual no había sido descripto hasta el momento con profundidad en plantas.

Por otro lado, hemos determinado que esa oscilación es dependiente de *PRMT5*. Así también, se encontró que otros genes centrales del reloj como *PRR7* y *PRR9*, parecen intervenir en dicha regulación, ya que la doble mutante presenta un perfil circadiano alterado, tanto para el *splicing* alternativo de *RSp31* como para *RCA* (Fig.29 y Fig. 30). En conjunto, los datos sugieren que el reloj circadiano modularía el procesamiento de pre-ARNm, aunque existiría un rol directo de PRMT5 sobre dicho mecanismo, ya que la mutante *prmt5-5* presenta un fenotipo aún más severo que la doble mutante *prr7;prr9*.

Si bien este resultado agrega un nuevo nivel de regulación sobre el *splicing* alternativo, y esto se discutirá más adelante, es importante remarcar que no es el primer caso documentado en plantas, en el cual el procesamiento diferencial de los transcriptos presenta relevancia fisiológica; de hecho, ya ha sido involucrado a la tolerancia a estrés salino, al tiempo a floración, al desarrollo en las plantas, a la activación de la enzima Rubisco y a la vía de los jasmonatos (Zhang, N. & Portis Jr, A., 1999; Quesada, V. *et al.*, 2005; Reddy, A.S.N. *et al.*, 2008; Lorkovic, Z.J., 2009; Chung, H.S. *et al.*, 2010; Zhang, Z. *et al.*, en prensa).
Splicing alternativo, ¿un nuevo loop en el reloj circadiano?

En la sección precedente, se discutió el rol del reloj circadiano en la regulación del *splicing* alternativo. Anteriormente, habíamos concluido que el procesamiento de pre-ARNm modulaba el funcionamiento del oscilador central. Esto plantea la existencia de un nuevo circuito de retro-alimentación entre estos dos procesos, siendo la proteína PRMT5 el nexo entre ambos.

En primera instancia, este *loop* entre el reloj circadiano y el *splicing* alternativo, constituye un nivel adicional de regulación. Por otro lado, la conexión entre ellos puede contribuir a la delicada precisión con la que ambos funcionan, y brindar la robustez característica del reloj circadiano, acoplando dos mecanismos celulares de consecuencias tan amplias, en respuesta a un mismo estímulo.

Existen evidencias previas a favor de la existencia del *loop* que aquí se plantea. Por un lado, informes recientes, reportan que otra pieza clave del reloj biológico, el gen *CCA1*, sufre *splicing* alternativo (Filichkin, S.A. *et al.*, 2010). Si bien aún no se ha determinado si esto contribuye a la regulación de dicho gen o si posee algún rol fisiológico, este hecho refuerza la idea de la existencia de un nuevo circuito de retroalimentación por medio del control del *splicing* alternativo dentro del reloj circadiano.

Asimismo, podemos mencionar el caso del gen *AtGRP7*. Este locus codifica para proteína de unión a ARN rica en glicina, cuya expresión es circadiana y está controlada por el reloj biológico. AtGRP7 también es conocida como CCR2 y regula, a su vez, la expresión circadiana de gran cantidad de genes, funcionando como intermediario entre el oscilador central y los *outputs*. Asimismo, ésta proteína al acumularse se une a su propio pre-ARNm y regula la abundancia de la variante "funcional", mediante *splicing* alternativo promoviendo la retención de un intrón en el mensajero maduro, el cual presenta un codón de terminación. Esto da origen a una isoforma con menor tiempo de vida media, que decae rápidamente. Así, se constituye un circuito de retro-alimentación negativa (Heintzen, C. *et al.*, 1997; Staiger, D. *et al.*, 2003). Este tipo de *loops* se conocen como "osciladores esclavos" del oscilador central, ya que forman un circuito de retroalimentación negativa río abajo en la cadena de señalización, es decir que son controlados por el reloj central, pero ninguna de las piezas de este circuito puede

modular el funcionamiento del engranaje principal. Por otro lado, AtGRP7 también modula el *splicing* alternativo del gen homólogo *AtGRP8 (Staiger, D. et al., 2003)*.

Por otro lado, podríamos hacer un paralelismo entre este sistema de regulación y lo observado en plantas mutantes *prmt5*, para el gen *PRR9*, donde el aumento de la transcripción no refleja necesariamento un incremento en la proteína funcional, sino por el contrario, una disminución mediada por el procesamiento diferencial de los pre-ARNm.

Finalmente, teniendo en cuenta que el perfil de expresión de *AtGRP7* es circadiano, y que regula la expresión de otros genes que desencadenan distintas respuestas, podría pensarse que este proceso constituye un mecanismo de control que colabora en el funcionamiento preciso y robusto que presenta el reloj biológico. En conjunto, esta información fomenta la idea de la conexión entre el procesamiento de los transcriptos y el reloj biológico, siendo en este caso, el *splicing* alternativo, una herramienta empleada por el reloj circadiano para modular sus *outputs*.

En adición a lo antes mencionado, debemos agregar la existencia de otro elemento que en los últimos años ha cobrado una gran importancia en el funcionamiento del reloj biológico: la regulación post-transcripcional. Con esto nos referimos no sólo al *splicing* alternativo, sino también al tiempo de vida media de los transcriptos y a su proceso de degradación (del inglés, *mRNA decay*), a la participación de microARNs, y al rol de los transcriptos antisentido naturales, entre otros procesos (Kojima, S. *et al.*, 2011; Staiger, D. & Köster, T., 2011).

El transcriptoma: la convergencia de diversos mecanismos de control

El transcriptoma se define como el conjunto de genes que se están expresando en un momento dado y en determinadas condiciones, dentro de una célula. Está compuesto por ARNm y también por todos los ARN no codificantes, por ejemplo ARN ribosomal, micro ARN, entre otros. En los últimos años, se ha detectado que el transcriptoma es mucho más amplio que lo previsto anteriormente, y que el procesamiento co-transcripcional de los pre-ARN contribuye en gran medida a esa diversidad.

Uno de los mecanismos responsables de modular el transcriptoma, es la regulación transcripcional de la expresión génica. Esto involucra numerosas estrategias. En primer lugar podemos citar el control epigenético de la transcripción (Li, B. *et al.*, 2007); y en segundo lugar, el reclutamiento de las proteínas vinculadas a la activación o represión génica, que a su vez, puede basarse en la articulación espacial o temporal de esos componentes.

Aunque menos evidente, pero igual de innegable, otro proceso que impacta en el transcriptoma es el procesamiento de los transcriptos inmaduros. En términos generales, la edición de los pre-ARN y el *splicing* alternativo, contribuyen a aumentar la diversidad de transcriptos originados a partir de un mismo genoma, mientras que la formación alternativa de extremos 3' (poliadenilación alternativa), suele permitir variaciones en la localización, traducción y estabilidad de los ARNm (Poulos, M.G. *et al.*, 2011).

El análisis del transcriptoma en plantas mutantes para el gen *PRMT5* señala que esta proteína modula la expresión de gran cantidad de loci (Tablas 1 y 2 del Apéndice). En particular, existe una sobre-representación de genes cuyo rol se ha clasificado dentro de la categoría "Unión a Acidos Nucléicos", o "Unión a ADN o ARN", es decir, aquellos cuyas proteínas estarían, a su vez, involucradas en la regulación del transcriptoma. Así también, existe una correlación entre los genes regulados por PRMT5 y los previamente reportados como controlados por el reloj circadiano, indicando que esta metil-transferasa podría ser utilizada por el oscilador central para modular la expresión de sus blancos. Aún queda por determinar si esa regulación transcripcional se da a nivel epigenético por PRMT5, o es consecuencia indirecta de la mutación en *PRMT5*.

Si bien la marcas epigenéticas pueden tener roles duales, y la respuesta obtenida depende del entorno y del conjunto de las marcas epigenéticas ("código de histonas"), en células humanas se ha demostrado que PRMT5 está mayormente asociada a la represión génica (Xu, X. *et al.*, 2010).

Realizando una evaluación global de los resultados y evidencias hasta aquí presentadas, podríamos postular que PRMT5 representa un integrador de las señales que

modulan el transcriptoma, ya que participa en los diversos mecanismos que lo regulan. En síntesis, interviene en el *splicing* alternativo del ARNm, regula la expresión génica, y presenta un rol epigenético, lo cual a su vez podría modular los dos procesos anteriores.

Drosophila melanogaster en comparación con Arabidopsis thaliana

Si bien el objetivo general planteado para esta tesis doctoral era mejorar nuestro conocimiento sobre el funcionamiento del reloj biológico en la especie vegetal *Arabidopsis thaliana*, a la luz de los resultados obtenidos consideramos que podíamos expandir nuestro entendimiento de los osciladores endógenos más allá de lo estipulado originalmente. Esto es posible gracias a que, como se ha dicho anteriormente, la secuencia aminoacídica de PRMT5 está conservada en todo el reino eucariota y se ha demostrado que posee la misma función bioquímica en diferentes organismos (Bachand, F., 2007). Así, se planteó un nuevo objetivo: evaluar el rol de PRMT5 en *Drosophila melanogaster*, en particular, su vinculación con el oscilador circadiano y con el *splicing* alternativo. La comparación de la actividad biológica de dicha proteína en las dos especies estudiadas, podría aportar claridad a un tema en disputa desde hace mucho tiempo: Los relojes biológicos presentes en los distintos organismos, ¿tienen un origen evolutivo común?, o ¿han aparecido en múltiples ocasiones en la historia evolutiva, convergiendo luego hacia mecanismos similares?

En primer lugar se encontró que PRMT5 está vinculada al control circadiano de la actividad locomotora en *Drosophila melanogaster*, ya que mutantes para el gen que codifica esa enzima, resultan arrítmicas (Fig. 32 y Fig. 33). A pesar de esto, los genes centrales del reloj biológico de las moscas, mantienen la amplitud de su oscilación transcripcional, y sólo presentan un leve desfasaje en sus picos de expresión (Fig. 34). Esos resultados sugieren que la arritmicidad graficada en los actogramas, no estaría dada por una falla en el oscilador central, sino que PRMT5 modula el comportamiento rítmico afectando la cadena de señalización que conecta el núcleo del reloj y las respuestas que éste controla. Por otro lado, se encontró que dentro del grupo de genes cuya transcripción está modulada por PRMT5, no hay una sobre-representación de loci co-regulados por el reloj circadiano (Tabla 5 del Apéndice). Esto es coherente con el

perfil de expresión de *prmt5*, que tampoco está bajo el control circadiano (Fig. 35). En conjunto, esta serie de datos apunta a que en moscas la conexión entre PRMT5 y el reloj biológico es más superficial que en plantas, que PRMT5 no forma un *loop* regulatorio y y que no participaría directamente del oscilador central, aunque no puede descartarse que tenga algún rol modulatorio sobre el mismo. Por otro lado, podría modular genes involucrados en modular las respuestas *output*. Por ejemplo, en mutantes *dart5*, se encuentra significativamente aumentada la expresión del gen *to* (del inglés, *takeout –* Fig. 37 y Fig. 38), el cual ha sido implicado en la regulación de respuestas controladas por el oscilador central en moscas (Sarov-Blat, L. *et al.*, 2000).

En relación al control del *splicing* alternativo, el rol de PRMT5 en *Drosophila melanogaster* parece ser similar al de *Arabidopsis thaliana*. Los datos obtenidos muestran que el *splicing* alternativo en moscas mutantes *dart5* se encuentra alterado. Si bien se detectaron eventos tanto de exclusión de exón, como de retención de intrón, éste último parece ser el mayoritariamente afectado en las mutantes (Tablas 6 y 7 del Apéndice). Luego, un análisis bioinformático indicó que los intrones significativamente más retenidos son aquellos cuya secuencia dadora del *splicing* se aleja más del consenso, al igual que lo observado en *Arabidopsis thaliana* (Fig. 42). Esto apoya la hipótesis postulada, donde PRMT5 participa en el control del reconocimiento de las secuencias dadoras de *splicing* (5'SS), y colabora en procesar los "sitios débiles".

En particular, algunos de los genes cuyo *splicing* alternativo difiere entre moscas salvajes y mutantes, son *to, slowpoke*, y *norpA* (Tabla 6B del Apéndice). Este último, codifica para una fosfolipasa C que regula el entrenamiento del reloj circadiano (Glaser, F.T. & Stanewsky, R., 2005), y se ha reportado que *slowpoke*, al igual que *to*, participan en la regulación que ejerce el oscilador central, sobre las respuestas *output* (Sarov-Blat, L. *et al.*, 2000; Ceriani, M.F. *et al.*, 2002; Fernández, M.d.1.P. *et al.*, 2007). Así también, se identificó que el *splicing* alternativo del gen *period*, el cual es parte del *loop* central del reloj endógeno, se encuentra alterado, lo que afectaría el funcionamiento de este gen (Fig. 36). Vale destacar que dicha alteración en el procesamiento del pre-ARNm de *per*, no anula la oscilación de los niveles protéicos (datos no mostrados pero evaluados por inmunohistoquímica), lo cual sugiere que efectivamente podría haber fallas en el oscilador central, pero no arritmicidad. Desde un punto de vista funcional, todas estas

alteraciones podrían contribuir a la falta de ritmicidad observada en la actividad locomotora en mutantes *dart5*.

Finalmente, podemos resumir que si bien PRMT5 posee la misma actividad bioquímica en D. melanogaster (Anne, J. et al., 2007) y en A. thaliana (Pei, Y. et al., 2007; Wang, X. et al., 2007), su rol biológico no parece ser equivalente en estos organismos; en especial, la función que cumple en el reloj circadiano es distinta. Esto nos lleva a preguntarnos si antes de que animales y plantas divergieran evolutivamente, ya existía un oscilador endógeno del cuál era parte PRMT5 y su función se fue diferenciando a lo largo del tiempo; o por el contrario, los relojes biológicos aparecieron numerosas veces durante la evolución, y PRMT5 fue reclutada en distintas ocasiones. A pesar de las similitudes en la arquitectura de los relojes circadianos presentes en organismos distantes evolutivamente, la falta de homología en la mayoría de los componentes que constituyen el oscilador endógeno, sugiere más de un origen evolutivo para estos mecanismos. Así, la existencia de unos pocos genes que juegan un papel común regulando los ritmos circadianos en plantas y animales (Rosbash, M., 2009), refleja probablemente, un proceso de convergencia evolutiva asociado a un número limitado de proteínas capaces de cumplir con determinadas tareas. Dada la complejidad de la red molecular necesaria para modular diversos procesos fisiológicos que garanticen el éxito de una especie en respuesta a ciertos cambios ambientales, es fundamental el correcto reclutamiento de los factores involucrados en su organización. Por esto, el rol dual de PRMT5 como regulador epigenético y regulador del splicing alternativo, hacen de esta proteína, una herramienta ideal para conectar diversos procesos fisiológicos y moleculares al reloj biológico, permitiendo a los organismos ajustar su crecimiento y desarrollo a los cambios diarios del ambiente.

Conclusiones Finales y Perspectivas

En síntesis, PRMT5 representa una nueva pieza regulatoria del reloj circadiano de *Arabidopsis thaliana*, la cual forma un circuito de retro-alimentación acoplado al oscilador central y a su vez, regula el procesamiento de pre-ARNm de un sub-grupo de genes, actuando como nexo entre el reloj circadiano y la regulación del *splicing* alternativo. En el caso de *Drosophila melanogaster*, el rol de PRMT5 en el *splicing* alternativo parece estar conservado, mientras que en el reloj circadiano parece tener un papel más secundario. Por otro lado, este trabajo representa la primera evidencia genética del rol de PRMT5, una metil-transferasa de argininas, en el reloj circadiano y el *splicing* alternativo.

Se ha descripto que PRMT5 está vinculada a diversas enfermedades humanas, entre ellas cáncer y afecciones cardiovasculares (Bedford, M.T. & Clarke, S.G., 2009). Así también el *splicing* alternativo y el reloj biológico, se han asociado a diversas patologías y desórdenes (Faustino, N.A. & Cooper, T.A., 2003; Wang, G.S. & Cooper, T.A., 2007; Takahashi, J.S. et al., 2008; Maury, E. et al., 2010; Sukumaran, S. et al., 2010; Poulos, M.G. et al., 2011). Es evidente entonces la importancia de comprender el funcionamiento de PRMT5, del splicing alternativo y del oscilador central, así como la conexión existente entre ellos. Para esto, el sistema modelo Arabidopsis thaliana puede resultar una herramienta muy útil. Las ventajas son diversas, entre ellas se encuentran la disponibilidad de material genético, bioinformático y la información provista en bases de datos públicas. Sin embargo, existe un hecho adicional que la diferencia de otros organismos modelos: genes cuya actividad resulta letal para otros organismos, no son esenciales en A. thaliana. Esto permite realizar investigaciones, al menos en una etapa inicial, con el fin de acercarse al entendimiento de los mecanismos en los que esos loci participan. Este es el caso de los genes PRMT7 y SMN, los cuales resultan esenciales para D. melanogaster (Monani, U.R., 2005; Gonsalvez, G.B. et al., 2008), mientras que resultados de nuestro laboratorio muestran que plantas mutantes para los ortólogos de esos loci son viables. Aunque parezca extraño, e incluso utópico, no es la primera vez que investigaciones en Arabidopsis thaliana, permiten mejorar la comprensión de procesos que ocurren en organismos lejanamente emparentados desde un punto de vista evolutivo (Jones, A.M. et al., 2008).

Por último, determinar los mecanismos de acción de PRMT5 ayudaría a entender los procesos que regula; por ejemplo, confirmar si el control del *splicing* alternativo se debe a la metilación de proteínas Sm o de histonas, mejoraría la comprensión de dicho mecanismo, y permitiría diseñar herramientas para poder manipular su funcionamiento.

Así también, ampliar nuestro conocimiento sobre los sustratos de PRMT5 podría ser de gran importancia para ese fin. En general, estos son objetivos relativamente viables, y realizables en el corto plazo, por lo que es probable que en esa dirección se encaminen las próximas investigaciones.

<u>Referencias</u>

REFERENCIAS

Ahmad, M., and Cashmore, A.R. (1993). *HY4* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. Nature *366*, 162-166.

Alabadí, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Mas, P., and Kay, S.A. (2001). Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. Science *293*, 880-883.

Alabadí, D., Yanovsky, M.J., Más, P., Harmer, S.L., and Kay, S.A. (2002). Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis*. Curr Biol *12*, 757-761.

Alvarez-Venegas, R., Pien, S., Sadder, M., Witmer, X., Grossniklaus, U., and Avramova, Z. (2003). ATX-1, an *Arabidopsis* Homolog of Trithorax, Activates Flower Homeotic Genes. Current biology : CB *13*, 627-637.

Allada, R., and Chung, B.Y. (2010). Circadian Organization of Behavior and Physiology in *Drosophila*. Annual Review of Physiology 72, 605-624.

Anne, J., Ollo, R., Ephrussi, A., and Mechler, B.M. (2007). Arginine methyltransferase Capsuléen is essential for methylation of spliceosomal Sm proteins and germ cell formation in *Drosophila*. Development *134*, 137-146.

Avramova, Z. (2009). Evolution and pleiotropy of TRITHORAX function in *Arabidopsis*. Int J Dev Biol 53, 371 - 381.

Bachand, F. (2007). Protein Arginine Methyltransferases: from Unicellular Eukaryotes to Humans. Eukaryotic Cell *6*, 889-898.

Bastow, R., Mylne, J.S., Lister, C., Lippman, Z., Martienssen, R.A., and Dean, C. (2004). Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. Nature *427*, 164-167.

Baudry, A., Ito, S., Song, Y.H., Strait, A.A., Kiba, T., Lu, S., Henriques, R., Pruneda-Paz, J.L., Chua, N.H., Tobin, E.M., Kay, S.A., and Imaizumi, T. (2010).

F-Box Proteins FKF1 and LKP2 Act in Concert with ZEITLUPE to Control *Arabidopsis* Clock Progression. Plant Cell 22, 606-622.

Bedford, M.T., and Clarke, S.G. (2009). Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. Molecular Cell *33*, 1-13.

Boccalandro, H.E., Mazza, C.A., Mazzella, M.A., Casal, J.J., and Ballare, C.L. (2001). Ultraviolet B Radiation Enhances a Phytochrome-B-Mediated Photomorphogenic Response in *Arabidopsis*. Plant Physiol *126*, 780-788.

Casal, J.J. (2002). Environmental cues affecting development. Curr Opin Plant Biol *5*, 37-42.

Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.J., and Liu, D. (1999). Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. Science 284, 760-765.

Ceriani, M.F., Hogenesch, J.B., Yanovsky, M., Panda, S., Straume, M., and Kay, S.A. (2002). Genome-Wide Expression Analysis in *Drosophila* Reveals Genes Controlling Circadian Behavior. J Neurosci 22, 9305-9319.

Clough, S.J., Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacteriummediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J *16*, 735-743.

Collins, B.H., Rosato, E., and Kyriacou, C.P. (2004). Seasonal behavior in *Drosophila melanogaster* requires the photoreceptors, the circadian clock, and phospholipase C. Proc Natl Acad Sci USA *101*, 1945-1950.

Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., and Brenner, S.E. (2004). WebLogo: A Sequence Logo Generator. Genome Research *14*, 1188-1190.

Crosthwaite, S.K., Dunlap, J.C., and Loros, J.J. (**1997**). *Neurospora wc-1* and *wc-2*: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. Science 276, 763-769.

Chari, A., Golas, M.M., Klingenhäger, M., Neuenkirchen, N., Sander, B., Englbrecht, C., Sickmann, A., Stark, H., and Fischer, U. (2008). An assembly chaperone collaborates with the SMN complex to generate spliceosomal SnRNPs. Cell *135*, 497-509.

Chung, H.S., Cooke, T.F., DePew, C.L., Patel, L.C., Ogawa, N., Kobayashi, Y., and Howe, G.A. (2010). Alternative splicing expands the repertoire of dominant JAZ repressors of jasmonate signaling. Plant J *63*, 613-622.

de la Mata, M., Alonso, C.R., Kadener, S., Fededa, J.P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., and Kornblihtt, A.R. (2003). A Slow RNA Polymerase II Affects Alternative Splicing In Vivo. Molecular Cell *12*, 525-532.

Demarsy, E., and Fankhauser, C. (2009). Higher plants use LOV to perceive blue light. Curr Opin Plant Biol *12*, 69-74.

Deng, W., Liu, C., Pei, Y., Deng, X., Niu, L., and Cao, X. (2007). Involvement of the Histone Acetyltransferase AtHAC1 in the Regulation of Flowering Time via Repression of FLOWERING LOCUS C in *Arabidopsis*. Plant Physiol *143*, 1660-1668.

Deng, X., Gu, L., Liu, C., Lu, T., Lu, F., Lu, Z., Cui, P., Pei, Y., Wang, B., Hu, S., and Cao, X. (2010). Arginine methylation mediated by the *Arabidopsis* homolog of PRMT5 is essential for proper pre-mRNA splicing. Proc Natl Acad Sci USA *107*, 19114-19119.

Dibner, C., Schibler, U., and Albrecht, U. (2010). The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. Annual Review of Physiology *72*, 517-549.

Dodd, A.N., Salathia, N., Hall, A., Kevei, E., Toth, R., Nagy, F., Hibberd, J.M., Millar, A.J., and Webb, A.A.R. (2005). Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. Science *309*, 630-633.

Dowson-Day, M.J., and Millar, A.J. (1999). Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. Plant J *17*, 63-71.

Dunlap, J.C., Loros, J.J., Colot, H.V., Mehra, A., Belden, W.J., Shi, M., Hong, C.I., Larrondo, L.F., Baker, C.L., Chen, C.H., Schwerdtfeger, C., Collopy, P.D., **Gamsby, J.J., and Lambreghts, R.** (2007). A Circadian Clock in Neurospora: How Genes and Proteins Cooperate to Produce a Sustained, Entrainable, and Compensated Biological Oscillator with a Period of about a Day. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 72, 57-68.

Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., and Pikaard, C.S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. Plant J 45, 616-629.

Edwards, K.D., Anderson, P.E., Hall, A., Salathia, N.S., Locke, J.C.W., Lynn, J.R., Straume, M., Smith, J.Q., and Millar, A.J. (2006). FLOWERING LOCUS C mediates natural variation in the high-temperature response of the *Arabidopsis* circadian clock. Plant Cell *18*, 639-650.

