Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis Doctoral

El rol de los genes LSM en la regulación de los ritmos circadianos

Perez-Santangelo, Ma. Soledad

2016-03-17

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:
Perez-Santangelo, Ma. Soledad. (2016-03-17). El rol de los genes LSM en la regulación de los ritmos circadianos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Perez-Santangelo, Ma. Soledad. "El rol de los genes LSM en la regulación de los ritmos circadianos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-17.

EXACTAS UBA
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

El rol de los genes *LSM* en la regulación de los ritmos circadianos

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. Ma. Soledad Perez-Santangelo

Director de Tesis: Dr. Marcelo J. Yanovsky

Consejero de Estudios: Dra. Sara Maldonado

Lugar de Trabajo: Fundación Instituto Leloir (FIL) -Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires (IIBBA)-CONICET.

Buenos Aires, 2016

Fe de Erratas

Tesis Doctoral: "El rol de los genes LSM en la regulación de los ritmos circadianos"

Lic. Ma. Soledad Perez Santangelo

- **En la página 61:** El valor del periodo reportero *CCR2::Luc* en la mutante *lsm4-1* es: **26.14 ± 1.64 vs 24.72 ± 0.81**, no 27.07 ± 1.47 h vs 23.64 ± 0.50 h.

- **En la página 64**, **Figura 23**, los gráficos deberían tener 3 colores. Negro=control negativo, beige=control positivo y gris=LSM si par. **Las líneas verdes deberían ser grises**, son las réplicas de cada LSM si par.

- **En la página 71**, **Figura 25**, el diagrama de *Venn* debe decir como el texto: **759** cambiados en común, no 756.

- **En la página 73**, **Figura 26**, el orden de las letras debería ser A, B, C hacia abajo en la columna izquierda y D, E, F hacia abajo en la columna derecha, cambiando el epígrafe correspondientemente.

ÍNDICE

Página

RESUMEN **4**
ABTRACT **5**
FINANCIAMIENTO Y PUBLICACIONES **6**
AGRADECIMIENTOS **7**
INTRODUCCIÓN GENERAL **12**
Aspectos Generales de los Ritmos Circadianos 13
Historia de los ritmos circadianos 13
Características de los ritmos circadianos 14
Mecanismos de los Ritmos Circadianos 15
Modelo clásico del reloj circadiano 15
Circuitos de retroalimentación transcripcional 17
Mecanismos post-transcripcionales: El *splicing* 21
El *splicing* alternativo y el reloj circadiano. 24
OBJETIVO **28**
HIPÓTESIS **28**
MATERIALES Y MÉTODOS **29**
Material Vegetal y Condiciones de Crecimiento 30
Análisis del Reloj Circadiano en *Arabidopsis thaliana* 30
Medición del ángulo entre hojas 30
Medición de la bioluminiscencia 31
Estimación del período 31
Generación de Líneas Transgénicas 32
Líneas transgénicas *pLSM5::LSM5 sad1/lsm5* 32
Líneas transgénicas con reporteros bioluminiscentes 33
Análisis Fisiológicos 33
Medición del largo del hipocotilo 33
Medición del tiempo a floración 34
Análisis Moleculares 34
Genotipifcación de mutantes 34
Verificación de la expresión nula 35
Análisis de la expresión por PCR en tiempo real (qPCR) 35
Detección de isoformas de *splicing* por RT-PCR 36