Faigon-Soverna, A., Harmon, F.G., Storani, L., Karayekov, E., Staneloni, R.J., Gassmann, W., Mas, P., Casal, J.J., Kay, S.A., and Yanovsky, M.J. (2006). A Constitutive Shade-Avoidance Mutant Implicates TIR-NBS-LRR Proteins in *Arabidopsis* Photomorphogenic Development. Plant Cell *18*, 2919-2928.

Fankhauser, C., and Casal, J. (**2004**). Phenotypic characterization of a photomorphogenic mutant. Plant J *39*, 747-760.

Farinas, B., and Mas, P. (En prensa). Functional implication of the MYB transcription factor RVE8/LCL5 in the circadian control of histone acetylation. Plant J.

Farré, E.M., Harmer, S.L., Harmon, F.G., Yanovsky, M.J., and Kay, S.A. (2005). Overlapping and distinct roles of PRR7 and PRR9 in the *Arabidopsis* circadian clock. Curr Biol *15*, 47-54.

Farré, E.M., and Kay, S.A. (2007). PRR7 protein levels are regulated by light and the circadian clock in *Arabidopsis*. Plant J 52, 548-560.

Faustino, N.A., and Cooper, T.A. (2003). Pre-mRNA splicing and human disease. Genes Dev 17, 419-437.

Fernández, M.d.I.P., Chu, J., Villella, A., Atkinson, N., Kay, S.A., and Ceriani, M.F. (2007). Impaired clock output by altered connectivity in the circadian network. Proc Natl Acad Sci USA *104*, 5650-5655.

Filichkin, S.A., Priest, H.D., Givan, S.A., Shen, R., Bryant, D.W., Fox, S.E., Wong,W.K., and Mockler, T.C. (2010). Genome-wide mapping of alternative splicing in*Arabidopsis thaliana*. Genome Research 20, 45-58.

Fowler, S., Lee, S., Onouchi, H., Samarch, A., Richardson, K., Morris, B., Coupland, G., and Putterill, J. (1999). *GIGANTEA*: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. The EMBO Journal *18*, 4679-4688.

Friesen, W., Paushkin, S., Wyce, A., Massenet, S., Pesiridis, G., Van Duyne, G., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2001). The Methylosome, a 20S Complex Containing JBP1 and pICln, Produces Dimethylarginine-Modified Sm Proteins. Mol Cell Biol *21*, 8289–8300.

Fujiwara, S., Wang, L., Han, L., Suh, S.S., Salomé, P.A., McClung, C.R., and Somers, D.E. (2008). Post-translational Regulation of the *Arabidopsis* Circadian Clock through Selective Proteolysis and Phosphorylation of Pseudo-response Regulator Proteins. Journal of Biological Chemistry 283, 23073-23083.

Glaser, F.T., and Stanewsky, R. (2005). Temperature Synchronization of the *Drosophila* Circadian Clock. Curr Biol *15*, 1352-1363.

Gonsalvez, G., Rajendra, T., Tian, L., and Matera, A. (2006). The Sm-Protein methyltransferase, Dart5, is essential for germ-cell specification and maintenance. Curr Biol *16*, 1077-1089.

Gonsalvez, G.B., Tian, L., Ospina, J.K., Boisvert, F.M., Lamond, A.I., and Matera, A.G. (2007). Two distinct arginine methyltransferases are required for biogenesis of Sm-class ribonucleoproteins. J Cell Biol *178*, 733-740.

Gonsalvez, G.B., Praveen, K., Hicks, A.J., Tian, L., and Matera, A.G. (2008). Sm protein methylation is dispensable for snRNP assembly in *Drosophila melanogaster*. RNA *14*, 878-887.

Green, R.M., and Tobin, E.M. (1999). Loss of the circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression. Proc Natl Acad Sci USA *96*, 4176-4179.

Guo, H., Yang, H., Mockler, T.C., and Lin, C. (1998). Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. Science 279, 1360-1363.

Harmer, S.L. (2009). The circadian system in higher plants. Annu Rev Plant Biol 60, 357-377.

He, Y., Michaels, S.D., and Amasino, R.M. (2003). Regulation of Flowering Time by Histone Acetylation in *Arabidopsis*. Science *302*, 1751-1754.

He, Y., and Amasino, R.M. (2005). Role of chromatin modification in flowering-time control. Trends Plant Sci *10*, 30-35.

Heintzen, C., Nater, M., Apel, K., and Staiger, D. (1997). *At*GRP7, a nuclear RNAbinding protein as a component of a circadian-regulated negative feedback loop in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Science, USA 94, 8515-8520.

Hitomi, K., Okamoto, K., Daiyasu, H., Miyashita, H., Iwai, S., Toh, H., Ishiura, M., and Todo, T. (2000). Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of Synechocystis sp. PCC6803. Nucl Acids Res 28, 2353-2362.

Hoffman, P.D., Batschauer, A., and Hays, J.B. (1996). PHH1, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases. Molecular and General Genetics 253, 259-265.

Hong, S., Song, H.R., Lutz, K., Kerstetter, R.A., Michael, T.P., and McClung, C.R. (2010). Type II protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) is required for circadian

period determination in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA 107, 21211-21216.

Jackson, S.D. (2009). Plant responses to photoperiod. New Phytologist 181, 517-531.

James, A.B., Monreal, J.A., Nimmo, G.A., Kelly, C.L., Herzyk, P., Jenkins, G.I., and Nimmo, H.G. (2008). The Circadian Clock in *Arabidopsis* Roots Is a Simplified Slave Version of the Clock in Shoots. Science *322*, 1832-1835.

Jones, A.M., Chory, J., Dangl, J.L., Estelle, M., Jacobsen, S.E., Meyerowitz, E.M., Nordborg, M., and Weigel, D. (2008). The Impact of *Arabidopsis* on Human Health: Diversifying Our Portfolio. Cell *133*, 939-943.

Jones, M.A., Covington, M.F., DiTacchio, L., Vollmers, C., Panda, S., and Harmer, S.L. (2010). Jumonji domain protein JMJD5 functions in both the plant and human circadian systems. Proc Natl Acad Sci USA *107*, 21623-21628.

Kalyna, M., Lopato, S., Voronin, V., and Barta, A. (2006). Evolutionary conservation and regulation of particular alternative splicing events in plant SR proteins. Nucl Acids Res *34*, 4395-4405.

Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., Fankhauser, C., and Marja, C.P.T. (2010). Light-Regulated Plant Growth and Development. In Current Topics in Developmental Biology (Academic Press), pp. 29-66.

Kato, T., Murakami, M., Nakamura, Y., Ito, S., Nakamichi, N., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2007). Mutants of Circadian-Associated PRR Genes Display a Novel and Visible Phenotype as to Light Responses during De-Etiolation of *Arabidopsis thaliana* Seedlings. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry *71*, 834-839.

Kiba, T., Henriques, R., Sakakibara, H., and Chua, N.H. (2007). Targeted Degradation of PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 by an SCFZTL Complex Regulates Clock Function and Photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell *19*, 2516-2530.

Kim, W.Y., Fujiwara, S., Suh, S.S., Kim, J., Kim, Y., Han, L., David, K., Putterill, J., Nam, H.G., and Somers, D.E. (2007). ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. Nature *449*, 356-360.

Kleine, T., Lockhart, P., and Batschauer, A. (2003). An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. Plant J *35*, 93-103.

Kojima, S., Shingle, D.L., and Green, C.B. (2011). Post-transcriptional control of circadian rhythms. J Cell Sci *124*, 311-320.

Kolasinska-Zwierz, P., Down, T., Latorre, I., Liu, T., Liu, X.S., and Ahringer, J. (2009). Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. Nat Genet *41*, 376-381.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. Cell 128, 693-705.

Lee, J.H., Cook, J.R., Yang, Z.H., Mirochnitchenko, O., Gunderson, S.I., Felix, A.M., Herth, N., Hoffmann, R., and Pestka, S. (2005). PRMT7, a New Protein Arginine Methyltransferase That Synthesizes Symmetric Dimethylarginine. Journal of Biological Chemistry 280, 3656-3664.

Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. (2007). The Role of Chromatin during Transcription. Cell *128*, 707-719.

Lin, C., Ahmad, M., Chan, J., and Cashmore, A.R. (1996). CRY2: A second member of the *Arabidopsis* cryptochrome gene family. Plant Phisiology *110*, 1047.

Lin, C. (2002). Blue Light Receptors and Signal Transduction. Plant Cell 14, S207-225.

Liu, C., Lu, F., Cui, X., and Cao, X. (2010). Histone Methylation in Higher Plants. Annu Rev Plant Biol *61*, 395-420.

Liu, Y.G., Mitsukawa, N., Oosumi, T., and Whittier, R.F. (1995). Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. Plant J 8, 457-463. Locke, J.C.W., Southern, M.M., Kozma-Bognar, L., Hibberd, V., Brown, P.E., Turner, M.S., and Millar, A.J. (2005). Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. Mol Syst Biol *1*.

Locke, J.C.W., Kozma-Bognar, L., Gould, P.D., Feher, B., Kevei, E., Nagy, F., Turner, M.S., Hall, A., and Millar, A.J. (2006). Experimental validation of a predicted feedback loop in the multi-oscillator clock of *Arabidopsis thaliana*. Mol Syst Biol 2.

Lorkovic, Z.J. (2009). Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization. Trends Plant Sci *14*, 229-236.

Low, K.H., Lim, C., Ko, H.W., and Edery, I. (2008). Natural Variation in the Splice Site Strength of a Clock Gene and Species-Specific Thermal Adaptation. Neuron *60*, 1054-1067.

Lu, S.X., Knowles, S.M., Webb, C.J., Celaya, R.B., Cha, C., Siu, J.P., and Tobin, E.M. (2011). The JmjC domain-containing protein JMJ30 regulates period length in the *Arabidopsis* circadian clock. Plant Physiol *155*, 906-915.

Luco, R.F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B.J., Pereira-Smith, O.M., and Misteli, T. (2010). Regulation of Alternative Splicing by Histone Modifications. Science *327*, 996-1000.

Luco, R.F., Allo, M., Schor, I.E., Kornblihtt, A.R., and Misteli, T. (2011). Epigenetics in Alternative Pre-mRNA Splicing. Cell *144*, 16-26.

Ma, L., Li, J., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H., and Deng, X. (2001). Light Control of *Arabidopsis* Development Entails Coordinated Regulation of Genome Expression and Cellular Pathways. Plant Cell *13*, 2589-2607.

Majercak, J., Chen, W., and Edery, I. (**2004**). Splicing of the period gene 3' -terminal intron is regulated by light, circadian clock factors, and Phospholipase C. Mol Cell Biol *24*, 3359–3372.

Mas, P., Kim, W., Somers, D., and Kay, S.A. (2003). Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. Nature *426*, 567-570.

Matsushika, A., Makino, S., Kojima, M., and Mizuno, T. (2000). Circadian Waves of Expression of the APRR1/TOC1 Family of Pseudo-Response Regulators in *Arabidopsis thaliana*: Insight into the Plant Circadian Clock. Plant Cell Physiol *41*, 1002-1012.

Matsushika, A., Imamura, A., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2002). Aberrant expression of the light-inducible and circadian-regulated *APRR9* gene belonging to the circadian-associated APRR1/TOC1 quintet results in the phenotype of early flowering in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol *43*, 833-843.

Maury, E., Ramsey, K.M., and Bass, J. (2010). Circadian Rhythms and Metabolic Syndrome: From Experimental Genetics to Human Disease. Circ Res *106*, 447-462.

McClung, C.R. (2006). Plant Circadian Rhythms. Plant Cell 18, 792-803.

McClung, C.R. (2008). Comes a time. Curr Opin Plant Biol 11, 514-520.

McClung, C.R., and Gutiérrez, R.A. (2010). Network news: prime time for systems biology of the plant circadian clock. Curr Opin Genet Dev 20, 588-598.

Mehra, A., Baker, C.L., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2009). Post-translational modifications in circadian rhythms. Trends in Biochemical Sciences *34*, 483-490.

Meister, G., Eggert, C., Bühler, D., Brahms, H., Kambach, C., and Fischer, U. (2001). Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln. Current biology : CB *11*, 1990-1994.

Métivier, R., Penot, G., Hübner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., and Gannon,
F. (2003). Estrogen Receptor-alpha Directs Ordered, Cyclical, and Combinatorial Recruitment of Cofactors on a Natural Target Promoter. Cell *115*, 751-763. Michael, T.P., Breton, G., Hazen, S.P., Priest, H., Mockler, T.C., Kay, S.A., and Chory, J. (2008a). A Morning-Specific Phytohormone Gene Expression Program underlying Rhythmic Plant Growth. PLoS Biol *6*, e225.

Michael, T.P., Mockler, T.C., Breton, G., McEntee, C., Byer, A., Trout, J.D., Hazen, S.P., Shen, R., Priest, H.D., Sullivan, C.M., Givan, S.A., Yanovsky, M., Hong, F., Kay, S.A., and Chory, J. (2008b). Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. PLoS Genet *4*, e14.

Monani, U.R. (2005). Spinal Muscular Atrophy: A Deficiency in a Ubiquitous Protein; a Motor Neuron-Specific Disease. Neuron *48*, 885-895.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant *15*, 473–497.

Nakamichi, N., Kita, M., Ito, S., Sato, E., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2005). The *Arabidopsis* Pseudo-response Regulators, PRR5 and PRR7, Coordinately Play Essential Roles for Circadian Clock Function. Plant Cell Physiol *46*, 609-619.

Nilsen, T.W., and Graveley, B.R. (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. Nature *463*, 457-463.

Niu, L., Lu, F., Pei, Y., Liu, C., and Cao, X. (2007). Regulation of flowering time by the protein arginine methyltransferase AtPRMT10. EMBO Rep *8*, 1190-1195.

Niu, L., Zhang, Y., Pei, Y., Liu, C., and Cao, X. (2008). Redundant Requirement for a Pair of PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE4 Homologs for the Proper Regulation of *Arabidopsis* Flowering Time. Plant Physiol *148*, 490-503.

Nozue, K., Covington, M., Duek, P., Lorrain, S., Fankhauser, C., Harmer, S., and Maloof, J. (2007). Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. Nature *19*, 358-361.

Para, A., Farre, E.M., Imaizumi, T., Pruneda-Paz, J.L., Harmon, F.G., and Kay,
S.A. (2007). PRR3 Is a Vascular Regulator of TOC1 Stability in the *Arabidopsis* Circadian Clock. Plant Cell *19*, 3462-3473.

Pei, Y., Niu, L., Lu, F., Liu, C., Zhai, J., Kong, X., and Cao, X. (2007). Mutations in the type II protein arginine methyltransferase AtPRMT5 result in pleiotropic developmental defects in *Arabidopsis*. Plant Physiol *44*, 1913-1923.

Perales, M., and Mas, P. (2007). A Functional Link between Rhythmic Changes in Chromatin Structure and the *Arabidopsis* Biological Clock. Plant Cell *19*, 2111-2123.

Pien, S., Fleury, D., Mylne, J.S., Crevillen, P., Inze, D., Avramova, Z., Dean, C., and Grossniklaus, U. (2008). ARABIDOPSIS TRITHORAX1 Dynamically Regulates FLOWERING LOCUS C Activation via Histone 3 Lysine 4 Trimethylation. Plant Cell 20, 580-588.

Pomeranz Krummel, D.A., Oubridge, C., Leung, A.K.W., Li, J., and Nagai, K. (2009). Crystal structure of human spliceosomal U1 snRNP at 5.5 A resolution. Nature *458*, 475-480.

Poulos, M.G., Batra, R., Charizanis, K., and Swanson, M.S. (2011). Developments in RNA Splicing and Disease. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology *3*.

Pruneda-Paz, J.L., Breton, G., Para, A., and Kay, S.A. (2009). A Functional Genomics Approach Reveals CHE as a Component of the *Arabidopsis* Circadian Clock. Science *323*, 1481-1485.

Quail, P.H., Boylan, M.T., Parks, B.M., Short, T.W., Xu, Y., and Wagner, D. (1995). Phytochromes: Photosensory perception and signal transduction. Science *268*, 675-680.

Quail, P.H. (2010). Phytochromes. Curr Biol 20, R504-R507.

Quesada, V., Dean, C., and Simpson, G.G. (2005). Regulated RNA processing in the control of *Arabidopsis* flowering. Int J Dev Biol *49*, 773-780.

Raczynska, K.D., Simpson, C.G., Ciesiolka, A., Szewc, L., Lewandowska, D.,
McNicol, J., Szweykowska-Kulinska, Z., Brown, J.W.S., and Jarmolowski, A.
(2010). Involvement of the nuclear cap-binding protein complex in alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. Nucl Acids Res *38*, 265-278.

Reddy, A.S.N., Golovkin, M., Terzi, L.C., and Simpson, G.G. (2008). Regulation of Flowering Time by RNA Processing. In Nuclear pre-mRNA Processing in Plants (Springer Berlin Heidelberg), pp. 201-218.

Reiter, R.J., Tan, D.X., Fuentes-Broto, L., and Luciano, M. (2010). Melatonin: A Multitasking Molecule. In Progress in Brain Research (Elsevier), pp. 127-151.

Rezával, C., Werbajh, S., and Ceriani, M.F. (2007). Neuronal death in *Drosophila* triggered by GAL4 accumulation. Eur J Neurosci 25, 683-694.

Rino, J., and Carmo-Fonseca, M. (2009). The spliceosome: a self-organized macromolecular machine in the nucleus? Trends in Cell Biology *19*, 375-384.

Rosbash, M. (2009). The implications of multiple circadian clock origins. Plos Biology *17*, e62.

Salomé, P.A., and McClung, C.R. (2005a). PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 Are Partially Redundant Genes Essential for the Temperature Responsiveness of the *Arabidopsis* Circadian Clock. Plant Cell *17*, 791-803.

Salomé, P.A., and McClung, C.R. (2005b). What makes the *Arabidopsis* clock tick on time? A review on entrainment. Plant, Cell & Environment 28, 21-38.

Sanchez, S.E., Petrillo, E., Beckwith, E.J., Zhang, X., Rugnone, M.L., Hernando, C.E., Cuevas, J.C., Godoy Herz, M.A., Depetris-Chauvin, A., Simpson, C.G., Brown, J.W.S., Cerdan, P.D., Borevitz, J.O., Mas, P., Ceriani, M.F., Kornblihtt, A.R., and Yanovsky, M.J. (2010). A methyl transferase links the circadian clock to the regulation of alternative splicing. Nature *468*, 112-116.

Sarov-Blat, L., So, W., Liu, L., and Rosbash, M. (2000). The *Drosophila* takeout gene is a novel molecular link between circadian rhythms and feeding behavior. Cell *101*, 647-656.

Sato, E., Nakamichi, N., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2002). Aberrant expression of the *Arabidopsis* circadian-regulated *APRR5* gene belonging to the APRR1/TOC1

quintet results in early flowering and hypersensitiveness to light in early photomorphogenesis. Plant Cell Physiology *43*, 1374-1385.

Scebba, F., Bastiani, M.D., Bernacchia, G., Andreucci, A., Galli, A., and Pitto, L. (2007). PRMT11: a new *Arabidopsis* MBD7 protein partner with arginine methyltransferase activity. Plant J *52*, 210-222.

Schmitz, R., Sung, S., and Amasino, R. (2008). Histone arginine methylation is required for vernalization-induced epigenetic silencing of FLC in winter-annual *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA *105*, 411-416.

Schor, I.E., Rascovan, N., Pelisch, F., Alló, M., and Kornblihtt, A.R. (2009). Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. Proc Natl Acad Sci USA *106*, 4325-4330.

Seo, M., Nambara, E., Choi, G., and Yamaguchi, S. (2009). Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. Plant Molecular Biology *69*, 463-472.

Sharp, P.A., and Burge, C.B. (1997). Classification of Introns: U2-Type or U12-Type. Cell *91*, 875-879.

Sheth, N., Roca, X., Hastings, M.L., Roeder, T., Krainer, A.R., and Sachidanandam, R. (2006). Comprehensive splice-site analysis using comparative genomics. Nucl Acids Res *34*, 3955-3967.

Simpson, C.G., Fuller, J., Maronova, M., Kalyna, M., Davidson, D., McNicol, J., Barta, A., and Brown, J.W.S. (2008). Monitoring changes in alternative precursor messenger RNA splicing in multiple gene transcripts. Plant J *53*, 1035-1048.

Somers, D.E., Devlin, P.F., and Kay, S.A. (1998). Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. Science 282, 1488-1490.

Somers, D.E., Kim, W.Y., and Geng, R. (2004). The F-Box Protein ZEITLUPE Confers Dosage-Dependent Control on the Circadian Clock, Photomorphogenesis, and Flowering Time. Plant Cell *16*, 769-782.

Staiger, D., Zecca, L., Kirk, D.A.W., Apel, K., and Eckstein, L. (2003). The circadian clock regulated RNA-binding protein AtGRP7 autoregulates its expression by influencing alternative splicing of its own pre-mRNA. Plant J *33*, 361-371.

Staiger, D., and Köster, T. (2011). Spotlight on post-transcriptional control in the circadian system. Cellular and Molecular Life Sciences *68*, 71-83.

Sukumaran, S., Almon, R.R., DuBois, D.C., and Jusko, W.J. (2010). Circadian rhythms in gene expression: Relationship to physiology, disease, drug disposition and drug action. Advanced Drug Delivery Reviews *62*, 904-917.

Takahashi, J.S., Hong, H.K., Ko, C.H., and McDearmon, E.L. (2008). The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. Nat Rev Genet *9*, 764-775

Tamada, Y., Yun, J.Y., Woo, S.c., and Amasino, R.M. (2009). *ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED7* Is Required for Methylation of Lysine 4 of Histone H3 and for Transcriptional Activation of *FLOWERING LOCUS C*. Plant Cell 21, 3257-3269.

Tepperman, J., Zhu, T., Chang, H., Wang, X., and Quail, P. (2001). Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. Proc Natl Acad Sci USA *98*, 9437-9442.

Thomas, B., and Vince-Prue, D. (1997). Photoperiodism in plants (Academic Press. New York).

Tomioka, K., and Matsumoto, A. (2010). A comparative view of insect circadian clock systems. Cellular and Molecular Life Sciences 67, 1397-1406.

Tusher, V.G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc Natl Acad Sci USA 98, 5116-5121.

Wahl, M.C., Will, C.L., and Lührmann, R. (2009). The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. Cell *136*, 701-718.

Wang, G.S., and Cooper, T.A. (2007). Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. Nat Rev Genet 8, 749-761.

Wang, L., Fujiwara, S., and Somers, D.E. (2010). PRR5 regulates phosphorylation, nuclear import and subnuclear localization of TOC1 in the *Arabidopsis* circadian clock. EMBO J 29, 1903-1915.

Wang, X., Zhang, Y., Ma, Q., Zhang, Z., Zue, Y., Bao, S., and Chong, K. (2007). SKB1-mediated symmetric dimethylation of histone H4R3 controls flowering time in *Arabidopsis*. EMBO J *26*, 1934-1941.

Wu, K., Malik, K., Tian, L., Brown, D., and Miki, B. (2000). Functional analysis of a RPD3 histone deacetylase homologue in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology *44*, 167-176.

Xu, X., Hoang, S., Mayo, M., and Bekiranov, S. (2010). Application of machine learning methods to histone methylation ChIP-Seq data reveals H4R3me2 globally represses gene expression. BMC Bioinformatics *11*, 396.

Yamamoto, Y., Sato, E., Shimizu, T., Nakamich, N., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Nagatani, A., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2003). Comparative genetic studies on the APRR5 and APRR7 genes belonging to the APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythm, control of flowering, and early photomorphogenesis. Plant Cell Physiology *44*, 1119-1130.

Yanovsky, M.J., Izaguirre, M., Wagmaister, J.A., Gatz, C., Jackson, S.D., Thomas,
B., and Casal, J.J. (2000a). Phytochrome A resets the circadian clock and delays tuber formation under long days in potato. Plant J 23, 223-232.

Yanovsky, M.J., Mazzella, M.A., and Casal, J.J. (2000b). A quadruple photoreceptor mutant still keeps track of time. Curr Biol *10*, 1013-1015.

Yanovsky, M.J., and Kay, S.A. (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis. Nature *419*, 308-312.

Yanovsky, M.J., and Kay, S.A. (2003). Living by the calendar: How plants know when to flower. Nature Reviews *4*, 265-275.

Zeilinger, M.N., Farre, E.M., Taylor, S.R., Kay, S.A., and Doyle, F.J. (2006). A novel computational model of the circadian clock in *Arabidopsis* that incorporates PRR7 and PRR9. Mol Syst Biol 2.

Zhang, D., Abovich, N., and Rosbash, M. (2001). A Biochemical Function for the Sm Complex. Molecular Cell *7*, 319-329.

Zhang, N., and Portis Jr, A. (1999). Mechanism of light regulation of Rubisco: A specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. Proc Natl Acad Sci USA *96*, 9438–9443.

Zhang, N., Kallis, R.P., Ewy, R.G., and Portis, A.R. (2002). Light modulation of Rubisco in *Arabidopsis* requires a capacity for redox regulation of the larger Rubisco activase isoform. Proc Natl Acad Sci USA *99*, 3330-3334.

Zhang, X., Byrnes, J., Gal, T., Li, W.H., and Borevitz, J. (2008). Whole genome transcriptome polymorphisms in *Arabidopsis thaliana*. Genome Biol 9, R165.

Zhang, Z., Lotti, F., Dittmar, K., Younis, I., Wan, L., Kasim, M., and Dreyfuss, G. (2008). SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. Cell *133*, 585–600.

Zhang, Z., Zhang, S., Zhang, Y., Wang, X., Li, D., Li, Q., Yue, M., Li, Q., Zhang, Y.e., Xu, Y., Xue, Y., Chong, K., and Bao, S. (En prensa). *Arabidopsis* Floral Initiator SKB1 Confers High Salt Tolerance by Regulating Transcription and PremRNA Splicing through Altering Histone H4R3 and Small Nuclear Ribonucleoprotein LSM4 Methylation. Plant Cell, tpc.110.081356.

Zhou, A., Wang, H., Walker, J.C., and Li, J. (2004). BRL1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating *Arabidopsis* brassinosteroid signaling. Plant J *40*, 399-409.

<u>Apéndice</u>

<u>Tabla 1</u>

Genes cuyo nivel de expresión está aumentado en plantas mutantes prmt5-5.

A continuación se listan los genes cuyo nivel de expresión se encuentra aumentado, al menos 1,5 veces, en plantas mutantes *prmt5-5* respecto de plantas salvajes. Estos resultados fueron obtenidos a partir de microarreglos de expresión. Para más detalle, ver Materiales y Métodos, "Análisis global: Microarreglos de expresión en *A. thaliana*"; y Resultados, "Análisis a gran escala: cambios de expresión globales en la mutante".

Locus: representa el gen afectado. El código con que se indica cada uno de ellos, es la anotación que se le ha dado en el *TAIR* (*The Arabidopsis Information Resource*). En los casos donde hay más de un loci, se debe a que las sondas que muestran cambios en la señal de hibridación, son homólogas a más de un gen, razón por la cual no se puede asegurar cuál de ellos está alterado y se señalan ambos.

Nivel de Cambio: este parámetro se calcula dividiendo la expresión obtenida para la mutante, por la expresión de la planta salvaje. El nivel de expresión está dado por la intensidad de la señal de distintas sondas correspondientes a un mismo gen, y los cálculos se realizan con el promedio de las tres réplicas biológicas realizadas.

_	Nivel de
Locus	Cambio
	(<i>prmt5-5</i> /WT)
AT2G46670; AT2G46790	6,45
AT1G12730	5,62
AT1G13650	4,68
AT1G36180	4,32
AT3G27930	4,16
AT2G25760	4,11
ATCG00600	3,98
ATCG00360	3,91
AT4G22950	3,69
ATCG01070	3,65
ATCG00150	3,60
AT4G16870	3,54
AT1G48260	3,48
AT1G18710	3,42

AT3G47340	3,42
AT3G19670	3,41
AT3G46210	3,40
AT3G16360	3,37
AT3G24515	3,32
AT3G04460	3,26
AT2G25760	3,26
AT5G28030	3,15
AT5G10140	3,11
AT5G01510	3,07
AT2G41705	3,07
AT4G31150	3,05
AT3G04810	2,98
AT1G44780	2,98
AT2G26810	2,97
AT3G44990	2,96
AT1G03750	2,95
AT5G42690	2,89
AT3G13225	2,86

AT5G47240	2,85
AT3G28130	2,78
AT5G50550; AT5G50650	2,76
ATCG00680	2,76
AT1G68820	2,73
AT2G25740	2,72
AT2G32150	2,71
ATCG00690	2,69
AT3G12170	2,66
AT3G22190	2,63
AT2G39250	2,61
AT1G51280	2,60
AT2G18770	2,60
AT1G61660	2,58
ATCG00500	2,57
AT1G73980	2,55
AT1G53885	2,54
AT2G18600	2,54
AT1G74810	2,48
AT2G05540	2,46
AT4G34650	2,44
AT1G32090	2,44
AT1G68190	2,43
AT1G61890	2,42
AT3G02740	2,40
AT4G34140	2,39
AT5G42400	2,39
AT1G70700	2,39
AT2G26770	2,38
AT5G02810	2,38
AT1G77890	2,38
AT3G20910	2,37
AT3G20450	2,35
AT2G42160	2,35
AT5G44660	2,32
AT5G06190	2,32
AT3G61570	2,31
ATCG00140	2,31
AT3G16690	2,30
AT1G02205	2,29

AT3G14660	2,28
AT1G80800	2,26
AT2G47410	2,26
AT5G44750	2,26
AT3G19350	2,25
AT4G33790	2,23
AT1G19340	2,22
AT5G41140	2,22
AT3G54230	2,20
AT1G08890; AT1G08900	2,19
AT3G53920	2,18
AT4G18750	2,18
AT5G05600	2,16
AT4G17150	2,15
AT1G14660	2,15
AT2G27480	2,14
AT5G50160	2,14
AT5G08500	2,14
AT2G24120	2,13
AT5G11800	2,12
AT4G16566	2,12
AT1G19690	2,11
AT4G21170	2,11
AT5G11950	2,11
AT5G09410	2,10
AT5G60890	2,10
AT1G62510	2,07
AT4G29100	2,07
AT2G32700	2,07
AT2G34780	2,05
AT1G09440	2,05
AT3G47530	2,05
AT5G40910	2,04
AT3G16840	2,03
AT3G53370	2,03
AT3G20440	2,02
AT4G14970	2,02
AT2G01860	2,02
AT1G61400	2,02
AT1G20030	2,01

AT5G029402,01AT2G434302,01AT1G159602,01AT1G12902,00AT1G622902,00AT1G12350; AT5G020801,99AT5G252701,98AT5G5571001,98AT2G315301,98AT1G537101,98AT1G53440; AT1G534501,98AT1G705701,97AT1G705701,97AT1G717201,96AT5G192101,96AT3G23480; AT3G234701,96AT3G515301,94AT3G515301,94AT3G515301,91AT3G593001,93AT1G79700; AT1G796901,91AT3G481101,91AT3G38201,89AT3G014901,88AT1G222401,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G52001,86AT4G303301,85	AT3G18500	2,01
AT2G434302,01AT1G159602,01AT2G027102,00AT1G622902,00AT1G12350; AT5G020801,99AT5G252701,98AT5G571001,98AT2G315301,98AT1G53440; AT1G534501,98AT1G705701,97AT1G705701,97AT1G717201,96AT3G23480; AT3G234701,96AT3G23480; AT3G515301,94AT3G515301,94AT3G515301,94AT3G515301,91AT3G481101,91AT2G338201,89AT3G014901,88AT1G222401,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G73401,86AT3G3301,85	AT5G02940	2,01
AT1G159602,01AT2G027102,00AT1G622902,00AT1G12350; AT5G020801,99AT5G252701,98AT5G571001,98AT2G315301,98AT1G53440; AT1G534501,98AT1G705701,97AT1G705701,97AT1G705701,97AT1G717201,96AT5G192101,96AT3G23480; AT3G234701,96AT3G515301,94AT3G515301,94AT3G515301,94AT3G515301,91AT3G515301,91AT3G538201,89AT3G014901,88AT1G222401,88AT1G223401,88AT1G2338201,89AT3G014901,88AT1G222401,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G33301,85	AT2G43430	2,01
AT2G027102,00AT1G622902,00AT1G12350; AT5G020801,99AT5G252701,98AT5G551001,98AT2G315301,98AT1G537101,98AT1G53440; AT1G534501,98AT1G705701,97AT1G70801,97AT1G717201,96AT5G192101,96AT3G23480; AT3G234701,96AT3G23480; AT3G515301,94AT3G593001,93AT1G79700; AT1G796901,91AT3G481101,91AT3G481101,91AT3G014901,88AT1G222401,88AT1G052001,88AT1G052001,88AT1G052001,88AT1G052001,86AT3G247401,86AT3G234701,86	AT1G15960	2,01
AT1G622902,00AT1G12350; AT5G020801,99AT5G252701,98AT5G5571001,98AT2G315301,98AT1G537101,98AT1G53440; AT1G534501,98AT1G705701,97AT1G70801,97AT1G717201,96AT5G192101,96AT3G23480; AT3G234701,96AT3G23480; AT3G515301,94AT3G515301,94AT3G515301,94AT3G593001,93AT1G79700; AT1G796901,91AT3G481101,91AT3G014901,88AT1G222401,88AT1G222401,88AT1G222401,88AT1G222401,88AT1G222401,88AT1G222401,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G303301,85	AT2G02710	2,00
AT1G12350; AT5G0208001,99AT5G252701,98AT5G571001,98AT2G315301,98AT1G537101,98AT1G53440; AT1G534501,98AT1G705701,97AT1G70801,97AT1G717201,96AT5G192101,96AT3G23480; AT3G234701,96AT3G515301,94AT3G515301,94AT3G515301,94AT3G515301,91AT3G563801,91AT3G481101,91AT3G014901,88AT1G2224401,88AT1G2224701,86AT3G523401,86	AT1G62290	2,00
AT5G252701,98AT5G571001,98AT2G315301,98AT1G537101,98AT1G53440; AT1G534501,98AT1G705701,97AT1G705701,97AT1G770801,97AT1G717201,96AT5G192101,96AT3G23480; AT3G234701,96AT3G515301,94AT3G515301,94AT3G593001,93AT1G79700; AT1G796901,91AT3G481101,91AT3G481101,91AT3G014901,88AT1G22201,89AT3G014901,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT2G228401,88AT2G173401,86AT4G303301,85	AT1G12350; AT5G02080	1,99
AT5G571001,98AT2G315301,98AT1G537101,98AT1G53440; AT1G534501,98AT1G705701,97AT1G705701,97AT1G70801,97AT1G717201,96AT5G192101,96AT3G23480; AT3G234701,96AT3G515301,94AT3G593001,93AT1G79700; AT1G796901,91AT3G563801,91AT3G481101,91AT3G48101,91AT3G014901,88AT1G283401,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT3G517301,86AT3G014901,88AT3G014901,88AT1G52001,88AT2G338201,89AT3G014901,88AT2G228401,88AT2G33301,85	AT5G25270	1,98
AT2G315301,98AT1G537101,98AT1G53440; AT1G534501,98AT1G705701,97AT1G705701,97AT1G70801,97AT1G717201,96AT5G192101,96AT3G23480; AT3G234701,96AT1G739201,95AT3G515301,94AT3G593001,93AT1G79700; AT1G796901,91AT3G481101,91AT3G481101,91AT2G221901,89AT3G014901,88AT1G283401,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT2G228401,88AT2G173401,86AT4G303301,85	AT5G57100	1,98
AT1G537101,98AT1G53440; AT1G534501,98AT1G705701,97AT1G705701,97AT1G70801,97AT1G717201,96AT5G192101,96AT3G23480; AT3G234701,96AT3G234701,96AT3G515301,94AT3G593001,93AT1G79700; AT1G796901,91AT3G563801,91AT3G481101,91AT3G338201,89AT3G014901,88AT1G283401,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT2G228401,88AT2G173401,86AT4G303301,85	AT2G31530	1,98
AT1G53440; AT1G534501,98AT1G705701,97AT1G70801,97AT1G717201,96AT5G192101,96AT3G23480; AT3G234701,96AT1G739201,95AT3G515301,94AT3G593001,93AT1G79700; AT1G796901,91AT3G481101,91AT3G5133201,89AT3G548101,91AT3G48101,91AT2G221901,88AT1G283401,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT2G173401,86AT4G303301,85	AT1G53710	1,98
AT1G705701,97AT1G770801,97AT1G717201,96AT5G192101,96AT3G23480; AT3G234701,96AT1G739201,95AT3G515301,94AT3G593001,93AT1G79700; AT1G796901,91AT5G563801,91AT3G481101,91AT2G221901,89AT3G014901,88AT1G283401,88AT1G52001,88AT1G52001,88AT3G51401,86AT3G3301,85	AT1G53440; AT1G53450	1,98
AT1G770801,97AT1G717201,96AT5G192101,96AT3G23480; AT3G234701,96AT1G739201,95AT3G515301,94AT3G593001,93AT1G79700; AT1G796901,91AT5G563801,91AT3G5481101,91AT2G221901,89AT3G014901,88AT1G283401,88AT1G052001,88AT2G173401,86AT5G247401,86AT4G303301,85	AT1G70570	1,97
AT1G717201,96AT5G192101,96AT3G23480; AT3G234701,96AT1G739201,95AT3G515301,94AT3G593001,93AT1G79700; AT1G796901,91AT5G563801,91AT3G481101,91AT2G221901,89AT3G014901,88AT1G283401,88AT1G52001,88AT2G228401,88AT2G173401,86AT5G247401,86AT4G303301,85	AT1G77080	1,97
AT5G192101,96AT3G23480; AT3G234701,96AT1G739201,95AT3G515301,94AT3G593001,93AT1G79700; AT1G796901,91AT5G563801,91AT3G481101,91AT2G221901,89AT3G014901,88AT1G283401,88AT1G052001,88AT2G173401,86AT5G247401,86	AT1G71720	1,96
AT3G23480; AT3G234701,96AT1G739201,95AT3G515301,94AT3G593001,93AT1G79700; AT1G796901,91AT5G563801,91AT3G481101,91AT2G221901,89AT3G014901,88AT1G283401,88AT1G52001,88AT2G328401,88AT2G173401,86AT5G247401,86AT4G303301,85	AT5G19210	1,96
AT1G739201,95AT3G515301,94AT3G593001,93AT1G79700; AT1G796901,91AT5G563801,91AT5G563801,91AT3G481101,91AT2G221901,89AT3G014901,88AT1G283401,88AT2G228401,88AT2G173401,86AT5G247401,86AT4G303301,85	AT3G23480; AT3G23470	1,96
AT3G515301,94AT3G593001,93AT1G79700; AT1G796901,91AT5G563801,91AT5G563801,91AT3G481101,91AT2G221901,89AT2G338201,89AT3G014901,88AT1G283401,88AT2G228401,88AT2G173401,86AT5G247401,86AT4G303301,85	AT1G73920	1,95
AT3G593001,93AT1G79700; AT1G796901,91AT5G563801,91AT3G481101,91AT2G221901,89AT2G338201,89AT3G014901,88AT1G283401,88AT2G228401,88AT2G173401,86AT5G247401,86AT4G303301,85	AT3G51530	1,94
AT1G79700; AT1G796901,91AT5G563801,91AT3G481101,91AT3G481101,91AT2G221901,89AT2G338201,89AT3G014901,88AT1G283401,88AT2G228401,88AT2G173401,86AT5G247401,86AT4G303301,85	AT3G59300	1,93
AT5G563801,91AT3G481101,91AT2G221901,89AT2G338201,89AT3G014901,88AT1G283401,88AT2G228401,88AT1G052001,88AT2G173401,86AT5G247401,86AT4G303301,85	AT1G79700; AT1G79690	1,91
AT3G481101,91AT2G221901,89AT2G338201,89AT3G014901,88AT1G283401,88AT2G228401,88AT1G052001,88AT2G173401,86AT5G247401,86AT4G303301,85	AT5G56380	1,91
AT2G221901,89AT2G338201,89AT3G014901,88AT1G283401,88AT2G228401,88AT1G052001,88AT2G173401,86AT5G247401,86AT4G303301,85	AT3G48110	1,91
AT2G338201,89AT3G014901,88AT1G283401,88AT2G228401,88AT1G052001,88AT2G173401,86AT5G247401,86AT4G303301,85	AT2G22190	1,89
AT3G014901,88AT1G283401,88AT2G228401,88AT1G052001,88AT2G173401,86AT5G247401,86AT4G303301,85	AT2G33820	1,89
AT1G283401,88AT2G228401,88AT1G052001,88AT2G173401,86AT5G247401,86AT4G303301,85	AT3G01490	1,88
AT2G228401,88AT1G052001,88AT2G173401,86AT5G247401,86AT4G303301,85	AT1G28340	1,88
AT1G052001,88AT2G173401,86AT5G247401,86AT4G303301,85	AT2G22840	1,88
AT2G173401,86AT5G247401,86AT4G303301,85	AT1G05200	1,88
AT5G24740 1,86 AT4G30330 1,85	AT2G17340	1,86
AT4G30330 1,85	AT5G24740	1,86
	AT4G30330	1,85

AT5G05040; AT5G05060	1,85
AT1G26190	1,85
AT5G05310	1,84
AT3G16750	1,84
AT3G07590	1,84
AT2G22830	1,83
AT5G45300	1,83
AT5G57660	1,83
AT1G10320	1,83
AT3G50430	1,83
AT2G15690	1,82
AT1G03160	1,81
AT1G26770	1,81
AT3G09560	1,81
AT3G59430	1,81
AT3G50240	1,81
AT3G13340	1,80
AT5G35910	1,80
AT5G23690	1,80
AT3G16340	1,79
AT5G39060; AT3G29120; AT1G62766; AT1G08105	1,79
AT2G28360	1,79
AT3G26690	1,79
AT3G01150	1,78
AT1G42470	1,78
AT1G29750	1,78
AT5G50730	1,78
AT5G52100	1,78
AT1G08810	1,77
AT4G16770	1,77
AT3G02890	1,77
AT3G48200	1,77
AT2G38760	1,77
AT1G30550	1,77
AT1G10570	1,76
AT5G03200	1,76

AT4G37460	1,76
AT5G06970	1,76
AT1G54440	1,76
AT1G60860	1,76
AT2G25710	1,76
AT3G48500	1,75
AT5G57960	1,75
AT5G65205	1,75
AT1G34340	1,75
AT5G16970	1,75
AT3G15590	1,75
AT1G32640	1,74
AT4G32910	1,74
AT4G33490	1,74
AT1G56300	1,74
AT5G63530	1,74
AT5G50740	1,74
AT2G33830	1,73
AT5G63700	1,73
AT2G19080	1,73
AT2G02740	1,73
AT4G16590	1,73
AT5G18630	1,73
AT1G22740	1,72
AT5G48640	1,72
AT3G43220	1,72
AT5G58390	1,72
AT3G27690	1,72
AT5G57630	1,72
AT1G80050	1,72
AT3G06380	1,72
AT2G18440	1,71
AT1G80920	1,70
AT1G28330	1,70
AT3G22660	1,70
AT2G43360	1,70
AT1G73750	1,70
AT5G01370	1,70
AT3G28530;	1.70
AT1G36770	-,. ~
AT4G21470	1,70

AT5G13740	1,70
AT3G06530	1,70
AT5G51660	1,70
AT2G40435	1,69
AT5G39350	1,69
AT1G47500; AT1G47490	1,69
AT4G32320	1,69
AT1G63680	1,68
AT1G14040	1,68
AT3G29320	1,68
AT5G64220	1,68
AT5G04490	1,68
AT5G60120	1,68
AT5G53050	1,68
AT2G46610	1,68
AT4G02020	1,68
AT5G51940	1,68
AT3G61780	1,67
AT5G62990	1,67
AT5G40500	1,67
AT5G15320	1,67
AT4G32880	1,67
AT2G40960	1,67
AT3G27610	1,67
AT1G09660	1,66
AT1G73660	1,66
AT2G15960	1,66
AT1G50730	1,66
AT5G43790	1,65
AT5G01390	1,65
AT2G22990	1,65
AT1G72450	1,65
AT3G53800	1,65
AT5G63780	1,65
AT2G16940	1,65
AT3G63520	1,65
AT2G22980	1,64
AT2G28550	1,64
AT5G23330	1,64
AT1G76360	1,64

AT4G00620; AT4G00600	1,64
AT3G09310	1,64
AT5G11040	1,63
AT5G51410	1,63
AT1G06780	1,63
AT4G08310	1,63
AT3G06500	1,63
AT2G40316	1,62
AT3G62550	1,62
AT5G16000	1,62
AT3G10520	1,62
AT3G20430	1,61
AT4G39900	1,61
AT5G66540	1,61
AT2G30600	1,61
AT2G02170	1,61
AT5G18640	1,61
AT2G15890	1,61
AT1G61065	1,61
AT2G26870	1,61
AT1G08660	1,61
AT2G21380	1,61
AT1G71440	1,61
AT5G19180	1,60
AT1G69523	1,60
AT3G04610	1,60
AT2G43400	1,60
AT3G15840	1,60
AT2G16630	1,59
AT1G78080	1,59
AT2G29210	1,59
AT2G44650	1,59
AT1G72090	1,59
AT5G08400	1,58
AT3G62220	1,58
AT3G45240	1,58
AT4G00180	1,58
AT1G32750	1,57
AT1G54260	1,57
AT1G42540	1,57

AT3G18110	1,57
AT4G01510	1,57
AT4G38110	1,57
AT5G59130	1,57
AT2G42270	1,57
AT5G41870	1,57
AT4G17960	1,57
AT1G77480	1,57
AT2G34640	1,56
AT2G03530	1,56
AT1G74950	1,56
AT5G52380	1,56
AT1G19970	1,56
AT1G76730	1,56
AT3G20720	1,56
AT3G10140	1,55
AT3G16000	1,55
AT3G60180	1,55
AT1G60490	1,55
AT3G50440	1,55
AT1G34150	1,55
AT4G18270	1,55
AT3G33530	1,55
AT5G06750	1,55
AT5G09880	1,55
AT1G19750; AT1G27840	1,54
AT1G52880	1,54
AT3G56070	1,54
AT5G44250	1,54
AT5G22280	1,54
AT1G27520	1,53
AT5G47220	1,53
AT5G42030	1,53
AT1G17680	1,53
AT3G16940	1,53
AT1G53590	1,52
AT3G54720	1,52
AT3G19510	1,52
AT4G16146	1,52
AT4G04340	1,52

AT4G27820	1,52
AT5G56750	1,52
AT5G55700	1,52
AT5G37850	1,52
AT1G73350	1,51
AT5G61830	1,51
AT1G48460	1,51
AT5G10940	1,51

AT1G22335	1,51
AT2G23930	1,51
AT1G59750	1,50
AT4G05040	1,50
AT4G10920	1,50
AT1G18620	1,50

<u>Tabla 2</u>

Genes cuyo nivel de expresión disminuye en plantas mutantes prmt5-5.

A continuación se listan los genes cuyo nivel de expresión presentan una disminución, al menos de 1,5 veces, en plantas mutantes *prmt5-5* respecto al de plantas salvajes. Estos resultados fueron obtenidos a partir de microarreglos de expresión. Para más detalle, ver Materiales y Métodos, "Análisis global: Microarreglos de expresión en *A. thaliana*"; y Resultados, "Análisis a gran escala: cambios de expresión globales en la mutante".

Locus: representa el gen afectado. El código con que se indica cada uno de ellos, es la anotación que se le ha dado en el *TAIR (The Arabidopsis Information Resource)*. En los casos donde hay más de un loci, se debe a que las sondas que muestran cambios en la señal de hibridación, son homólogas a más de un gen, razón por la cual, no se puede asegurar cuál de ellos está alterado y se señalan ambos.

Nivel de Cambio: este parámetro se calcula dividiendo la expresión obtenida para la mutante, por la expresión de la planta salvaje. El nivel de expresión está dado por la intensidad de la señal de distintas sondas correspondientes a un mismo gen, y los cálculos se realizan con el promedio de las tres réplicas biológicas realizadas.

Locus	Nivel de Cambio (<i>prmt5-5/</i> WT)
AT5G24770; AT5G24780	0,18
AT2G39030	0,21
AT1G72260	0,23
AT5G22460	0,25
AT5G03350	0,26
AT5G10760	0,26
AT3G50480	0,27
AT5G55450	0,27
AT4G23220	0,27
AT5G59670	0,28
AT2G14560	0,29
AT3G26960	0,32
AT4G01700	0,33
AT1G34750	0,33

AT5G60900	0,34
AT2G40100	0,35
AT1G09740	0,36
AT2G32160	0,36
AT3G50280	0,37
AT1G56500	0,38
AT1G76020	0,39
AT1G26260	0,40
AT3G48080	0,40
AT3G56710	0,42
AT5G25440	0,42
AT1G69730; AT1G69720	0,42
AT5G18690	0,42
AT2G33810	0,43
AT5G53370	0,43
AT5G58770	0,43

AT1G08450	0,44
AT5G58120	0,44
AT4G21650	0,44
AT3G57700	0,45
AT5G08100	0,45
AT1G22550	0,46
AT5G37600	0,46
AT4G02330	0,46
AT4G32870	0,47
AT4G00050	0,47
AT2G17220	0,47
AT5G40780	0,47
AT3G26200	0,47
AT5G64550	0,48
AT2G39210	0,48
AT4G02420	0,48
AT3G29030	0,49
AT1G62500	0,49
AT3G14620	0,50
AT3G53970	0,50
AT3G16770	0,50
AT3G52470	0,50
AT1G07000	0,51
AT4G08470	0,51
AT1G12110	0,51
AT5G47550	0,51
AT5G48540	0,51
AT5G39020	0,51
AT1G56430	0,51
AT2G25590	0,52
AT1G74210	0,52
AT2G17120	0,52
AT1G59960	0,52
AT1G72910;	0.52
AT1G72930	0,52
AT5G02230	0,53
AT5G23850	0,53
AT1G03370	0,53
AT5G64120	0,53

AT3G26170; AT3G26180	0,53
AT3G10620	0.53
AT5G19240	0.53
AT2G14900	0.54
AT5G36220	0,54
AT5G52540	0.54
AT4G38220	0.54
AT2G20630	0.54
AT4G03200	0,54
AT5G46420	0,54
AT5G48830	0,54
AT1G16260	0,54
AT4G21860	0,55
AT5G52810	0,55
AT4G13510	0,55
AT1G71040	0,55
AT10/1040	0,55
AT4G26070	0,50
AT2G30695	0,50
AT1C06830	0,50
no match	0,50
	0,50
AT3C01810	0,57
AT3028940	0,57
AT5G46780	0,57
AT1G040780	0,37
AT1004040 AT4G35000	0,57
AT4033090	0,57
AT1077760	0,37
AT10///00	0,37
AT1C05620	0,38
ATIG05030	0,58
AT2G35960	0,58
AT2G3/9/0	0,58
A14014303	0,58
A13G31830	0,58
A13G49/20	0,58
A15G3/260	0,58
AT3G16/00	0,59
AT1G63260	0,59
AT2G41310	0,59

AT1G72800	0,59
AT2G23600.	
AT2G23500,	0,59
A12023390	
AT5G11970	0,59
AT1G16670	0,59
AT4G39710	0,59
AT4G17890	0,59
AT2G15320	0,59
AT2C21990.	
A12031880, AT2G31890	0,59
A12031070	
AT1G04530	0,59
AT1G04350	0,60
AT1G03820	0,60
AT4G33050	0,60
AT2G32580	0,60
AT1C18010.	
AT1G18010, AT1G18000	0,60
A11018000	
AT1G55840	0,60
AT2G48030	0,60
AT1G14890	0,60
AT3G50960	
AT3G50950	0,60
113030730	
AT5G59030	0,61
AT1G53000	0,61
AT2G42610	0,61
AT1G02500	0,61
AT5G53120	0,61
AT5G51560	0,61
AT2G01540	0,61
AT1G62660	0,61
AT5G48485	0,61
AT2G37710	0,61
AT5C06210.	
AT3000310;	0,61
AT3G62290	0,61
AT1G20830	0,61
AT4G37800	0,61

AT1G35720	0,61
AT1G28680	0,62
AT4G26480	0,62
AT4G26940	0,62
AT4G36660	0,62
AT5G62140	0,62
AT4G20070	0,62
AT5G40850	0,62
AT3G11280	0,62
AT5G23760	0,62
AT2G14530	0,62
AT1G64740	0,62
AT4G17070	0,63
AT1G31690	0,63
AT2G19130	0,63
AT2G03550	0,63
AT3G23600	0,63
AT5G19250	0,63
AT2G39780	0,64
AT5G47560	0,64
AT5G21100	0,64
AT2G19940	0,64
AT1G66970	0,64
AT1G64230	0,64
AT1G72770	0,64
AT2G32080	0,64
AT2G38010	0,64
AT4G25900	0,64
AT3G27110	0,64
AT3G57790	0,64
AT1G73650	0,65
AT2G19460	0,65
AT3G14220	0,65
AT4G32590	0,65
AT5G49630	0,65
AT1G78300	0,65
AT1G04680	0,65
AT3G23810	0,65
AT5G44130	0,65
AT1G19140	0,66
AT1G04620	0,66
AT5G21090	0,66
AT4G25450	0.66
-----------	------
AT4G29810	0.66
AT4G28400	0,66
AT4G10880	0,00
AT4019880	0,00
AT4G39730	0,66

AT4G14410	0,66
AT1G55000	0,67
AT1G05810	0,67

<u>Tabla 3</u>

Genes que presentan retención de intrón en mutantes *prmt5-5* comparado con plantas salvajes.

A continuación se listan los genes y los respectivos intrones, que presentan nivel de hibridación más alto en mutantes *prmt5* que en plantas salvajes. Estos resultados fueron obtenidos a partir de *tiling-arrays*. Para más detalle, ver Materiales y Métodos, "Análisis global: *tiling-arrays*"; y Resultados, "PRMT5 y el *splicing alternativo*".

Locus: representa el gen afectado. El código con que se indica cada uno de ellos, es la anotación que se le ha dado en el *TAIR* (*The Arabidopsis Information Resource*).

Intrón Alterado: Se indica el intrón retenido por las mutantes en relación a las plantas salvajes, a partir de la secuencia de dos de las sondas que presentan aumento en la señal de hibridación.

Loong	Intrón Alterado	
Locus	Sonda 1	Sonda 2
AT5G42030	gcctcttccttgttctgtgaaaaaa	taagggcggattatgattgaacgga
AT1G71695	cgattccgtcgtcctagtaaccaca	caaaccattagtctacaagtcacac
AT4G39900	gaagtgggaaaacatctgcatcgca	catgatacactgatttagaagagca
AT5G58140	cattgcgcctgtatagtgatgcatt	gtgtttcagtttattcatggtttac
AT5G02160	tcatagtttattgtccggttcaaca	gattgtacattgtgagtttaagctc
AT2G17340	gcttccagaaactactcttgatgta	taaataaggtcggaagagagaagta
AT1G03160	tatcgtgatgctcgtgaggtttatc	tatgtcttttccttgatagtctctg
AT1G78630	gaagaagctaatggccctgtaacga	ggcttgaaacctttattgagtgtat
AT1G76730	ggctaactgcaccaagaattcaaat	ttcgctaactaaggcaaaacctaga
AT4G27520	gcgtagctaaaatctgcaagaatcg	gaaatgacacaaacgggtaagagag
AT2G21370	tatgtccctcacagtacagcttttt	cggttaagtgtatagctgagatata
AT1G69620	ttggtttgtttgtgcttattgacgg	agttgtttcagccattttccttcag
AT2G43430	tataagatagccaaacaaagactac	ggctaaatctggtaccaaccacaaa
AT3G14660	tccgtagtcccagtttagctttatg	ggttetgaaceaatttgtgteetet
AT3G48110	gaaaggaaatgaagcagttctcagg	tagtggtccatatttaaagcatcca
AT5G04490	caaaatgtctccttcttgacgacga	gaactgagatgagtttgctactaaa
AT5G58870	tgtactctgtgtatacctcacagct	gtgcacatggccttaacttaaacaa
AT4G17150	gtatacctgttctctttcttgctag	ccgttgcttggtctatcccttttga
AT4G01690	gaccgtcacctccagtgtgtattct	tctgctcatgttcttagagtttggc
AT4G25170	cacttgaaaatgtgtgattctttgg	tgtgttctgtttacgtgttggagta
AT3G53920	attgatagttcggattattgatgac	cagaaacaataaaggaaaacaagtg
AT1G29750	aatcctgctgcattgtttaaaacca	gaacaacagattccaccgtaataag
AT1G13650	taacatatatcctaacatgaagatc	tgaaaaacagtttattgccgtttga
AT1G68190	cttataaccggtgtaagatctcggg	tatagetgatgtacegatgattttg
AT1G17580	gactggtgaagctatttaagcgaac	catttcctcatctcgcatttttata
AT2G35040	gattcaattaaagcccgattatttg	aacgtaactgaaaatcgatcactga
AT2G19950	tactgaattaaaacccgtggccaga	gacaacttcccaatatgactttgat

AT2G47410	taacttttgcatgcaattcatctga	taccctaggtctttgattaagtaga
AT5G57960	tacttgaacagcaaatactaatttc	taagcacttttctccgtttccgagc
AT3G23700	gaatattagttacacactggaacca	caaagagctgactaggactgcatag
AT1G31970	tttcctttgtcgtaagcagcagaac	caacgggaatcatattttcgagtta
AT3G54840	gctttgtttcttcactgattcctgc	taccactaacttttggattcacttg
AT2G28360	gactctgattcaagtacaaaggttg	ttttttcttattcggtagcctctca
AT1G09440	gcaagactgcacatgaaaacaaaac	cagcagaacatatgtgaaacaccaa
AT3G19670	cacagtcttactggatttaaaagga	aagtattggaatcagaattttctgg
AT4G37300	caaactcatgttcggttatctctaa	tcttcacataaaccaacatctttcg
AT3G59300	tatagccgggaaacaacacaaacca	gagtatgcgtgaacacggtattcat
AT5G54440	cctgtcaatctagggttggtgcaca	tatcgatcacagtgtccttttctcc
AT3G19670	tcccactaccttgctagagagcaga	tgtcagtacaatgtagcagcagaag
AT4G24750	tgtcactagatcctgctatcacata	gttatcgatgttgtagaatcttgca
AT1G11060	cacattttgacttccgctcgttcta	tctgattactggttggactgatggc
AT1G02205	tatcgtcactgagcccatcacttgt	cctaactagtagcttttatctgtat
AT2G43360	tgtctatgaacctgagcctgaaacc	tagagtagctagaacaacaaagaga
AT1G68820	gccatatgggaaacacttcctgtaa	taacttgtctctgcaggttgtctct
AT3G01590	ccacaggtttggcatctcagatcat	tgaataaccetttgetetagttteg
AT5G25270	aggtaacacaaaggtaaggtgagca	cacactggtaatggtgaaagaaagt
AT2G35630	tgcaatgacggtgactcatctaaaa	ccgtcttatcagtttccaacagtga
AT1G07110	taatacaattttgacgggaatggtg	taaaagacctgcagaaactatgacc
AT4G02700	aattggtctcatcctctccgtacgt	tttcattacttactcttctgtgcca
AT1G59750	aaatggtccaaaacacatcagttgc	cattttgctgcaaatccaggctgac
AT3G04610	gccatgactagagcgctgacataaa	gcgaggaaccctagaattgacaatg
AT5G08600	atttcgcagtcccaagataaaaagg	ctttgctcgctttgtgtatttactc
AT3G33530	cggctcgttgaggttactgtgtatg	acttctgcgatctttaatttccaac
AT5G22080	tcttaagctcttctgcatttcacag	gaaggttgtcgtcacgactcacgag
AT1G06550	tgtagaatctgtcctcattcaagct	gcggatatatttacatcctgaatca
AT4G24750	ttccttcccttaactatgcaaacaa	catgaaccataatcactccaatgtt
AT2G17320	cagcetteaagaaateeegeatate	gacccatgagcagtatctaaatgag
AT2G48020	caacacccttgcaacataaatatca	caattgcatgattttgttggaacag
AT1G08190	gttgaaccttttatttgtcttcgca	cataagcctggaaaatcttgttcga
AT4G21960	ctacctacaccaaccccacacagtt	aaaacagcatgcagttttgtcacca
AT2G46915	tacagggaaaagctcactggcagaa	gacactcatgatgtagatgtactat
AT1G28090	gtctcccgctcttttccgctttgaa	cagttccatcttctatatttccttc
AT2G26280	tgacccactgggttcctgtttcatt	tgtttcggataaaagatcatgttac
AT5G25610	gtaataatacaagtcaaacacatct	aaaaacagttaattatggagagag
AT5G10940	taagatgtagcagacagtgagcttg	tagagtatcttaatatcaatcaggc
AT3G50240	gatgagcttcttgaacttccctgca	ttggatcttagtgtggaaatatgga
AT2G35390	caaacaaatgtattctgaagaaaga	tcaatctaggaacctcaaatccgga
AT1G05270	tcaacgaagacaacctgtgatatca	caaacctcagtcctcaatgaacaca
AT4G36210	gagtagatgagttcactttttgcac	taaggagcgtttacaatgtcactgg
AT5G65010	gtcgctgtcactgtactttctcttg	aagtgttggcctttgttccttgctg
AT1G68890	tcccccttttatgcgtgaagaagta	catttactcatgtgttttgtttaca
AT3G44670	actggtttgtcctcttgatttctac	gaccattttgtcataacggttgtat
AT4G20150	cacatgeteccacggatetaacata	tagcatttttcgattggtggacgac
AT3G16030	tctgaatctcatagtccatgtaatg	tgttaatattetcagettgeettet
AT2G33040	ggtttttccatcaagtaacgctaga	tcaatattcaataccgatgcaagcc
AT4G34140	ccattttccttctaaccgagccttg	aacctggtgtgctctgttatatggg
AT5G08650	gatatggatcataataactgcagca	catactgttttctctagaaaaggca
AT2G39250	ggtcgtacgctctgatatgtatttg	taagtcaactaatatttctctaaag
AT2G27860	aaaaccaacgcattacacaatcatc	catcaccgatctcaatacattgcga

AT4G18270	gccagaatacacatccatcatcagg	tgtgttgcgattgtgagttaagaaa
AT4G20970	tetteeteateattettetaeggtt	tccatgtatgggtgatgatcttaat
AT1G65470	tctcgtctacaacatcaaataaaca	cattaaatgacatcaccaaagagta
AT5G44650	aagtcgcggtttgttcccatatcac	gattgatatttctcctgccttttgt
AT1G22730	tattatttgtttctttgcgatttta	cagatttggttattgaatccgttga
AT3G02860	acageteaageceaateeceagaae	ggaattgtagaaacccagaagtgac
AT3G18520	aaacaaatctgtaagctgcccaaat	ttttgtgagttgaccttgtttgaac
AT2G17787	gagtcagccccttgatggtaggcat	ggtctgtttgcttatggtgtcattc
AT5G20280	catgtagaatttggaggtctgagta	tctcattaaggtgatatagattgct
AT1G15030	gacatgcgtatgtactttgttccac	gcattgtctctcttagaatccatta
AT3G14720	tttggacggtatgcacccttgtcta	tgtcagaattggtcgctcaatattc
AT1G50140	gaattcaaaggtacacagtttacca	atacaaactagcaattttcaaaaag
AT5G13700	tacctctgaaattagtagtataaag	caatcaatctgcgacattattatca
AT1G50120	aattggctgtttcatctcttctcac	cattgcctgcatctgacaactgttt
AT3G51830	taaaaatctgtatgcacatcgacgc	cctcgatcgtacacatcaaattaat
AT4G39850	catgtttaatcttctatacttcaag	cacagtacaattctttcggtctggt
AT3G47930	gcatatgtttctctcccttgtgtga	ttcgtctttatcttgtgctttgagg
AT3G18580	caaaaacacaactcggcctgtaagg	aatggagttttaggggttgagccat
AT1G10360	cagagataaaccacttccattcata	cccggtatactttattacatgcaat
AT2G05590	gaggaaatatcaggcaggctagcta	tctctttaggtgtttttgatgatag
AT3G22760	tgtctgttcgacttttcttcattga	caaagtgttttttgtgcaatgcag
AT1G60990	tcccttcacaaacgagcagatagat	taccaatcacagaggcaacaatata
AT5G17510	cacaggttgtaagaatacacgcaat	tatactaattgctgcggctttgatg
AT1G12730	cagttactcgtaagcagttgttgga	tgtagtacgctcatccctgtcgttc
AT4G16770	catctccttggaatcacctgtttgt	caatttcatgagctattatactatc
AT4G32330	gaaagcgctgatgggtattgagtcc	tgtcatctagaccttggtgctaagt
AT2G18770	gcattcgcattcgttttatgatcgg	tattgtctgatcttaatagtggtaa
AT3G45740	tatgttcacattttttcctcatttg	tgcatgattgagtttgaatacatac
AT2G32700	aatctgggatgcttctgatgtatac	gactaactactaccaatttgtgcag
AT4G10340	cggattggtacattactctctagtc	gctattactcatgggaaaatgacta
AT3G60150	tcatctctctcagtcatgttcctaa	gaatcaattaatggtgctttttgca
AT2G21380	tgcaaaactgccttagaagaacaac	gataacatctctagtcacctaacct
AT3G16170	gaagcagaaggaaagtttctaggta	taatttttgccaccttacctcaagc
AT4G29010	gaaataactgagaattcacacaacc	gtgcatgatctaatcaatcacagag
AT5G07660	agtttctgtgccttgtgattgttcc	catgcgtttatctcttattgataca
AT5G39790	tgaacagctttagtgggagaaaaaa	tcattccagggatttgatgagcgcc
AT1G25420	tctggtgtcaatcgtactgttagta	tatcttgagagatgcattttggaag
AT1G14270	actgcctgggaacaaaattaatctc	ccataacagagagattatctttcag
AT5G48220	tatagttcaagataacattgcccac	ggttcacctgatcttagctcccatg
AT1G61210	ttgtctctgctattattctttttaa	cgtgtctttttttcctgcttgtgag
AT1G19690	catcacagttaagacagtgttatca	taagctctaatgataaaagctggag
AT1G02120	aatgtetegttetttgtettateag	cattgactggatgcagaagtttcat
AT4G33620	gaatgcctacaagccaaaagcaagg	cataacctagttcgaagcagcttgt
AT4G39745	tctctgtgatcgtcatcggattcat	gcgatcgcactaatcgttggtttta
AT3G48360	tcatcctccgtcaaactaaaacaga	attgtgtagtaccggaaataaccat
AT5G62000	tcggaggcaatttgaggtgaaattg	taatgtcaaggagctaaactagtgg
AT4G18240	gcttttgttgtacggcttgatctta	cgtaattcattttgtttaggataca
AT2G24350	gctccttcaggtactattttgcttc	gatcttctgaatatatgacgagtga
AT1G60200	ggataccggagaagccctgcataaa	tagttccccttcactactttaagca
AT2G45990	gctgcagtaactcacgttctatata	ccattagtttacaatccctatgcat
AT4G27830	aattgactttgctagatcagaatct	ggctttagtagcgatgtaaaccaaa
AT2G34890	catcatagttcaaatacggatctag	aatggctttaggttgagtgccccac

AT4G32660	ctgtagcatgtctgtgaattgttcc	tatgtcccggttcagcagctgtagt
AT3G14910	gtttcatgggtctttaatccctaca	ccatctgtggtgcttaactttgtta
AT3G16840	taagagcgtgctaagttcctgcgga	catcaacatataattcgtaatacga
AT2G44350	gtctcgcgtcgtaagtatttgaaaa	taatcgattgattggtgatcgaatc
AT1G64150	gcaaatcggttccaccaaacctgtg	cattgacgttcagcatcatcatgga
AT4G39680	tgaacacatctatcaaacaaagctt	taagagatggaaacatacatagagg
AT2G47960	tctgcttcttcctcagtccttcggg	tctctctttcgtttctcctgcagat
AT1G53210	tccatgtggttagaaagactgttga	gacttgggtcacaaaacttatctgg
AT3G17510	aatccgtcatcctaaaatgccaaag	gctgtgatatgctatggttttaaga
AT5G12130	ttttcgcagggtgtgtagagcttac	gattttcacttaactcttcaaggag
AT1G10760	tgagggaagtgccaacacagtttaa	taacaggtgtattaaattcttgaga
AT1G49580	caagcettgagteagteatttttaa	tagttttatgtctcctgtcttttgg
AT5G37130	actagtctgctctgttggtgctgaa	actatggatggtgctgaatgtttaa
AT4G34960	gatattgatggccaacgcttaggta	tgttgatttcgctttctgtgattga
AT3G19800	tctgtcgacctctctgtccaaaggg	gaagetgtettetettaeetaat
AT5G18100	tgttatcaattttagttctgctgag	taaaggaaccatttggatagctgat
AT5G35170	gttatggtcaaggtactaggcaatt	tgtggtttggtatcatctcattcga
AT2G42220	caggtaatactagttccctcaactg	gactcctttgtataattcgccaagt
AT5G10520	tcactgttcttgttatctgttaatg	aagtcagttctataacatgtctgcg
AT1G80760	aactctcccacctgtaatcttgtga	gacgtccaaaatttcaagactcttc
AT3G45240	taacgaaacctacaagaaacattga	caaaatccaaactcaagagtaccaa
AT3G18390	cattgcaatgcaacgccacgaggtt	gatgatcacagggttcttttatgac
AT3G09800	gacttgagatgtacctgaaacagtg	tcaagactcaaataggcagcaatgg
AT3G01150	cccaatttctagctcccgggatttg	gactcttcaagctttcgttttggcg
AT3G21070	cggcgattactacacgatcagaaat	gagagtgagtataacagaatcggca
AT1G53590	cagcggtatccgtgtctaagaaata	gctggtattgacatctattacgatt
AT1G04200	ggtaagcaacctctacacatatcca	getettatetttetteeaettttet
AT5G61120	tccaccagaggcaatgaaaaacaag	tgatttagaaaaagaaggaattagc
AT1G03380	tgtttctgcccctaaaatattcttg	tctagggtcgttttaattcaagcca
AT4G24280	tatgaggtacagttaatttttccag	gacttagtactttcacaagcatctg
AT1G71691	aatacttatatcagcctcgttccag	ggaaaacttattataatgcatagag
AT5G52100	cacagggtgagatgagatactcgca	aaatctaatttcgtctctgcttgcg
AT1G21170	tttatcaatagatctttctttgcca	tgaaccctgccgtttgttccttgca
AT4G17150	gacctcattctcaagtgctatgcgg	taattgcggtttttatgttcaagca
AT3G53970	tgggaccaccacacccgtaaaatca	cacacacatagagatacacagccat
AT4G21660	gcaaaaatgaaaccccgctgagatg	atatacaatagatatctacacaacg
AT1G22490	tacggtggattttcttgttaatata	taagaatgaccctgaccaaatgata
AT3G21465	gatcagtttgttgctcatttttcag	gctctgatttccatggcttattaat
AT5G65960	gagtgaggtttgacattgatgatga	gatacacgcttcattcttctcacct
AT5G59650	cactaggttcgtaagcttattagcc	taaaatgactttccttctggtggac
AT1G31660	catcatctcagaaacttgagaacca	tcgcagaaggaatggatagaacaaa
AT4G34830	tttgcataggcctttacaaaacagc	tctgagcctcaaagaatgaggaaag
AT1G26940	tcttgatcgccaggtcagattgcta	gactattggctttatcttaagatga
AT3G46210	gaactgcttctagctcaacagtagg	ggacacacgaatcaacacagagcta
AT1G70100	caggtataacagagacatgcatcac	tattactcatcgtgtcttgtttgaa
AT4G31130	ccagatgttatcctacacgacaata	aatggtctagctactgtgttcttga
AT4G10770	taacacctaaacatcattcacactt	gaaaccataaactcgatcaaaatca
AT1G76630	tattcaggtttggtttcaattggcc	gctgcaatctgtctttattgtcttg
AT4G33210	actgacctgcactcactgcaattga	aacagagtttacgaatcatgcatga
AT1G53165	tcctcaggtttcatattctaaatat	gcgaagccacctttcagagctagat
AT4G03415	agetteccetateagacceacaaaa	ttagataaatgcatacaagccagga
AT1C27520	geettggtaatatactageetgaaa	cgcaatctctgttatgacacttaag

AT4G28080	caagctgtaaaaggatttccagaaa	tgagcaaccattaagaccaacgcat
AT3G48860	ttgaactggttgtcttgagtagtcc	tgttgcgtcttgaaattctgactga
AT3G61080	tgatcctgcctgttactgtataagc	gttttgatctcattcctcctccaca
AT3G25660	gagactggaactcaggcacatcctg	cattacaatgcaggaaaccaactac
AT5G40380	ttttatatttggaccattactccta	catgtttaggcttttttacgcatta
AT5G66540	catgcttgcctgatttaacgtttat	tatgcaaacacaaaaacccaggaaa
AT5G64813	ggatggttagtgtcattaccacacc	gtcagatttctaagacacccttccc
AT4G14220	tccaggatccttccactgtcagatt	tccgatatctaaagctttccgatgg
AT2G42750	ctatgccgttctcggactcgtaaga	tgtgactttaataactctcctttgc
AT1G80050	tactcctgcatacatcaatctatgt	ggcaaagactaattaaatagcgact
AT5G15020	gatgaaagaaagtaacgtaaggaca	tataagtatcaacacatgcagacct
AT4G18640	gactaaactatgagaagatgagacc	taactatgttctgataaatgttttg
AT5G13740	gaaggtggcttctttgttaccgcta	gcatcttctcctatcttattatcaa
AT3G12550	aaggttggctctttaactttatgtg	taccgtgtttttaaccttagatgca
AT5G43130	ttaacccggctttagccactgccag	tatgtaagettegteteeaagtgat
AT5G14030	gctcccttcattctagttcttggaa	gaattactttctgttgttgtggccg
AT5G51540	tcctgtatgctggttcaaatttcat	cattttcttacactccgcctgttga
AT4G10050	catcgtacctgcagggcaactaaca	tcttaatattcaaccgtctcaggaa
AT2G28305	ccagtaatcattttgcttccatttc	tttcacatacgtcctaaccaaagta
AT1G72175	taactctgttcaatgagatcggaaa	cactggtctaattacgaagtttgcg
AT4G31990	tctggagcttcctgtacattttaca	caactaaaacatagccttctaggac
AT4G36210	tcgtatagttatttcttccagaaca	gattttgtgtctcctttcattctta
AT4G20020	tttgcttagcctcttccacgctgac	gacaatttagccaaaagcaacgaat
AT5G40870	ctgtaggatttgtaagcataggttc	cctaatttgttttctgaggatgtta
AT3G04420	ccctctgtttttgctctttaccgtg	cgattctgaggtttgtcgatctcaa
AT2G32700	caaagcgtattctaacaccccaagg	gatacaagtagacgatataaatata
AT1G70180	ccgattcttcacgtattttaatact	ccccggaatcttatggtatattcta
AT3G03330	cctagaagaagaatacagagtcagt	cgtgtcaacaaaaagctcacaattg
AT1G53510	caatggcgctgcaagtgaaaaagta	taaaaagccaggcagaggtacgcga
AT1G59750	cctggtattctgtgttcttttctct	tgttcttctttgtggcggctcttgc
AT5G40810	caatcagtcgtgagctttttccctg	tttgttgagcatacaccttcttgtg
AT5G05030	tcctgtctctttgtcctttaataaa	aatatatactgtgttaggttttcta
AT1G79270	cacacgtgtttaatctgtgttgttc	aatctgatctcttcgggaacgtttg
AT4G17610	agcaccaaaaacctttggaacaacag	tagttactatgggaaagccacaagc
AT3G31310	tcaactttcattactctggagccaa	cgatgaataggatggtgcaatccca
AT1G76850	cactctcttgagacagatcctatcc	tacataacaaggctcttgacaatat
AT4G14720	caagatgaatgatcaaaaccatacc	ttttcaggctggacagaattatgtg
AT3G53040	acttcccttccttcttcacctctg	cattgggttaaatcgctttcaggac
AT2G02090	cactatcttcaggtttgagctttaa	catatatctgtattaactctggcaa
AT3G56510	tccacccacctgcagttaatgaaca	caagggaaaagccaataactagcgg
AT1G21880	ccatgtaagtagaaatacattcact	tcttatcaacatacccctactaatg
AT4G21470	gggacttcctccattccaagactgt	aacatgttcatctcggtaatgagac
AT2G44450	tgcaacatctgcttaccaggtactt	aaaaaggtccgatcactggttagag
AT1G10600	tgtatatetetettetageteee	gatctgtttatctactttgtcttga
AT5G53550	caagtattaactcgattttttggca	agctctctttcaccactaattctag
AT2G42380	tggtgcatcgtaatcaaatctgatg	tacgtgcatgcatgttcttgaataa
AT2G20470	tctgctctaacatgcttcgcctgtt	aaatcacgctccatttgcaaagaag
AT5G17930	cgtttctccttttccgacttctgag	caaaaaccaacattacccatcaaca
AT3G10060	gcagtacggttgtgaatacgtttcc	ggacatgtaaatgctaacagtttta
AT3G14930	tcatcgccaaccaggtccgataaag	gttctttcgattactgttatgccaa
AT2G16950	tgcagcagctggctaaggttccatt	catgcttttgttttccgtttgatca
AT3G11880	caggttcatgtgatcttttgttccc	cgaaatttgtgtgcttttgtcatct

AT1G16880	tacttgacactgtaaggaaggatac	actttagattgagttttgagctgac
AT2G45540	cctgcgcacatgaaataaatgataa	actgggaatggcagtaattgtggca
AT1G28260	gactgcaatggagatgacctgttct	cattgcagataacagagaagtatca
AT3G63520	gatttcttcccgtgaaattctctca	ctaagggttatttagtattcttatg
AT5G15940	tgccgctttatccacacccgtaata	gatctgattttcttacttacacata
AT3G54020	tggttgatccctttactcttttgaa	ttaagctcttcttgctttgtttggg
AT1G63770	gttctttccaaggtttgtgtacaca	catttctattgtcagaatcaatcaa
AT3G07180	ccggatggaatatatctgacaagat	cataataagcaaggatgggcagagt
AT3G45100	aatgtgagttacaaaaccccagctc	gaatcattctgccatttctcattag
AT1G42440	catcgtcctgaacaatgagcaagtt	caatgaagctacaagtactgttttg
AT4G03110	gacctgacaaggatctaagcatcct	gaagaacaaatagtcagagaaatga
AT1G77800	cttggatctcttgtaagcgccagaa	gacagtttctgttgttctctcggct
AT2G33860	gatctgacaaaacaggtgaaacatg	tgggcatataaaacacaggtgtgca
AT5G66190	gaacatcacaaacactaagaacagt	taaacgatccatcacagacacattg
AT2G27210	gataccagcatgctgcagtatgaga	tacttcttttagctagttccatcag
AT3G49720	aaactgctgataaattgatcgatgc	taacttaagcacatgtactgaacaa
AT5G13960	ttcctttttttgtctctaggctcta	aataaatttcgtttttgctgtgttg
AT2G34410	aactettgaacetacageetteteg	tcttctcatgaaccctacgattaaa
AT5G40240	gcgacatgaacctgttccactcaag	cagaaatgcccataaatctagaagc
AT1G09620	aaacgcaaacctctaatttagatat	taagtgcaacacaaaaatcggtaga
AT4G27400	tccacttggtaatcatagaaactca	catttttgtaggttgcgattgtttc
AT2G44280	tacacaagactacaaattttgtgtg	caattgcagcatcccttgagaacaa
AT2G39970	gtctgttggcgcgtatttacctaat	gattatccagaagaattaggtgacg
AT2G11000	tagtacaaagcaaggacaccacacc	tacacacttatagcaacctcacaat
AT4G35360	tgatgtcacaaagcccaaattcatg	cataaaatgcaaaacagaatcacga
AT3G01610	gaactatatgacgaaaataagaccg	gatcaaatgcatttcgatgttccag
AT3G17770	aaggagattctattattcttctggc	caactgtgaagtagcaataacgagc
AT3G21180	agttcattatggttctgcttgtgca	ggtcatcttccctttctatttgcta
AT5G51140	tctgacacatcaaagtcatgcagct	aagttggaaattagagacagttaca
AT1G47870	ctaggettaaggtteattgtgacaa	tccccattactgaccggttacatat
AT4G33380	tccaataacgataatggttcctact	gaagcagctctgttggttttttgtt
AT2G29390	tcgccacaaagaagggtcagtgtca	gctagtccaagctccaacaacaata
AT3G25585	aataactttettettgetegateaa	ttgtcctcactaactttctctcttg
AT4G04970	tagaggtctaaaagcttctcctttg	tacggtaatatgtgttttgagttgg
AT5G50950	gatacttgctctgacctaaatggtg	tcttgacctcagttcaatgtggtac
AT3G19870	ggtatgaccatgacacccacgtaaa	ttatgaattgtgatgacgttaactc
AT4G27340	aatccgtatccgctgcaagtccaaa	gatgtggtttttcatccttttagac
AT4G04955	gataggaagaacaaactgcaattgg	tttttgtgctctcacagtttctaca
AT1G10090	tggctatgttcttatactcctacag	cagtaagcgtgaaatgaaccaaggt
AT3G48870	gaaaccgatcactgctcattcaaga	caatgttctgtgttggtgaaagact
AT1G76050	cagtettetgeaagtgeaceaacea	tgttaactgatactgatatatgcta
AT5G43080	ccctacaagcaacacgtttctaagg	agtttattgtctcattgcgttttgc
AT4G11820	gtttccacatttctgttcattccca	aacatgagcggtccacgtatttaca
AT5G17920	ttcttaggaaattactgtttgctcg	tttttttctacgaagttctgatctg
AT3G18810	catatgggtcttgcctgtgtaaaaa	gaggaaccattaatgtgatgaatat
AT2G31870	tcgaacggacaggtaagaaaagcaa	tactcaagagtcaggaatagaacca
AT5G08450	tacacaacctagagcaaaacacaga	caccagactaaacattgaatcccta
AT5G25880	tacttctttgaatctcatttctatc	gtttcttatgctcatctttgtgtgg
AT5G62090	cacactgccattcatcctgcaaatg	ccgtaagatcagcataaagagtatg
AT5G56610	ggtgtgcttgctttttaccttcatt	ctttctgttacttattatgcagtcc
AT3G08930	gcctcttgaatgtagcattagcatt	aacatattcctgtctctggctatca
AT4G20320	taaggactccaaatcagcaagactg	cgcatctctttgacattttaagcta

AT5G40480	cctccgtttatagggtattgatgct	gctcgttcttgacttgactcttatt
AT4G04920	tattcctgtgtcctctttattttga	gaggettaggettaatetggteaat
AT4G39800	caaacccccaagaaaatcagtcatg	tgattgatcaatgagtgattaaaac
AT3G46220	gctgatacacttcttcatggcttgg	aatcatgcttcgattttcaatacag
AT4G38930	gcaatgtttacaaccccaattctaa	gagccacttacatccatcactgttt
AT5G03830	ccgatttcgtgaagttactctgcta	ttttaattcgttgtttgatctttga
AT5G57160	cactcattcccagtttcaaatctgt	gatggaaactttatgtgaagaaact
AT5G44070	aatcttttcttatctttcgcttagg	ctgtatcatggatgtaatatttcta
AT2G01990	gaaaccacatgtatctgcaaacata	tcaatattttacgattgaaaaaaca
AT5G13300	gettecagacecetaaacateaaat	ctttatgaacaccataccgtttgca
AT4G16990	tgctacgttgggatatacccctatg	cacatgcaatgcataactctcttgc
AT1G50030	ccaaacatcatttctcagcaagcag	ccgccactggtattgcaattataaa
AT4G00180	taaatgaaatcagcaaactaattgg	gaaaagccctaattattactctctg
AT4G28080	gcagcaaaaagaagtcagtctcact	aaatgtttacatttttttagccatg
AT4G21323	tctcgaatgatccaaagcttgtgat	taaagttgcctttccatgacctgtt
AT2G35510	ttgatacccttcctggctcctgctt	caatgactgcttgaaaatgagaatc
AT5G35910	gcttgaagcctaacaaaatgccaga	taaaataagtatgtagaccctctca
AT5G16190	tcacgaggtagaaagatctacatgc	ctggctagttactactatgatgtga
AT4G38170	catccaggggtaagcgaatactggt	acattgatgtcctctgttccttggg
AT1G15460	gagcctggtttttaaaagcaagagc	tcttgatttttctttcaccggaaca
AT1G52710	ccttccctatacaaggagaacacaa	aactaagtttctgatctccgaaagc
AT5G02130	gcaaacacaaacagggactagtgat	tcacactaggacctgtatgcacaag
AT4G08980	tctccagtggtagcttctgagttag	ggttttgtggagttttagctctcag
AT1G48840	tctatttccctgtaaggaatgatgt	tgtattcacttcttttcttactggt
AT5G47770	ctcttcttccctagtcatatttggg	gatcccgtgacaagctgtgtttttc
AT5G23510	tatctttttatatgaatgagatcat	gattggttcccttaaatatgtagca
AT2G44220	gacggtatgttctccttttcagcag	gcgtacttatctcttctactataca
AT2G24420	tgttctctcgtcttgcactctaaga	tgttgcttcctttatcagcttaaaa
AT1G08910	caagcaataggctgttttggaggtt	gatatctttagttcctctcctcata
AT1G20090	gcaatacttttcctactgtaaatct	ttgatcttgaagctactgtgttttg
AT4G25990	cctaaatcgtagctcaaataaaatg	accttcattctacccttgttgacag
AT5G05930	taactgatgtacatgagggacctaa	ccataaatgtggcaaaagaggacga
AT1G06900	aaaaagcatgtgttcttcaccaaac	gcattcaaaatgtagttcaaactca
AT5G58140	tctactcatgagatttatcatgcct	gatatggatatgtgcaaagtggttg
AT3G07660	gttgttgatgttctgtaccatttca	tttacacagaaacccatgaagagac
AT5G17550	tccaaggcacctgagaaagacccag	tatagaaaacgaacccacaagaaca
AT1G52810	tgcggttgatggaaataccaaggag	ggagttaggcatggaggctcataca
AT5G01510	tgcagtcctacaatttaacacggta	gatattcttacaatcccaacttgag
AT1G55250	gttggtgtgccaattatcgattcat	taacggctattgaaaattcacattc
AT5G63880	tatgttttgtatccggcatcgtctc	tatggctttctcaaactttcatgtg
AT4G01540	cacaagttctttgccagccaaacaa	gaacacacatcaatcaaacaactca
AT5G37630	tattcgagttgttatgctttggaga	gtttctttctaatggctaattacag
AT2G18465	tctgtgccatcctagtataccaaac	tacatacagcagaaaagagccaagg
AT2G28090	tcctattgacaaaatcacatactca	gacacagattaaaatggccgcaaac
AT5G02130	gcaatgttacctattatcatgtagt	aataatcaggtttcttcaaggctag
AT5G35570	gaaaacaactgtatgcaaatactag	gggccccaatatggctatattaacc
AT3G27925	caccaacctgaacatgagagaaaca	caactttagtctcccgttagtggat
AT3G48820	tttgcactctgcatcattagatcag	caaacggatcaagagggtataacac
AT1G68010	gagggatggcttcctcatctgtatg	gaacttgagaactgttgtaatcgcg
AT1G78900	ccatgcttcaggtttgcatgtatct	cttgcaaacgtaaattttaagctat
AT3G48420	ggttctactacttcagtttcctgag	ggaaatacttttctcatttcttgcc
AT1G51340	tagctggccaggtttttagataatg	ttgcatccttttacgattaagcgcg

AT5G19150	tccaaactgtcgaaaaaagtcgata	gacgaaatgtttttgtggattctct
AT3G12270	tatettteteactetatattggcca	gcagatcctttgattgtttaagtca
AT3G50430	catctgcctcactcgggattttaga	tccagctctcatactcactcatttg
AT4G19710	atggtaaactttgcgttcctgttat	gaggccaagtacaaacttctgatca
AT1G68370	cattccatcagcatcgagtgcctaa	ggcaacataaggtgtgaaacaactc
AT4G30150	tactgtatgaacacgaagtaagtca	gcgctatatccagacattcatttga
AT1G74670	tagaaagtgtaagttttataattca	aaaaactcgattatcatgattgcag
AT5G42490	aaatgcattgtttagcatagcgagg	tcgacgaacaaaaggatggattaac
AT3G28030	ttacacagaaggaatcaggttagct	ctgcataaggtcaaagttccgctct
AT3G60600	cccttgtaagctttattcataactc	cgcatgtcttattgccccagatcta
AT1G26110	gaaagaatgcccgtttggctgagaa	tccagctaactaagacaccagcaaa
AT2G34860	tctccgtttctatgtaacatctcta	ctgttcctttccgacattgtttata
AT5G50375	tccggcggagcgattatgtcaggta	cattccctgattttttgatttaca
AT1G79750	tttttaacctgtagacaaagcgtgc	tagaaagggtaagtgaaacctgaca
AT2G03070	caaggaatgatgcaggttaaactag	cattgtctttcgaggttcatgtctt
AT4G25100	tccgggaaaaacactaatgcgtaga	gacatttgccgacaatatcaatctt
AT2G35260	gctgtacaggtttggtttcatttaa	gaatctttgattgagttatcactga
AT5G06910	taaaatctctgccttcgtttcttaa	tcaaacttaaccttgttgtgaccac
AT5G23390	ccaacgtaaaccacaattttcatgt	tatgcagagatctctccagaagttc
AT2G43650	cgagattgacgcctgtaaacttcta	taacgattctgatgagatatgtgtg
AT1G33270	caataagttcattaagctccatgga	gagagaatgggaacagaacaacaca
AT5G09420	caagcatgtctggatgttgtcaggt	gttgccttttccttactcttcagtc
AT3G09100	tcatagaaaggcctctgctccattt	gagggtaatggcagctacagtattt
AT4G30310	tatgttggataagggagatcatggc	tagagattaactttgacattgataa
AT4G16444	taacgtaattcaccaatctgctcga	catatagaatgagatcgtcgtgagt
AT1G47870	gaaagttgtgagtctcttcgtttac	cgttttggtgattgtaatgctattg
AT1G34210	gcttcgctttctgtaagaacactta	gtggtctgagtttttgttgcaagga
AT5G56850	tatetetacetecaaaaaaceeteaa	gactgtgccacattgaatccaagaa
AT1G03270	tgatttgttaccctagtttttctga	aaattactgtctttgtgcacctcag
AT3G12210	caactaggatgattcttgaaacatg	ggactcttgaatcagatatggattg
AT1G02080	cttgatggagggagaaacagtatgc	tgttttggctagtgaacttgtttta
AT3G51850	ttgaagcggtgcacatatctttccc	cacgttcactatccaggttcactaa
AT1G65050	catcacaagttaagaacgtctattg	agetectaatttateccatgegaaa
AT3G09100	caatacacaataacttggatcacgg	caaagcaaggagaaagaaattccag
AT3G19420	cgatetetgaggtttteccetteaa	ccttttttcctgatctgaattcgag
AT1G31800	ggcaattgaaaattcactactggtt	ttacctttttactttgatgttgtgc
AT3G08850	tgagettgetaatagetggteaagg	tcaattcaggcgactagtataggta
AT4G04320	gaagatagtttcgaatcagttggta	cggttgtatctgacactgatggttg
AT1G51070	tgactttcttgttcttgctatgcaa	aaagttttccttcttactgctgcag
AT1G74910	gccgaaatcgagtgcctgtgcatca	caatcgagatttcacagtcatttgc
AT1G26370	gaacattcgcaagtccattccacaa	ggcaggaacaatatttagatcacca
AT2G41700	tatattgtgcaacctaaatggccaa	ctgccagtacatgcatccagagata
AT3G16320	cctttgtggccacgagtacaattct	taacataccggtctcaccttggctg
AT5G40155	catcatttctggttagtcctcgtcg	aatccgaatctgttttagattggcc
AT2G18450	tgatttatcccctgcctttttccaa	gatcgatgattcaaacaatgtctcg
AT5G59840	cgaatccagtttctaatgtctgcaa	gagaaaagatccagaacaaagcaga
AT1G18030	gagttggtctgtcttacttggttca	tacaactgttttcatgtcattcact
AT5G63170	tcggctgcattcatttttcacccca	cgtgaaaatgattataactcttaaa
AT1G74700	tctcgtcatggaggtgaatatctgc	gaagatttcatatatccttaaactg
AT5G25270	tctggaatcgcctgcagtagtaaaa	taatcatggaaacaagggagctcgt
AT2G39340	tcatcccatccaccttctcaacagg	tcatgggggtcctttttattgaata
AT5G04370	ttttttcggtttgttgaatccatga	tggtgcgattttggatacaacgagt

AT5G58450	caggtgacttggctttgtttcaaca	ccttgtactggtttacccattgttg
AT4G23470	cccatccaaagtgccattcttataa	cccaattttaacctattgtcctgat
AT1G17580	ccatatttaggtttaggagcagaga	ccgttcatgtattttggttgattca
AT4G05631	tcaatccaacagatttgaacccctg	gaattettetcagttgetataccag
AT4G39050	gccgtcatttctgctgtaagtcaca	gaaacctcatgtctcttcttttatc
AT4G20400	tctctccccgcacgtaattaaggtg	gcctacatgaccaaatttccatatg
AT5G58160	gggtgagtttgaaattgtaatgtgt	gaatcttatcttttatcctgctcta
AT5G62890	ctttatctgtcggtggtgtgtgtag	caatgagttcctttggaattctgca
AT1G21650	cccgagcagtctagcatacatcata	ggatgaacaagaaggcacacttagt
AT2G16750	ctacctcttggttcgttggttctct	tcgaacctgttgaccagaaatgggt
AT1G53110	gattccgaggtttgtcttgtcagtc	gtatctgagattcgagcatttgttc
AT1G06700	gagataggaccagatgtgtgagcca	cgaaatccaaaatcattcagataaa
AT1G27770	gcgcgtttcctgagacccacagtag	taacagagaagttagttgcaatccc
AT3G49470	agcttcaggttaagacgattttacg	tttacttcttagtctcacgctcgag
AT1G72380	caageteataaggttteaatttete	gtatcgtttattgacagtacctaga
AT3G11830	accgcactgcaagcactttggtttg	ggttcttttgttgccttactcacta
AT1G05570	aatgatcgatcacttagaagacggc	gctaaacttagcagagaaattcatc
AT4G14030	tctattccagttccttcaaagccaa	gattcgatctggattctaaaacagt
AT3G61450	tcgctcttaatcttggagagttgaa	catcttctttatctttatttggcga
AT3G63140	gccgctaacaatttcctgtcgacag	aggttcggtctgaatcggattcaaa
AT1G57600	tccattgagcatcagaaacatccta	cacagataatgagcttcaaagcaat
AT4G00905	ggcatgaatcatccatagtttttcc	ccttctatagtcaatggtggtagca
AT5G18190	tttgcccaacctataaaccaacaga	taagaacgagaaaaaagccagcaac
AT1G71440	ggacatacctgcgaccatccaaaga	tactgacgctgaaccaaacaacaag
AT3G53570	tgttgaaaccatttaaacccatgcg	gcattttcccctcaaacttgtcaaa
AT1G70410	gcaagcaaacaccagaaactgccat	aaagcttgtcacactcttttgttcg
AT1G26190	cgggtatacctacataaacagtgag	caattggcagctcatatactaaacc
AT1G58320	caatgttccaccctttgtttgtagt	tgcaacggtgacaaaaacaacaaaa
AT4G28780	taggtttacacattaggtttataga	cacgttcttctacttatgtgataca
AT1G73960	catttatetecaacaageteteagt	taaaacctatcaaatcattaacatc
AT2G07050	tagaggtattgtctgtgtgcctaga	tgccttagtcccctttgcttgaggt
AT3G02070	gaagtgtcttatgagttctgaccga	gagaatgttctgtttcatactcata
AT1G72320	tgtatggctgtatatgatcctgtga	agttgggagttactgtgaatgcaca
AT3G24160	gatactgaacttccaggtgccctat	tttaagtcttactttggatattctg
AT3G07950	tgtaagtaacctaccaccttacaca	cgtgttctttgttttctcctggcta
AT5G14720	tgatgttaagtaagaacaagatgcg	gagacattccgtatttaatttcatg
AT4G17330	tttcacttgcctgctaacaacatca	cagttatgtatttggtttacgtcca
AT3G01310	gacacagtataagcaaattaatcaa	tctcagatcctgactaaacagagag
AT1G33360	aaggttctgccttttcacttaacat	tgatcatggtcctgtgcttcatttg
AT1G27150	aaggettgttgtagagtettaetaa	cgtcttgcttagtatgatgataaac
AT2G39320	tatgggagaagtccatatgatcaac	aaatcttcggatgagttttaagctg
AT3G59890	gtgatcaaatcccagacaagaacaa	gaagagagtgaatccagtttagaaa
AT1G58060	caaacatatattcatgatggtggaa	caactcggaaattttagtgcaacag
AT4G23380	tatccatctgcctgtttaaatcaat	tatatctcactaagaccatgccaag
AT3G60920	tcaaaatacatggaagaagcactac	tggcatcccaaaaggcacgcgtaaa
AT1G76730	tcacctacatttacacaacacaatg	caattttgcggccaaatgtttgaag
AT1G18700	taaaatcttttttcaacatcgtcca	agttcttgtctccttcctgattaga
AT1G70740	tctaccatgaaacaccaacaaacaa	gacacaagaagatatgtaaatgagc
AT2G36390	catttgcgcttttgttcagtattac	tgatacctctctccggttctctcaa
AT5G41350	aacccattctcgcagtcatgtaagg	tatgtttttgagatgtgggaaaggc
AT3G48000	gcaacattgcccctacaaaaacatt	caagaactagctaggaaaatgagtc
AT1G19130	taactgcagagattcagaaaaatat	caaaggaagacatagatagatgcaa

AT4G19410	gatattaagcaacactgactttagg	catggttgaagagaattagcaattg
AT2G36900	ttctgcaacaaaactcccaaacttg	catagatcatccaaatttgcttgcg
AT2G29550	tgtgagtgaagtttcaatactaatc	ttgactcataatcgaagaacattgg
AT2G42040	cgtctcttcaatacaaggtacacca	tagttgcaccattcaccgtttgtat
AT2G22870	atcagttttctttggctaaatttgg	tcttgctttcagataaacgttatta
AT1G17830	cctaaatccgcattaaaagttcaag	tcgaggccagaaaccaattgcaaat
AT2G41460	tacggttctgtctgaaatcttttaa	catttagctgatgtttggaatctca
AT1G17760	ccttttgcctgctcacatgattaga	caacaaagccaagagaatgaagttc
AT3G58080	cagcaaacacttggttacaaacacc	tgccattaaagtcatagtcatatat
AT3G48120	tccgccatcgaggtttactgagtca	tcagagcttcagacagtttatatgg
AT1G42430	taacattccctttaccagatatagc	cagttttcgcgctgctagattctta
AT5G38070	tacaacgttgcaggcaagagagggt	aacttgttcctttatgctctatttg
AT5G65440	tatgtactctctagttgtcttccaa	tctggtttttgttctcacagccacc
AT3G26840	taccttctcgttgccctttcgaagc	gatagttaatgcgagttaaagcctt
AT1G11930	caaagtgaagcctttgctatgtaaa	tattgagttactaaattgggtgtaa
AT5G47010	gatgaacaaggtatcacatttcagt	gtgaccatagcttttactctttttg
AT5G58370	cctgtctgagaactacttgcttgta	taataacaaagggtttatgaagtgc
AT5G18630	catatggtagaggtggtaatgcaac	gaggctacgaaggagttaagactga
AT2G47410	agcatcaggtttgtcttctctcccg	catcttgctgttatccttgcttgcc
AT5G23690	ccaattcaggtaaatggaatcaggg	gtctctttgttgcaccttattacta
AT1G18700	tctttcaccaccttgaactgagtgt	gataatgcatgattaggaaactgat
AT5G60990	aatctggattgcaagttctctggag	caaagtaaacactagaagaaactag
AT4G30870	catttgatttcttggatagatgtca	tcggaattacggagaataattggaa
AT1G71720	gaaaacgtaaagcaagagtttcatc	ggctttactgttctgcgttttctca
AT5G19350	aaagcttactgatgtgatgtatgac	tgctgtgttcactgaatgtggttga
AT2G36390	ggctcccgtgtgaaggttacatgtt	cgtacttttgattgtatgtcatgca
AT5G49340	cttcctggtaataacctttcctgca	gaaggtttttctcatagttcacata
AT3G01310	gagaaatgtcctccctgcatatcaa	taatgtgactcttcccaaggactac

<u>Tabla 4</u>

Análisis bioinformático de las secuencias dadoras de splicing (5'SS) en A. thaliana.

En esta tabla, se indican los 50 eventos de *splicing* significativamente más afectados en la mutante *prmt5-5* con respecto a plantas salvajes, identificados mediante *tiling-arrays*. El "Locus" representa el gen afectado, y la "Secuencia Dadora del *Splicing* (5'SS)" representa la secuencia correspondiente al intrón afectado de dicho locus. En ésta, se muestran en mayúscula los nucleótidos localizados en el extremo 3' del exón, y en minúscula, las bases correspondientes al 5' del intrón. A partir de estas secuencias, se realizó el análisis bioinformático y se obtuvo el pictograma, descriptos en la Fig. 26.

Para más detalle, ver Materiales y Métodos, "Análisis global: *tiling-arrays*", y "Análisis bioinformático de las secuencias dadoras de splicing"; y Resultados, "PRMT5 y el *splicing alternativo*".

Locus	Secuencia Dadora del <i>Splicing</i> (5'SS)
AT5G42030	CTCgtatac
AT1G71695	CTAgtaacc
AT4G39900	TTGgtagaa
AT5G58140	CCTgtatag
AT5G02160	CACgtaaac
AT2G17340	CAAgttcat
AT1G03160	GAGgtttat
AT1G78630	CCTgtaacg
AT1G76730	AAAgtttgc
AT4G27520	TCTgtatat
AT2G21370	GCAgtgaga
AT1G69620	GGTgttagt
AT2G43430	AGGgtttaa
AT3G14660	AAAgtttat
AT3G48110	CAGgttttt
AT5G04490	CGCgtaaaa
AT5G58870	CAGgtttgc
AT4G17150	ACAgtatac
AT4G01690	CCAgtgtgt
AT4G25170	GCAgtaatc
AT3G53920	CCTgtttgt

AT1G29750	TTTgtaatc
AT1G13650	GAGgtttgg
AT1G68190	AAGgtttga
AT1G17580	CTGgtgaag
AT2G35040	CTGgtttac
AT2G19950	CTGgtaacg
AT2G47410	GTAgtaatt
AT5G57960	GAGgttact
AT3G23700	TGGgtatat
AT1G31970	GTCgtaagc
AT3G54840	AAGgttttt
AT2G28360	TCTgtaagt
AT1G09440	GGCgtaatt
AT3G19670	GAGgttttg
AT4G37300	CATgttcgg
AT3G59300	GAGgtttat
AT5G54440	AGGgttggt
AT3G19670	ATTgtactg
AT4G24750	GAGgttata
AT1G11060	CAGgttcgc
AT1G02205	CTTgtaact
AT2G43360	GGAgtaatt
AT1G68820	CTTgtaatc
AT3G01590	CAGgtttgg
AT5G25270	CCGgtctat
AT2G35630	ACGgtgact
AT1G07110	CTGgtattt
AT4G02700	TCCgtacgt
AT1G59750	AAGgtctca

<u>Tabla 5</u>

Genes cuya actividad transcripcional está alterada en las mutantes dart5.

Los genes cuyo nivel de expresión se encuentra, al menos 1,5 veces, reprimido (Tabla 5A) o aumentado (Tabla 5B) en la mutante *dart5* comparado con los niveles observados en las moscas salvajes, se listan a continuación. Estos resultados fueron obtenidos a partir de *tiling-arrays*. Para más detalle, ver Materiales y Métodos, "Análisis global: *tiling-arrays*"; y Resultados, "PRMT5 en *Drosophila melanogaster*".

Locus: indica el gen afectado y el código, corresponde a la anotación que se le ha dado en el *FlyBase*, una base de datos virtual sobre *Drosophila* que posee información sobre sus genes y su genoma.

Nivel de Cambio: este parámetro es la relación entre la expresión obtenida para la mutante, y la expresión de las moscas salvajes. El nivel de expresión está dado por el promedio de la intensidad de la señal de las sondas correspondientes a exones de un mismo gen, y con el posterior cálculo de la media de las tres réplicas biológicas realizadas.

Ta	bla	5 A

Locus	Nivel de Cambio (<i>dart5</i> /WT)
CG10794	0,02
CG3972	0,03
CG4740	0,03
CG1367	0,03
CG8175	0,05
CG12763	0,08
CG33926	0,09
CG18372	0,10
CG9681	0,10
CG14745	0,10
CG4757	0,11
CG7900	0,14
CG10816	0,15
CG17322	0,16
CG8511	0,16
CG33109	0,17
CG4269	0,17

CG7629	0,17
CG9701	0,17
CG10146	0,17
CG9080	0,18
CG6687	0,20
CG10810	0,20
CG9150	0,21
CG14027	0,21
CG1373	0,22
CG8942	0,23
CG14567	0,23
CG4267	0,23
CG3397	0,24
CG6633	0,24
CG32368	0,24
CG33706	0,24
CG6483	0,25
CG5381	0,25
CG7910	0,25
CG31839	0,26
CG32475	0,26

CG31414	0,26
CG3835	0,26
CG6188	0,26
CG7635	0,26
CG6781	0,27
CG34456	0,27
CG6730	0,27
CG11086	0,27
CG30050	0,28
CG7021	0,28
CG32191	0,28
CG4437	0,29
CG7923	0,29
CG10833	0,29
CG8112	0,29
CG3401	0,29
CG15678	0,29
CG10245	0,29
CG15505	0,29
CG1148	0,30
CG15825	0,30
CG6891	0,30
CG18473	0,30
CG13794	0,30
CG4099	0,31
CG16904	0,31
CG7695	0,31
CG1851	0,31
CG14275	0,32
CG10912	0,32
CG4409	0,33
CG6839	0,33
CG8588	0,34
CG1151	0,34
CG13947	0,35
CG8757	0,35
CG6361	0,36
CG30046	0,36
CG32573	0,36
CG6467	0,36
CG4408	0,36
CG2065	0,36
CG5849	0,37
CG3239	0,37
CG5527	0,37

CG6385	0,37
CG9954	0,38
CG33346	0,38
CG8303	0,38
CG6898	0,38
CG3505	0,39
CG8358	0,40
CG3987	0,41
CG8846	0,41
CG16989	0,42
CG9081	0,42
CG7285	0,42
CG3036	0,42
CG11822	0,42
CG6912	0,42
CG5955	0.43
CG16743	0.43
CG9441	0,44
CG13071	0.44
CG5819	0.45
CG8913	0.45
CG7567	0.45
CG33119	0,46
CG11395	0.46
CG8654	0,46
CG9621	0.46
CG31198	0.46
CG3700	0.46
CG3984	0.46
CG17192	0.46
CG11654	0.46
CG7447	0.46
CG18550	0.47
CG2397	0.47
CG14642	0,47
CG1246	0.47
CG10242	0.47
CG9969	0.47
CG31028	0.47
CG9733	0.47
CG1844	0.48
CG6654	0.48
CG2346	0.48
CG9451	0.48
CG33120	0.48
0055120	0,+0

CG31628	0,48
CG5154	0,48
CG10512	0,49
CG4927	0,49
CG8345	0,49
CG5760	0,49
CG9248	0,49
CG16844	0,49
CG31324	0,49
CG5279	0,49
CG30026	0,49
CG6295	0,50
CG8399	0,50
CG4615	0,50
CG4753	0,50
CG10799	0,50
CG4486	0,50
CG6701	0,50
CG3074	0,50
CG4670	0,50
CG3376	0,50
CG8843	0,51
CG13822	0,51
CG31077	0,51
CG7470	0,51
CG32395	0,51
CG9505	0,51
CG6822	0,51
CG3730	0,51
CG8468	0,51
CG7458	0,51
CG8196	0,52
CG15117	0,52
CG4795	0,52
CG8462	0,52
CG5195	0,52
CG33110	0,53
CG10341	0,53
CG9027	0,53
CG5397	0,53
CG6953	0,53
CG5002	0,53
CG14777	0,53
CG2812	0,53
CG11567	0,53

CG3821	0,57
CG13397	0,57
CG8095	0,57
CG32412	0,57
CG6518	0,57
CG11734	0,57
CG3365	0,57
CG8839	0,57
CG17795	0,57
CG7291	0,57
CG1673	0,57
CG8351	0,57
CG4288	0,57
CG5326	0,58
CG15211	0,58
CG5474	0,58
CG13283	0,58
CG18273	0,58
CG7780	0,58
CG4402	0,58
CG3246	0,58
CG12001	0,58
CG9127	0,58
CG3368	0,58
CG18106	0,58
CG5165	0,58
CG11127	0,59
CG4475	0,59
CG7068	0,59
CG2794	0,59
CG8193	0,59
CG6821	0,59
CG7816	0,59
CG31233	0,59
CG6437	0,59
CG8370	0,59
CG11271	0,59
CG2930	0,59
CG3252	0,59
CG7717	0,60
CG3829	0,60
CG1271	0,60
CG4114	0,60
CG33115	0,60
CG13077	0,60

CG31343	0,60
CG1925	0,60
CG3759	0,60
CG18616	0,60
CG11073	0,60
CG10687	0,61
CG1869	0,61
CG15695	0,61
CG11120	0,61
CG30344	0,61
CG31547	0,61
CG3413	0,61
CG16928	0,62
CG31956	0,62
CG3999	0,62
CG3173	0,62
CG7438	0,62
CG7074	0,62
CG9128	0,62
CG1966	0,62
CG10079	0,62
CG17657	0,62
CG5346	0,62
CG4199	0,62
CG11814	0,63
CG17111	0,63
CG7169	0,63
CG6747	0,63
CG9485	0,63
CG31036	0,63
CG11471	0,64
CG31150	0,64
CG5080	0,64
CG3356	0,64
CG10082	0,64
CG18402	0,64
CG1886	0,64
CG31183	0,64
CG5191	0,64
CG6356	0,64
CG8439	0,64
CG4078	0,65
CG6863	0,65
CG6186	0,66
CG4931	0,66

CG6975	0,66
CG3001	0,66
CG4792	0,66
CG13492	0,66

<u>Tabla 5B</u>

	Nivel de	
Locus	Cambio	
	(<i>dart5/</i> WT)	
CG4178	41,26	
CG10241	22,93	
CG7592	20,39	
CG10363	13,33	
CG2559	10,90	
CG11853	9,20	
CG16926	7,21	
CG4105	6,51	
CG8539	5,59	
CG14456	5,35	
CG11854	5,30	
CG15818	5,21	
CG9377	4,11	
CG2759	3,95	
CG14715	3,78	
CG14343	3,70	
CG31955	3,68	
CG32444	3,65	
CG2993	3,49	
CG31941	3,40	
CG6357	3,36	
CG31783	3,32	
CG32282	3,26	
CG5999	2,92	
CG10924	2,89	
CG10541	2,86	
CG11697	2,84	
CG31465	2,81	
CG10073	2,76	
CG11909	2,76	
CG8523	2,76	
CG17527	2,74	
CG14379	2,73	
CG9914	2,67	
CG12071	2,67	
CG4268	2,63	
CG8457	2.62	

CG11218	2,58
CG9481	2,57
CG16963	2,51
CG3819	2,51
CG4962	2,44
CG5156	2,43
CG3088	2,40
CG4373	2,39
CG9734	2,38
CG2381	2,31
CG10697	2,24
CG8639	2,23
CG8687	2,17
CG8859	2,14
CG2641	2,13
CG11144	2,12
CG14585	2,07
CG3996	2,04
CG8424	2,03
CG31367	2,02
CG6923	2,01
CG18302	2,01
CG11619	1,99
CG11023	1,99
CG9297	1,99
CG9057	1,98
CG1909	1,96
CG31999	1,92
CG3902	1,90
CG5889	1,87
CG8177	1,83
CG2604	1,83
CG2297	1,82
CG2818	1,80
CG3837	1,77
CG15894	1,75
CG1578	1,73
CG9587	1,73
CG1522	1,72
CG33097	1,71

CG1347

CG32743

CG31009

0,67

0,67

0,67

CG3940	1,70	CG6706	1,60
CG8266	1,69	CG34405	1,59
CG34404	1,68	CG3523	1,57
CG2999	1,67		
CG8779	1,65		

<u>Tabla 6</u>

Genes que presentan diferencias en la retención de intrón entre los genotipos estudiados.

A continuación se listan los genes y los respectivos intrones, cuyo nivel en la señal de hibridación es mayor en las moscas salvajes (Tabla 6A) o mayor en las mutantes *dart5* (Tabla 6B). Estos resultados fueron obtenidos a partir de *tiling-arrays*. Para más detalle, ver Materiales y Métodos, "Análisis global: *tiling-arrays*"; y Resultados, "PRMT5 en *Drosophila melanogaster*".

El Locus representa el gen afectado, según el código asignado en el *FlyBase*, una base de datos virtual sobre *Drosophila*, que posee información sobre sus genes y su genoma. El intrón retenido se indica a partir de la secuencia de dos de las sondas que presentan aumento en la señal de hibridación.

Leana	Intrón A	Alterado
Locus	Sonda 1	Sonda 2
Dmel_CG31660	gattacatatgcaatgatagactga	tgattatttatgacacaacgcaatt
Dmel_CG10833	gtttattcaaaacttatctcgtgct	ggccctgatacccttatcaattgaa
Dmel_CG4795	acgagaaaaacatgagacatggcaa	aactgcctcttaggtaagtcaatcc
Dmel_CG3159	gctttggtgttaggggacaatgttt	ataggtttttggacgtgcagggatc
Dmel_CG8665	taaataagtcgctttaagaataaac	tgttcctttttatttcaatgcgctt
Dmel_CG3835	gcagatgctgatattgttttcgcgc	cctggtgtccctgctatcagtgcga
Dmel_CG5020	taagcggtgacctcgaaaggatcac	ttgagcccttttactaacgcgttcc
Dmel_CG3036	gcaaatgttgcttacaatctgattc	taaaattcgtctaacctctggtata
Dmel_CG3743	tcggaggactgatagccaccggaat	gcgggcccggccctattaatctgta
Dmel_CG18466	aattgaatgagattacactgtacta	ttagccaattttcactagcagcata
Dmel_CG4244	tctttctggcgtgcgttacatgacc	ggtaatctgtaaacctagcaaaagt
Dmel_CG3036	tgtgatatgataggtgcccacccaa	ccaatgccttggattctattattaa
Dmel_CG7635	ggcggaaacggtgtatactatagat	catattcatattcctaacatcccat
Dmel_CG8591	gttttggtggcgacccacagcggat	tgtaatcccgcttgattcaattcac
Dmel_CG1851	gaattggattgaactcggattagta	ttgaagataatgaaacaatcgggca
Dmel_CG4894	catacaactccagctggagaacgaa	tgcatttcccttcgtaccacgacag
Dmel_CG17998	tctcattaatcagcttgaaatcacc	catttggtaattcgaattatgtatc
Dmel_CG3469	cgtgcgggcgcaacatcattggaag	cacccataagttcctcatttaacaa
Dmel_CG31022	aaatgcatgcgagaagtaaggaagt	gatactcactgaccaaatttattat
Dmel_CG4269	cctgtccctgaattcgattgctcga	caattaacgaattcctcaactctcg
Dmel_CG6772	attgatggcattcgcaatgacggtc	caataatctgacttagttttctaaa

Tabla 6A: Retención de intrón en moscas salvajes. Señal de hibridación de WT>dart5.

Dmel_CG31324	aaatctcccggcattagcatcagca	tcaattaatcaacgcggcggctaat
Dmel_CG9395	tactggtttttcctgtggattctcc	tggcggagatgacgatacactgcat
Dmel_CG17800	ggtggagagaatcaaaagtaaagta	tgaaatcaaatacaaaacttaaagc
Dmel_CG14616	tattaccgattatttcatagctaca	ggtgaggtgactatccaatttctgc
Dmel_CG4019	ccaatggtagggaacgaggttaata	ggcaggtaaggattagccaactgtt
Dmel_CG14322	aaagttctctagaaagtaaaatgaa	tatgtaatattaaaaaacggatcca
Dmel_CG16974	gtgttataatcaactatgttcactt	cccaataagctagtcactcaataaa
Dmel_CG34365	cgtttacagttgtttgccgcgcgtc	acatttgttgtaagtccagtgagtg
Dmel_CG31760	ctcttaacccattaagggggccaga	taaggtgtattttttaaatccatat

Tabla 6B: Retención de intrón en moscas dart5. Señal de hibridación de dart5>WT.

Long	Intrón A	Alterado	
Locus	Sonda 1	Sonda 2	
Dmel_CG8266	aagatacttaaaggccggcgggcac	Tttacacgagcagcacgaagggaca	
Dmel_CG1578	catagcgttagtaatcgatttagca	gcccaatgaaagtgatagcatagag	
Dmel_CG33208	tatcattttgaaaacggcaaattgc	gggcacgtaattgcacccgtcactt	
Dmel_CG11255	taccagtcaacattgcgttcaacca	agtettettacaettttetatttgg	
Dmel_CG4268	tattaatctcaattgaatgaaacac	gatgggacggacaccacttaaagca	
Dmel_CG9163	gggtaatgctacaatatcacacagt	tagagtatgacactgttttgtgaac	
Dmel_CG15899	gcggttcgttcgatggttcattgga	taacgaacggaaggtataattgaat	
Dmel_CG1909	tgtttaaatctcaaactcattgcgc	aagaatgttttcaatgttttaacaa	
Dmel_CG8108	cttttattggagtcttgagttattc	taacaccatttcctcattgatccgc	
Dmel_CG40045	gaaaaagaatacaatgttcatagca	gtaatgggagttacatacaagtgac	
Dmel_CG12020	tccttttctgttggaggtttcaata	tgatagtttctctgtttcttctgca	
Dmel_CG1099	gacgaaaaagatgttggttcattaa	aaatgaagtggtaacgggctgtgtc	
Dmel_CG9086	gaagagattacacgcttcattagtc	taggtgttcacctaacgttggcaag	
Dmel_CG8177	ttttgtactccgctccacgagctag	gattataccctacttaaattgaatt	
Dmel_CG11798	cattgcgttttcgttggttttcact	gacatttttattcacttatccttgc	
Dmel_CG11853	taaaacaagaccttgccaatgaagt	cctagatagacacctacctctactt	
Dmel_CG17698	gttctactcacaatattccaatcca	caaatacccgtatacacgaagatcc	
Dmel_CG18646	aagggttttcattcggtgcaatgca	tcgataacaccatcaccgactggcg	
Dmel_CG6706	taaccaaagattatactacgcggtc	tacaaaacttccttactaccagtct	
Dmel_CG14180	gaggcaccactgtagtctagcggag	gagcgctttatccaaatgtgaacaa	
Dmel_CG3540	gagaagagggttgatatttgtttag	tgttgtaactgtgtgattagcgtac	
Dmel_CG34405	ttctggtggatgttcagatgcagct	tcaacacctgagatattattaatca	
Dmel_CG7199	acaaaagttgatgagaacggaaggc	ttggttatagcttgagacgacgact	
Dmel_CG9366	atagaggcgtcacaatcgggattgc	cgaggatgaacttagtgggatacga	
Dmel_CG2818	tatgtactgaccgaccctatacgag	ccaataacattgctaagagattccc	
Dmel_CG9176	catcgttgtgagaacgttgaacatt	ggccgatctgaaacagatatattta	
Dmel_CG33518	atttgaggttagcaagaagaaagag	aatcttgttcagtgccatctatata	

Dmel_CG1522	cattttgaatttatcgaattcatca	gagcggattgagtgatggaatattt
Dmel_CG10693	ttttgcattgtacaaaataagtttg	gggcgatcgggaactgattaacttt
Dmel_CG7535	tatgettettaaceaegtataaatg	aaacatettecatcacatgeaacat
Dmel_CG2818	tatttacgtcatccactgataaggg	tagctaaggattatatatagatatt
Dmel_CG15307	taatgtattgtgtgtacgaagaacg	ctgctcgaaggaccacaaacgtaaa
Dmel_CG15611	taagtacagctgagagtgtcatagc	agtaatgaccatccactttgtccag
Dmel_CG12071	cggaagggtaacagaatacagaatg	gttgctgtggtttcagttcatttgg
Dmel_CG41439	cgaccacacacgtactcagtatgga	tatcgtattggacttgtcgttaagg
Dmel_CG8408	aatggatttcaattgggtcaaggta	tgtacttttggatttggtaaaagga
Dmel_CG1086	ttatttgccatgttgtgtaattaaa	cccgctcccccgctgaattgttcac
Dmel_CG3126	gagtggtgttagaaatggtcaaaaa	taataagcgggattttaagtacgat
Dmel_CG11473	gattgaaaaaaggtggaaggtgaaa	ttgctctgtgcagtcctgctcccga
Dmel_CG17761	gattagtttgcgaggcgaaggactc	gggcaatccttgtagcgagtatatc
Dmel_CG34405	tagccgtaggatctcgccaaaagct	caattcaaagaacactgctgactat
Dmel_CG9412	gatttaattattggaattgctaagg	tctccttacttttactgtgatcaga
Dmel_CG8253	atgcccatgtccatgggcaggaaca	gcatcttgcatctatcgattagtaa
Dmel_CG4294	atagtagcatagagctccacccgtt	cacgccgttctggttgctgttgtgg
Dmel_CG32717	tacggttaccccattacccattatc	tcttcttttcgatccgctcgatacg
Dmel_CG8639	tttgcaggcccaccaacaatccaat	gcccagcaccctgtgacttatgaag
Dmel_CG12746	gacgcctggcttgttaaatccatcg	taatgactcgtcgtttggttatctc
Dmel_CG4699	taaacatgacgaaattcgataattg	tctccgtttcgtccccgttccgcat
Dmel_CG31203	tcgttttgtgtatccgtacagcgtt	gaataagcttgctagattctggtat
Dmel_CG11248	gctggtttgcatacgcccacaaaag	cacaaactcaccctcctaaaataaa
Dmel_CG9813	gattagagcctaagattcgattgca	cacgccaacattgatgcgaatgcaa
Dmel_CG33472	gagtccattgcatttccaaaccaga	gcgtactataaccagaagttgacaa
Dmel_CG12295	cacccacttccggttacatccattt	ggattcttttgacgctggaaatttg
Dmel_CG6477	tgcgatggattacaaaaaggcatgc	agtaggcgaagtccaaatgcacgac
Dmel_CG12090	tacgtaacaaaaccaaaggaaatga	gccttagatatatttgttggagtcg
Dmel_CG9734	ggaattaagtccatttacttcggtc	gcccgctgctttgcggctcttttat
Dmel_CG31973	agtaagaaaatcatagcagatggat	gagaccctcgaaaatggcaacacgg
Dmel_CG10077	tcgaatttgaaaattgaagaatgtg	catttagggccccacaaaggctacg
Dmel_CG4019	gagaagcgcttgaataatgccacac	ttgaatttctttggtttcgagtgcc
Dmel_CG17510	caataggtacgcattctgtctggtc	tttataacaatcagaactaaaataa
Dmel_CG3707	ttagaaggttgtgcagtttgatgga	gatggattaagctatcgatctgaac
Dmel_CG32019	gtaagtcgtttcaagccatttgttg	tagcattaaccgtggaatatgtcaa
Dmel_CG15270	tagttgttggttggatagatcgatg	tacttctcgctttttgtgcggcaca
Dmel_CG8266	gtcttatcagtcgaaaaagaaaaac	tctgggaaccatttgaggtgtattc
Dmel_CG15096	gggtttagtcaaggcattcaataaa	ctgacaaggatatcaggcaaggata
Dmel_CG2621	tcaattgaatctggcgctaaaagta	taacaatgacactttcccttcacag
Dmel CG9734	gttgaaaactgagcgcgggcaaatt	agagtttggacagaggcgtagttca
 Dmel_CG31772	gatccgatacgtactcgtacccgta	tetcaatgatecetattaactaagg
Dmel CG8421	agtaaaatatctaattgcttgttgg	aaatggttttcttatttgttgctaa
Dmel CG11783	tgggtgcagacaagatttcatcgtt	gctcacctatgaacgacttgaatct
Dmel_CG1522	tgtttttcggttttcgattcaatgg	gaacagtttggtaaactttgaattg

Dmel_CG11325	aagaccaccacattaggtaccggga	ccaggttgtaaaatgctggtcggaa
Dmel_CG30048	gagggctaaatatcactggagtcta	tgggttaagtgagtagttccgtgta
Dmel_CG32490	taactatatccatgaatatatcttg	caatgaggtaaagtataagaataca
Dmel_CG31814	ttcattagaaaagtacgctgtatag	tatgcaactcttgcaatgtggcaaa
Dmel_CG32387	gaaatggttagctaactcggaaaat	tgtttagcttttgcgatgggtacgc
Dmel_CG9042	gagtgttgttcgctggttgccaatc	ttccttatcacagtaattagaaaag
Dmel_CG6866	aatttcggcgagagtgtcaactgga	cgctattcgtcggtgatgtatcgat
Dmel_CG8034	caatcgtgtgttagaaattccaatc	tgaatatttctactcccggatgacg
Dmel_CG5125	tgtttgaagccctgtgaagtggata	cattttatgatagacccaattccca
Dmel_CG17927	tagaattttcatgcattttggactt	gattatcatcatctatatgtgacca
Dmel_CG10384	aaaagtgcggcctacttctaaaaga	tttgatggtagtaaaagtataaccg
Dmel_CG18076	attagaagttetteaaacceggtga	gatatggatgattttggaggatttc
Dmel_CG8604	tttgcagatgatgtaattatataac	tattgagttcagttctttattgcca
Dmel_CG7971	aagaaaaagtatgtgcctcaatcat	tctggttcccccttcattaagtgg
Dmel_CG32387	atgtggtggcaagaggtcacattaa	ttttgcccactaatatttacagctt
Dmel_CG8166	tgcatttccctcaaaggcttccgag	cttttgatttctaaactgcctgtgc
Dmel_CG33217	ggtttgttactttctggaactacaa	ggtttgttactttctggaactacaa
Dmel_CG17364	gtgtcagccagttgaatcgatgtgg	gaaagatctagagtttagagataga
Dmel_CG13506	cgtatcctcgcactatcactcagtt	ccattttcccacacgatctttatct
Dmel_CG11848	atctacactagcctgtttaaaacaa	catacatgaaagagtatgaatttac
Dmel_CG5748	aataatcatcgagtcggacaaacgg	caagaaattctactcaatgttgata
Dmel_CG17077	aacattagttatattgtaatacaac	aaaaacatgaaagtgcggactgta
Dmel_CG8002	gaaatctcgattagcgaaggtctta	caagatttaagtcaaattatgtaca
Dmel_CG4128	aaattggattagtgagcttcgggca	agagaaataagcgtaatgaggtttg
Dmel_CG11661	tttgcaaaaagtctgcggggctatg	ttttgcatcatgtggaattccagga
Dmel_CG6695	gagagagtggtaaagtagaacagcc	gggcctgtatccttgtaattgtaat
Dmel_CG1049	taagtagtcaagagttaggatgcaa	gttgaatagcccaactaatcgggaa
Dmel_CG2040	gcgggaaataagaacactgggaaaa	ccgtccagtgagtgaaggtcaaacg
Dmel_CG4128	cgcaatttaaatcaaagtcgaacgc	ggttctgtgtttggactaacgcgat
Dmel_CG3164	ggtgttaagcaggttattagcacgt	gttatcaaattcttcctctcgggct
Dmel_CG6584	gccatttcgtgggattaattggata	gatggatccgccttcgatggcgtcg
Dmel_CG9181	aatcaaatgttctaattagtcgcgg	aaacgccgaccgctggtcgcgcata
Dmel_CG10691	tgcgtgtttttatcccctgttcttc	acgcagttagctcggctcgctcata
Dmel_CG32018	catcatttggaagttataatcgtaa	tcagacagaaatatactccagagta
Dmel_CG10693	tgttgtttatccataccagaaatta	tacacaccgaatctgatttaccgag
Dmel_CG1544	ttcccatacccctcccgaaatcgtc	ccggctgcgtgtatttgtcttgtga
Dmel_CG10353	ttagtcggaagtactggcactcgca	gcatgacaacgggtgcgattttcga
Dmel_CG8532	ttgctgccgctaaagttgtcgttgc	tttcgcgaaatgaaacattgaaata
Dmel_CG2086	ctgattcatgccgtaatgtgtgcaa	taattgtgaagttactaagcctgcc
Dmel_CG3191	tacgggtatgtatgtttttggaaca	ggaaagggaatcttttctcccaata
Dmel_CG13503	tagetgaatteattttaggteetee	gctggattactagggtgttactgaa
Dmel_CG1056	tcacctttgaatacagattggcaag	gagattcacatataaaactcataga
Dmel_CG10537	acgatacgataacgattttgatatt	cgctcaatggattgtcggtggtttg
Dmel_CG34405	ctctagcattctccggcgaactttc	gatatttgggagttactaatcctat

Dmel CG18646	aagaatotgagtttcgatttggatc	gatteggatgeeacagtgteeaata
Dmel CG2534	taacacataattaaagggatgcgat	cctttagtccacagcttcacattat
Dmel CG3625	aagagcatttgacgtgtgtgagata	gagtgaactttaaaccacgctgcgt
Dmel CG9473	ccaggatcagtgttgggaaggctac	caatctcttacagcatctaacacaa
Dmel CG32019	tgaaaacctccttgcgaacaatgct	aactgtatgcaatcatcctaaccta
 Dmel_CG10537	tggaatgaagatcaggattcgatcg	cgccgcattatgtacgatctttacc
Dmel_CG9057	cattaacgagggaagcaagcaattg	gttacgggttataaacaagtcattg
Dmel CG4829	gaaaagtgctctaaaagtgtctaaa	catacttttgtgaatagaactcgat
Dmel_CG10693	cagagatcaggccactcacctaaga	tctaaattacgtctctaacccatag
Dmel_CG5695	cacaggaatcgcaagaacaattagc	ggtgttagtaatttagttagtatga
Dmel_CG32809	aacacaaattaggcggtaaaacac	cgttttctctccaggcacttcggat
Dmel_CG9936	gacatcgtgttagtgaaacaagctg	ggtttttgggtcgtcactttcactc
Dmel_CG33208	aaagaagaagtattgattaaattta	taatatagcattattgatccccggc
Dmel_CG9907	ggtatttggtttagggcattcatta	gctaagcacattccagctagaaata
Dmel_CG6859	gatgagtggaggacgctcctctgtt	caccetacgcacacaggtgaacttt
Dmel_CG6238	aaatgaaaataagttgtcgctgatt	tcccaggatatcaatagtgtggcct
Dmel_CG1830	ctaactgatcttgattgcgaccata	catcatgtaatccttcactaaccaa
Dmel_CG17212	caaagtagggatcgtgtaaacatta	taaattgcggtttccagctgactga
Dmel_CG5958	tagtttttcctaatccactgattgc	cttgcccgatcatttgggttagaaa
Dmel_CG4019	tctgtgtctatataatattgcgtaa	accaactttctgtttcactgtgtta
Dmel_CG8779	tataatctttcttagacttcatgtc	cataaccccttaaaaatttgacagc
Dmel_CG32046	gcaaagcggttagaggaaaagcgat	cgaaactccgaacgactattcaaaa
Dmel_CG9990	tggcatgcaccacgtggctaacccg	ccatctgtttgtggttttgaactgg
Dmel_CG7007	tatttcgcggcttgagtttgactga	tccgtcgcgagtgctattttcttga
Dmel_CG3725	ggaagagtgtggtcgtaactaagtt	ggtgggtttctttgtgctgctgcac
Dmel_CG32698	taagatcgatcttctacttcatcac	tcactcattttccatcgctcttctg
Dmel_CG10693	gtaagtcacgcagctggcagttttc	tactttagcgaacttactaaatgcc
Dmel_CG34405	tcaaaacaaccacaccgactcatta	gttactgttattccaactactaaac
Dmel_CG9057	cacattacgatgaaaaatacggatt	cacccggaggaggtcttattttcat
Dmel_CG4999	ttgcgcgcgctcaatcaaaacagtg	gtgctcttctgtccgctctaccaaa
Dmel_CG1522	tcgaaaaattacttccctgtgtgct	tgatttttgattgagcttgttggac
Dmel_CG15015	aacgaaatatttgaagaagttgcaa	taatgtatgtgggtgaaagatatat
Dmel_CG9932	aaataagtcaacaattagtatagct	ggcggctcgcttcggtttttcaatg
Dmel_CG1770	caggttagttactcattcctatcat	aaaaccatgggctaatgaacttgac
Dmel_CG2999	tttgatttgggtttttagacattcc	caacagaaaactaggacggtgagag
Dmel_CG7149	tacagatcgcaatttgaaagattca	cccattgcgataatcacttcagtac
Dmel_CG8176	atttttcatttacatcgttgtatgg	catccatcaaccactgctcatccaa
Dmel_CG9042	gaaagttatcgggaacgggcaacaa	gtttgatataataactatgcatctc
Dmel_CG2146	acagcaattgactaaccctaaacga	acacacgacctactaatttcgccta
Dmel_CG2165	gcattccaattgttgcctttgtgag	tgtttcactgtttctaataatacga
Dmel_CG5594	ggtccatatccgaagcgactctcac	catactcctcatggtgacattttca
Dmel_CG6671	caattgccagttagtctcttcttcg	caaattgcataaggatcttagtaat
Dmel_CG9795	tgtgtgccaaattccgctgagacgc	gcttaacaatacttaactatccgta
Dmel_CG16932	ggtttctcgatcaataattaggcta	tacagaaatcatgagaaactgaaac

Dmel_CG17759	tgtgtgcagtttactatcataggat	tcaaactaactacgccttcttttct
Dmel_CG1871	ggaacattaatgttattggcggtga	tagtgtgcgtttcattacattacgt
Dmel_CG3620	gtactgaacgaaacacggccgcaga	ccaaaatccaactgccgcttcaaaa
Dmel_CG11148	aagttctatactgttgttcaataac	tgtgctcatatgtgtaggagtaaaa
Dmel_CG33513	aggcccggtgctcattttgactaca	cggatgcaagcatgcagagcacaca
Dmel_CG1318	taaggcaatggttcaggaaagaggc	atgttttccgttgactctatgagta
Dmel_CG8233	taattagtgtttaataccgacaaga	tgatatgatgcctttagtttaaaca
Dmel_CG5215	caatggagaaaatgtgacaaagacg	tcagactgcaggaggctggacttgt
Dmel_CG34240	caaaaatgtcgtagtattattgtta	cctaaccgctctatttgattgaaat
Dmel_CG5455	gagtgagcgtgctttgtcggatcca	cgtcaaggtgccgttccagtcggtc
Dmel_CG32387	gggatcagccaaggattgatgagcc	ttcggcttctcctttcacatactaa
Dmel_CG15078	tatgagtgttgattttcgtagtact	ggagttgcgtgttaggtgaaataac
Dmel_CG33092	aaatattgaaactattgcatcacaa	cacatattttctaacattcaatctt
Dmel_CG9042	ccatcgccagatgcacttacataat	ttttaatctaaaccttgcgcccttg
Dmel_CG1333	aagatteegggtattteeategeta	ctgacttcctcatctgcatcttgta
Dmel_CG11066	caaatcaaatcagggatagtcaatc	tcgaaatttgtggtccacagttaat
Dmel_CG5237	gttttggcatcaaagcccagaggcg	ccggatcgaggatcttgctgagcac
Dmel_CG15817	gccgttctagacacctgcacatgtt	aaaatactaataatcctgttccttg
Dmel_CG8877	tagacaaagtacatcatgtggtcat	gattttagaatggtaatttttgaag
Dmel CG10737	tetcegtcagettttcateettttc	ccaatacccaatactaatttattga
Dmel_CG18076	ttgttttgggagggggggggggtggtgtc	tttgattcgatgagatgccttaata
Dmel CG8604	tttgaaactaacaactaagtaacta	cataaataccgactaatggcaaatc
Dmel_CG9425	ccggagtttacaagagcttatccct	gcaatcattacccttttccaacttt
Dmel_CG31149	tggaccacagtgagtacctctaatg	aacagctgcccatttgactatgtga
Dmel_CG10209	attagcaatcccacattccaatgaa	gaatcggacgattcgtaatttttgg
Dmel_CG1799	cgttatccaaatctcatgtcattgc	tccgaaattcccgacaatcccgaaa
Dmel_CG7047	aattcgttagaacacggttgccaaa	tcatagctggctaggtctgagacca
Dmel_CG32018	attaaatcaaacattcaaagtcgtg	atattttcactccttaacattaatg
Dmel_CG17927	tatacaacataattaatacactagc	tatgatcgattattaacgtgtgaat
Dmel_CG9291	taatagttaaagaaacgacttttga	ggctgtgcctttggtggagccaaac
Dmel_CG5670	tcactaacctcaacctttaaaagga	accaccacaaacgtttgcacgttta
Dmel_CG7293	ttgctcattagctcaagtggctgac	tgcgtcaggagggaattattgattt
Dmel_CG30165	tgttatggagtatcagtccgtaggt	ggagaaagaggacttgatcctttta
Dmel CG32423	cacaggtgggttaaatagcattccg	tggaagcccattcagatatgttatg
Dmel CG11098	ttggacctccggcacagccatgtct	cataattaatttgcgtttgtctgg
 Dmel CG32387	ttggaggagcgtggaaaaatgaaaa	ccagtggatagcatcgatttgcgcc
Dmel CG4128	tgaaaaatacaataacaaccacaca	cgtactttaagctatagcgttttaa
Dmel CG9042	gaatgtttaacattccccaaagaaa	ttccatccattacaaattagtttcc
Dmel CG4481	aaatgaatactggcttaaaagtggc	tccaagcattgattctaatccacgc
Dmel CG5444	atccaaccaccatgctgtcaccctg	gactttgaaaatgtgatgagatgaa
Dmel CG10023	taaaaaggatttgttactcgcggct	gattgctgtcatctaatcctacggc
Dmel CG17603	ttattatccttacttcgtotttotg	gagtacgctctttctaatgcgtgtt
Dmel CG11051	taattataaagcaatcatatcaaaa	gtattttccataaagtatttacgaa
Dmel CG1517	tagtatgttgaatatgtgattatcc	aatataagactttccctttcggcag

Dmel_CG7971	gcctttaaggataagtatttcactt	acataagctattaaaagcgtggtac
Dmel CG32464	cagtcgacactgttgacttttaatg	agaagatgtttgtattccacctgac
Dmel_CG17762	gaacattaagatcgacagagcatat	ttgtattctgcagacttgttggtat
Dmel_CG3028	ggatatgttaactatatgttaacca	tacatttttctgactcatccgatat
Dmel CG13320	caaatttgtctggaatgtatgtgta	aactcgtatcctcctttaccatttc
Dmel_CG1522	cacgattcagatatcggtaaagaat	gaaatcaggatttccggttttgact
Dmel CG9065	gataagaattttgttgttagccatg	catgggatgcaaaaggtgcacactc
Dmel CG9499	taattagctatgtctcttaatacat	caaattacgggattatagaagctat
 Dmel CG33203	cagagggttaatgaccatattagcg	ccagccaaaaacgtacagttataga
Dmel CG2467	cgatttaggttgtgcgcatatagga	tgagaagtaattgggattcgattcg
 Dmel CG11352	gataagaggttattattcaaggatg	cttaagcgtaacaggatggaattca
Dmel CG4533	gctttgatcaagaaacgagacgata	tetteactgtteaataaatteegeg
Dmel CG4596	aaagccccatctattcatgttctaa	atgtttttgtggttataaggattat
Dmel CG6588	gaaaatctatactgtgcatagggca	cgaggaaatgctgtttgtcgtcggc
Dmel CG15441	tgcaacacagaggtcataatcaagt	aagatggaagttgccctcatcccta
Dmel CG17193	aaatctgggtaaatcaaaaccggca	ttacatgggccatatggctaagggc
Dmel CG2671	tgtacagatataatgtgggcccgtg	gtagatacgtacaaaacagcaaatt
Dmel CG33141	taattattgcaacataacatacata	tatagtacagggtacagggcggacc
Dmel CG18319	tctaaaaaccattgtttttgtccaa	tggttaacttcactccgatctcgtt
Dmel CG8002	taaataactttgtaacatcttgcat	tactettteaaattegtgggacaeg
Dmel CG8390	tacccaaaggagttgtgttctttaa	cggctaattacggttaagaattgta
Dmel CG2818	tgagtecttgaattaattgecaaac	getatcattaactttgtactccatt
Dmel CG6236	gcaaatatcggaccagacacatgag	ttcgcattattgctgcacatacage
Dmel CG34313	ottcaacccocogagtaaaactcca	cactgaacatactacagtttccaca
Dmel CG8095	aaagaacetettottegeaaatgga	ttttacatcacaactatatacagtg
Dmel CG1553	caaataaacatagatgtaagtacgg	ctagtttttctgtttcggctataca
Dmel CG9572	cotattcotagtcttaccgcaccag	otgeateaceteacegeetotgeet
Dmel CG2999	taacaaaatagaattaacaagatat	graggattactttaagtttcactta
Dmel CG7720	gaagaaacaatttaattattaatt	gcaggattaettaagtteaetta
Dmel CG9911	catatotacoattotaatottat	
Dmol CG1642		taaaaaatatatagagatttat
$\frac{\text{Diffet}_{\text{CO1043}}}{\text{Dmal}_{\text{CO16922}}}$	ggaaccaacagtitigtgtaccctag	
Dille1_C010855		gliceccalgligiaadaacegee
Dmel CC24405	adatgtaggaaactitgaacacacg	gaalggilgiligaligaliaaaag
$\frac{\text{Diffet}_\text{CG34403}}{\text{Diffet}_\text{CG1512}}$	aligacaagigeetalleaceeace	
Dinel_CG1515		gengaccelggelegalgaceagt
Dmel_CG32490	tgtgaccaggttgttttgattggca	tactaattictictacticcccgac
Dmel_CG11284	gagatetgagateattgateacttg	tatttggcgaattctaatgtcgatg
Dmel_CG34403	tagattgtcgggttagcaggcattt	tacggaatgcaaatacttggcactc
Dmel_CG32000	gaacgcatcacattgccttaatatt	atctatttacgaattttcagagtgt
Dmel_CG1903	tttttgcagcaagttgttttggata	catgttcatgtatccgtgctcttga
Dmel_CG3902	gataacgataaggttttagtttgaa	gaaaacgaagctagggggtataatc
Dmel_CG3606	tgttatccacttttagtatttcgct	ccatactgcattaaaaccaaaatca
Dmel_CG11051	taaaatgeteaaagteetggeacae	gcaggacctattttcagagataaac
Dmel_CG9565	caaatgaagtagctaccatatggta	gattattagatacacgttggtaggc

Dmel CG10155	aatgaatcaggtttagtcatcataa	tagttggggctcagccatgaggatt
Dmel CG9578	ttggtatagcccagttccaatggcc	acactcaatgtaatcccgtcctgca
Dmel CG9009	catataagaaagcttttaaaatacg	aaaggtetttataatetagtaatae
Dmel_CG8408	accgagacgaggtgtaaacacagtc	gaggccacttaacaccttacaggtg
Dmel CG33543	aagtatgttaagtgcacttcgaccg	tattgataagtatgccaataaattg
Dmel_CG6292	taggaattaacgactctttctagga	gcgatctctaggaggattacacca
Dmel_CG34356	ctgcacacactttgggttttgttgt	tataatgccgagtaataagcttttg
Dmel CG8440	catatgattatacagtagaagttcg	catattgaatgtctaccttttccat
Dmel CG5473	gagattatgtatgtcgcattcatca	gaactgcgtaacaactaaacactaa
 Dmel_CG33547	tggttggttgttgtcataaattttg	acgaacgaacgcaaaatggaaacca
Dmel_CG8085	atggaatggaaaaaataacacacaa	tctctccgcgttcctatggttgagt
Dmel_CG12085	attgggaagagggattagtgcatct	ttttttcaatattagatactgcata
Dmel_CG7583	ttttacgcaatctgagttggcgccg	tgaatgtgatcgcaactaatgaatg
Dmel CG32296	agaaaaatcatatttcggagacgga	gatcetteaagageggeacacaact
Dmel_CG6498	taaagttccaaatcgagtgttaagc	tgagaacttagagctgggaagcgcc
 Dmel CG18646	taagtttcaaactggcaatgctgta	tccaacctcagacaaaaaataacac
Dmel CG16704	tttttagcacaacacagcgagacca	tgatcgctttctccgttattactta
 Dmel CG10289	gcgacgacgcgtaactgagacattt	atcagcacggatcgagtcaacctac
 Dmel CG10693	tataaaaactataattaaatcctat	tggcacctctcaatcaatctaaatg
Dmel CG6174	cattaaatgegggtagetttgtgea	taaaataagctgacgcaactaacta
Dmel CG1507	tcatctgattagaattttgttatca	aaattcacaaccatggaacgttatg
Dmel CG5723	tattcggcatagattccgacaacga	acaatattttgttcttgactataaa
Dmel CG2252	cgcggcgtggagagagggaatggaa	gccctgacattgagtcactggattt
 Dmel CG31973	ttgggaacacattttggaatcacga	gcctccatttgtatttctagcagag
Dmel CG13778	ttttaccgctcgcattcaccgttaa	tcagaattaaaaactattagcaact
Dmel_CG11328	ggtgttttctaattaatgcggaata	aatttatcattaatctttgaaaagg
Dmel_CG2252	tttcaaaccaatagagcgacgatgg	tagttacaaacttacaatatggctt
Dmel CG7555	gcacttgtagtctcaaaccttggtt	tgaataaaataatcgatccaccaat
 Dmel_CG33013	ggctccgtgcttttacttttgtggg	ggttggctgcctcgtgatgttaaca
 Dmel_CG31771	tgtatcggtttaaccattatcattc	catacacaacaggcatagaggca
Dmel CG11348	ccgaaaattataaccgaatcacaac	gtgtgtgtacactcttccgttgttt
Dmel CG5627	gaatcgatcccaccacgctttcatg	tacgaattcgttttcggatccatag
Dmel CG1511	taataaaatccgttcaaatatcttg	taatcacattcatgcttatacaaag
Dmel CG4894	taaaagtcattggtaaagggtatct	ccctgacgttccaaatcatttccaa
Dmel CG9317	taattatttcatcagttatttcaaa	aatgggctgacttgattgccttagc
 Dmel CG11155	aatttattgttgcttctataaacct	taagagattaatatactttgtaaca
Dmel CG1965	agagggaccaagtccgatttgtgac	ttaacctttgctcactcctctgcag
Dmel CG14372	tettegaattaaaaagtacgacgtc	gtccattatttattgaccccaacaa
Dmel CG1848	tcaataattagcaaagtgttactac	tgcttttaattcaactcaggcacat
Dmel CG1715	gettaatcegtetcaagtettegea	cecttcgatctgtttatttcggcct
Dmel CG17816	tataaatggtagttctgctcagttt	gtttattgaagagtttggtttttga
Dmel CG6703	tcaattagcgcgtgaacaaagacag	tttgggcgtaatgggatgaggaaga
Dmel CG11023	aatatattgatgtctttcgtaccca	aacgttgtggtgcttgcgctttaaa
Dmel CG4700	taagcccaccgactttcggagcgat	tttactttttatcccgcgcgcgcg
Dmel_CG1511 Dmel_CG4894 Dmel_CG9317 Dmel_CG11155 Dmel_CG1965 Dmel_CG14372 Dmel_CG1848 Dmel_CG1715 Dmel_CG17816 Dmel_CG11023 Dmel_CG4700	taataaaatccgttcaaatatcttg taaaagtcattggtaaagggtatct taattatttcatcagttatttcaaa aatttattgttgcttctataaacct agagggaccaagtccgatttgtgac tgttggaattaaaaagtacgacgtc tcaataattagcaaagtgttactac ggttaatcggtgtcaagtcttcgca tataaatggtagttctgctcagttt tcaattagcgcgtgaacaaagacag aatatattgatgtcttcgtaccca taagcccaccgactttcggagcgat	taatcacattcatgettatacaaag ceetgaegtteeaaateattteeaa aatgggetgaettgattgeettage taagagattaatataetttgtaaca ttaacetttgeteaeteetgeag gteeattatttattgaeeceaaeaa tgettttaatteaaeteaggeaeaa cgettegatetgtttattteggeet gtttattgaagagtttggtttttga tttgggegtaatgggatgaggaaga aaegttgtggtgettgegettaaa tttaetttttateeegeegg

Dmel_CG9834	cagagggcagaaaaagaccgtgagt	tgcaataaggaaaccccatcaaatc
Dmel_CG10076	aacagcacgtaaaaccgtaatgcat	tgactgaatgcgttctcctctttt
Dmel_CG5554	cgaaagggtggctctgagtagtccc	tcggcagctgtgttaaacatatgtt
Dmel_CG10975	tatttctgcccccataaagatggaa	tctgatcatttttcgatcttttcag
Dmel_CG34405	caacagttttaactccgaggagctc	taatgttatgccatctctgacgcaa
Dmel_CG2086	gaattcagacaattagatcgttgtt	cagagcactacacggaatggttctt
Dmel_CG11473	tgcagtagtagaggcgttaataggt	tcgtcttacttaactcagtctcgct
Dmel_CG2082	gttggttggttgttaggttcaaaca	aatggcccagtaaagctggcgcgga
Dmel_CG7524	taatattaagatgctagattagctc	aattaaattgtaatggatgcagggc
Dmel_CG11111	acatttttcatctgcggcctggaaa	tcctttgcgctttggaccttactct
Dmel_CG4898	aatttgctaccccttggtttgggca	ggttctttcgaccatcgaacgtttg
Dmel_CG8400	tattggttaattgactcaggcagcg	tccagatccagcaggatccagtaga
Dmel_CG7875	tgtttataaattcaagcagggtact	cagttccttaatgtgcacggattag
Dmel_CG32019	tgcaaatgaattagtgttccagaaa	aattaatattcataacatttgcgtc
Dmel_CG12253	gactcgcgaatttgtatgtacatca	tgaaaactaagatttgttactaaat
Dmel_CG8727	gataacgcaaggagaaaacttaagt	gaatctcacactttcgcatggccac
Dmel_CG5945	tgcactatgaagaacgatgcctgct	ttaatgcacattctaacgcttgtga
Dmel_CG8201	gcgtaagtcccactttggggctaac	aagtacccattttaatgtacgataa
Dmel_CG1506	gtaatcaaggcggacggttatcaat	ccaacttatctgtagtggttaggca
Dmel_CG12071	tattgcacatagtgtgtagtattac	gcttttctctggactttctcatgtt
Dmel_CG1976	gcgtccgattgatttcctaccccag	caaagcgcgtccacattaatattga
Dmel_CG11883	gagtcgtggcttttcatttgcataa	cgttttcaagcaactattaccccat
Dmel_CG3525	catttaagtttacagaattcgagta	catatacgtatgttgtctcgttacc
Dmel_CG13363	gggatttcgattaatatgaattgca	caccacagaggcgagtaaccatgct
Dmel_CG1695	gtgagtgtgctcatcccgaaagtat	tttctttgtcatccccgaatcgcag
Dmel_CG1522	cgattcgatccagaaacgattcagt	tggaaagacaacaacgacatgtaga
Dmel_CG34405	attggcctatgctcctgcccggtca	cataactgtggattgtatatatata
Dmel_CG18815	gtaagtggggtcatcctcattcaaa	actgcaaacaaaacttacctaagta
Dmel_CG7535	tttaaactccaaacagcttatggtt	actttcatgtcaaacggcgtcgcaa
Dmel_CG32387	aagatcaggcgaaacgggttaagat	gattcgaaggactcgagttcctcat
Dmel_CG11111	cgtagttgcccgctaagaaagcagc	ttaaattcgtattgccaactaactg
Dmel_CG17759	tgctgccagttctgtgtttggtcag	ctaataaaacaacgatctcttggta
Dmel_CG4532	catgaaatttatcaaaaggatcgtt	tgtttgtgttgccattttcagcagt
Dmel_CG6775	ttcacacataattctcttcggatgt	cttccttccacttctaactctaata
Dmel_CG2999	aatacacataactattaaaattagg	acaattatttgtgctctgctaagaa
Dmel_CG7892	cagcgctgaagagtgaaaattgggc	aactetteectettegaategatea
Dmel_CG6634	tgtggtactgagatactcagatgcg	cagctatgtaaatttcaatcgactt
Dmel_CG32484	aacccccttttgacttatgtggatc	cgtaatccgattatcagtcttgtgt
Dmel_CG2505	ggccaagagtgcatggtcaatgtcg	gtcagtctgtctactattatccccg
Dmel_CG8325	tatattagttctttcgacaaaagct	gatagtgagatatgaataagtcaga
Dmel_CG32335	tggaaagctttatttgacgtatccg	ttttatcagctattccacgcgggag
Dmel_CG1862	tgaaaaagatgtaccaaaaaaggaa	acggctacagcgttttgttgtaaaa
Dmel_CG10541	catggtggagtcatggcaactatca	gaaaccccaacatgtgtgattgaca
Dmel_CG17248	aaaatgatgcaagaattagtagggc	aataaataaaagattgctctcgctg

-		1
Dmel_CG8770	gcttatattaattaccaagaacaac	gtattcattacacccacccaattat
Dmel_CG17686	gtcgattagttagcgaaggcaacgg	ctcgccaggctaccctagacaaaat
Dmel_CG3664	ttataatggagacggataaaaacga	tacacttttaccgatgtcccacaga
Dmel_CG16926	tgcaaaattgatgcgtatgagctcc	gatcgagatcgtggatcgtcatgtg
Dmel_CG13654	ttaattgacattgcagcggaacgta	cattgtgtttagactgcatatgcat
Dmel_CG7875	atacaaagtgtacggaacccaagag	gagcaactgcatccctacaccaccc
Dmel_CG2519	cgtttaccgtttcatgattcattgg	aacgacgctgtctcgtgaccgcaaa
Dmel_CG33547	tgcatcagatggtggcatggaaagt	tggccattttgttgggtggttcgtt
Dmel_CG8884	cactttgattggtaaccaaattaca	cgtcagtggagtgaaacttatcgca
Dmel_CG5098	accgtcgagatcaagctgccagtta	atactggccaatccgttttaactaa
Dmel_CG34408	gagetettgaacteatteeattttg	tgtattatttaattgcccacctttt
Dmel_CG2910	taaaaacgatctgaattgctctgat	tgcatttcgcccgtactttcacaaa
Dmel_CG8739	ttttagctcactgcaccagatatct	cagttagacacagcactatgttgta
Dmel_CG7555	tctgtattccctagggtgcacgttt	gaattttagatgtgtagacgtctag
Dmel_CG34126	ttttggtgcgacatttttcctttta	gcacgatatgctttctaaccccttc
Dmel_CG7611	cttagcagacttgatgcaccaaagc	tcacctaactccaatagagcacaat
Dmel_CG5247	gggttttaatgtgcgaagtctgttc	taaatatatagcaatccgtacacta
Dmel_CG1522	tacgatagttaaatgcattgaacaa	gaagtggcttcatcgttaaaataaa
Dmel_CG9163	ggccatcgggttacccacattcacg	accttagacacagggagaagtttct
Dmel_CG17058	gacacttatggacacatcaagttag	gttcctaacagttgcacagtgtgta
Dmel_CG32464	caccaactggttttgtggtccgaaa	tcccttttggatccctttgccagat
Dmel_CG8739	aatgtgttagtattgagaccgaaac	tactagtcagagtttactaatatgg
Dmel_CG33514	taaggattttgacgccagctaacta	tatcaatgcaattctgtcaattcag
Dmel_CG12072	tcaaacgaaaattgtcacacgctca	cgttgcattttcaccaggcattttc
Dmel_CG6214	tatgtccgatacaaatcgccatcgc	cacgcttttgcctagaaaatcaatt
Dmel_CG8421	taagtgttagccataggatatacaa	gaaaacaatttgttctaattcagat
Dmel_CG32169	tgcaattttaaactttgcccaggga	cgagggagaggtttgcgctttaact
Dmel_CG33130	tacgaaaagtcacaaaaacagaaaa	gataaatgcgatgcggtgcaaagtt
Dmel_CG4086	gaacagacactcaaggttaaaagat	gattacttgaccctggttaacttac
Dmel_CG8996	gattatgtaagattatctatcgcac	ccaccctaatgtgagacttcttggg
Dmel_CG32387	ccgaatgggaattggtaagttctac	cctttctccggacatattttctcat
Dmel_CG16899	tatgtcttccagaagcacaagacga	gacgatcagtctacataatttactt
Dmel_CG4532	ctttatattccaccgcccaggcact	ggagaatatattgactaacattacc
Dmel_CG33275	aactgtgctacttcttctaggcccc	tatccaatatgtgtaaatatccccc
Dmel_CG10693	tctactgttaccaataagcatacga	actcctatttatatgtctctgtgtg
Dmel_CG8929	caactaccagcaagcaactgcatag	gcttaccttttacctctcaaccttg
Dmel_CG4376	ttttatttcaggagggttgttgttg	aagtgtatcgtggtgaagtttagtc
Dmel_CG4894	gaaagaatccctccaaaatcctctg	cccaatcgaatattggcaataaata
Dmel_CG1200	taagaagcaatctggcgaagcttgc	agttcagtttcatcagtaaagccct
Dmel_CG9163	gaatactcaaacgattgtgagacta	tctctatgcgaacatcacctgctct
Dmel_CG33995	cataccgacctactcagaatgatat	cagtgactcatcgatttctgcattt
Dmel_CG4662	aaagcgttaacaagtgtgctaagtg	gattaatctcttccaacatcctcga
Dmel_CG9765	cgagaaatttatacataaacttgga	ttttctaccttaagagatttctggg
Dmel_CG33208	gcagtgtttgtaggcgtgttttggg	cgtgcaaagcgagaacggggagattc

Dmel_CG34363	tccaccaagtttggcgatcgttagt	tgtgtgggtgtaataggaataatag
Dmel_CG32031	tctgctctgcttctggtctgcagaa	tacttgaacgtctgaaattttcact
Dmel_CG1522	tagtaagccaactccatggtcacca	gtttaaggggctgaataaatggtta
Dmel_CG11943	ttctccttgattttggcatttagca	gcattccacatttggctgatccatt
Dmel_CG31149	gccttcttttgcctaagtttacgta	ttatgtattctgtgctcttgctctc
Dmel_CG18375	caaatgggcgatggtactttgtgct	tgttgcgactttaattttctgccag
Dmel_CG18250	ttttgggttagtcacagcgaatgag	accgaaacaaatatggcgaattgtc
Dmel_CG31092	gatcaagatcatggaaatacgtaat	tgtgagatggaataattcattcttt
Dmel_CG34231	cagagatggcttcaaaaagtatgat	caagatcttttttatatagtgttcc
Dmel_CG14741	tagtttgctttacactcggcgaaga	gaatgtgaattgaaggacatgcagc
Dmel_CG6123	caccgattcctgatatctgattcca	tgttctcagtgtttgattcaatgga
Dmel_CG31211	tgggcggcagggttaactgactctc	tgcaggctgtcgattaaacattccc
Dmel_CG4952	aaccttatttgaaaactcgtgtata	taaattatcttgtagattacaatgc
Dmel_CG1976	ccaaaacaaaacagccgaagacgcg	caactttgcgggaattcccctgctc
Dmel_CG11199	caaggtatgcactcgaactaatatg	cattaaactcgctggctgaaaccat
Dmel_CG1354	tagttttccattgcttgtaacaaaa	cacaatcgaaagtaataagtattta
Dmel_CG7555	tatcatccgctatgcgctagcagca	tacgttgtgctctatctttcatgac
Dmel_CG2534	acgaaataagtggattcggacgaga	aacctggcctttttaggccgctcac
Dmel_CG2999	ctcttccttaatattaacgtagcga	ccaccatatgttaacattttgataa
Dmel_CG7050	cattgatatacacaatacaactttt	tgtatccctgatttggtaaataatc
Dmel_CG1693	gtggcgacggttttcagtaaaagtc	tgcattgtttgcttagggttgcata
Dmel_CG1417	aaatgccaacaagtaaccgaaatac	caacaaccaaccatcgattgatccg
Dmel_CG9364	gcctaaacaaatgtgcacatagttc	gagctatagatacttcctgttttta
Dmel_CG4952	aagtatcagtataatcattccaagc	caagataatatgtttcaggctctca
Dmel_CG3302	agaataacagaaatatacaacttta	cacttcattcctacttattttcttg
Dmel_CG10895	ttttatttgggttcgaatgtgttgc	tacgactactgcgaacacatcaatc
Dmel_CG34114	gttgatttgtggcacctcggcacac	gcactcaccgactgtttttcccgtt
Dmel_CG32647	aaatgaagggaaatgtgaaaacaaa	gtcctttttacaaccgactgtttgc
Dmel_CG2139	ctgtcggaatgatagaagcgagagc	ggggaggggggcctctgcgaaagaca
Dmel_CG2041	gatatttattaaaatacaccataaa	aaataaaattggtaactgacattaa
Dmel_CG4128	tatatagattgctcgatggtctcaa	tttaggtttatgatttatgatggcg
Dmel_CG32346	tccatttttgatgtgctacagttga	tatctaacacagaataacgattccc
Dmel_CG5621	ttgagttacataagcaggaatttgc	gaaaactagtgtcactctctcagaa
Dmel_CG15666	gaaaggatttggtacatagtaaacg	cataagagatcttcaattctttgta
Dmel_CG34387	gatgcttgttatgtcgatcctgcaa	cattttccaaatctccgacttgcag
Dmel_CG9847	cattaatttaattgtagctacttta	tgtaacaaaagtgcgatccatacat
Dmel_CG33950	tcgtcaataggacaccagatacaca	agcttttgcggtgaggatagagaca
Dmel_CG1511	tgttgctcttattttcaatttttat	ttatgtaccgatacaaaatatctcc

<u>Tabla 7</u>

Genes que muestran diferencias en la exclusión de exón entre los genotipos evaluados.

Los genes que presentan exones cuya señal de hibridación es significativamente distinta a la media, se consideran blancos de *splicing* alternativo. Aquí se detallan aquellos loci cuya exclusión de exón cambia entre genotipos: aquellos cuya señal de hibridación es mayor en las mutantes *dart5* comparado con moscas salvajes y viceversa, se presentan en las Tablas 7A y 7B, respectivamente. Para más detalle, ver Materiales y Métodos, "Análisis global: *tiling-arrays*"; y Resultados, "PRMT5 en *Drosophila melanogaster*".

El Locus representa el gen afectado, según el código asignado en el *FlyBase*, una base de datos virtual sobre *Drosophila*, que posee información sobre sus genes y su genoma. El exón excluido se reporta como la unidad transcripcional, para denotar que su numeración concuerda con la posición sobre el genoma, en dirección 5'-3' de la cadena "sentido" (del inglés, *forward*) y no con el número del exón en términos de modelo del gen (5' -3' de la cadena codificante).

Locus	Unidad Transcripcional
CG10254	tu10
CG11121	tu5
CG13388	tu5
CG14275	tu1
CG14534	tu3
CG1600	tu3
CG16707	tu3
CG16728	tu2
CG17322	tu4
CG1842	tu9
CG1842	tu4
CG18525	tu4
CG18734	tu8
CG2050	tu1
CG2505	tu1
CG2818	tu1
CG2913	tu5

CG3019	tu18
CG30264	tu4
CG30296	tu10
CG3051	tu2
CG31022	tu1
CG3143	tu8
CG31605	tu8
CG32387	tu16
CG32387	tu7
CG33196	tu39
CG33706	tu3
CG33715	tu8
CG33926	tu1
CG33957	tu4
CG34411	tu12
CG4481	tu3
CG4716	tu2
CG4729	tu7

Tabla 7A	: Exclusión	de exón e	n moscas salva	ijes. Señal	de hibridación	de <i>dart5></i> WT
----------	-------------	-----------	----------------	-------------	----------------	------------------------

CG4821	tu17
CG4896	tu2
CG5125	tu10
CG5241	tu3
CG5381	tu2
CG5381	tu4
CG5381	tu3
CG5381	tu6
CG5941	tu2
CG6027	tu3
CG6033	tu4
CG6170	tu1
CG6439	tu3
CG6630	tu11

CG6677	tu7
CG6867	tu10
CG7381	tu11
CG7888	tu1
CG7900	tu5
CG8013	tu9
CG8112	tu2
CG8256	tu5
CG8411	tu2
CG8486	tu24
CG8865	tu3
CG9660	tu12

Tabla 7B: Exclusión de exón en moscas dart5. Señal de hibridación de WT>dart5.

Locus	Unidad Transcripcional
CG18250	tu12
CG2381	tu9
CG8086	tu7
CG8612	tu3

<u>Tabla 8</u>

Análisis bioinformático de las secuencias dadoras de splicing (5'SS) en D. melanogaster.

Aquí se indican los 50 eventos de retención de intrón del tipo GT_AG_U2, significativamente más afectados en la mutante *dart5* con respecto a moscas salvajes, identificados mediante *tiling-arrays*. El "Locus" representa el gen afectado, y la "Secuencia Dadora del *Splicing* (5'SS)" representa la secuencia correspondiente al intrón afectado de dicho locus. En ésta, se muestran en mayúscula los nucleótidos localizados en el extremo 3' del exón, y en minúscula, las bases correspondientes al 5' del intrón. A partir de estas secuencias, se realizó el análisis bioinformático y se obtuvo el pictograma, descriptos en la Fig. 42.

Para más detalle, ver Materiales y Métodos, "Análisis global: *tiling-arrays*", y "Análisis bioinformático de las secuencias dadoras de splicing"; y Resultados, "PRMT5 en *Drosophila melanogaster*".

Locus	Secuencia Dadora del <i>Splicing</i> (5'SS)
CG8266	TGTgtaagt
CG1578	AGGgtatcc
CG33208	AGTgtaagt
CG11255	ACAgtaagt
CG9163	GGCgtaagt
CG15899	TAAgtatgc
CG1909	GCGgtttga
CG8108	AAGgtgtgt
CG40045	GTAgtatgc
CG12020	ATTgtgggt
CG1099	CCCgtaaat
CG9086	CTCgtgagt
CG8177	GGTgtaatg
CG11798	GCGgtattt
CG11853	TCCgtaaga
CG17698	ATTgtgagt
CG18646	ATTgttcga
CG6706	AAAgtaaga
CG14180	AATgtgagc
CG3540	AGAgtaagt

CG34405	ACTgtaagt
CG7199	ATTgtaatt
CG9366	AAAgtacgt
CG2818	TTTgtatgc
CG9176	AAAgtetca
CG33518	GAGgtgagt
CG1522	TCCgtaaat
CG10693	CGAgtaaga
CG7535	ATGgtagtt
CG2818	CAGgttcac
CG15307	TTAgtgagt
CG15611	GTAgtaagt
CG12071	GAAgtaact
CG8408	ATTgtatcc
CG1086	CAAgtttgt
CG3126	CGGgtaccc
CG11473	CAGgtctgg
CG17761	AAGgtaggg
CG34405	AAAgtatgt
CG9412	TGCgtaagt
CG8253	CTGgtgatt
CG4294	CAGgtacta
CG32717	GACgtacgg
CG8639	TTCgtgatc
CG12746	CAGgtgctc
CG4699	ACAgtaaat
CG31203	AATgtgagc
CG11248	GTGgtactg
CG9813	TGTgtgtgt
CG33472	AAAgtatga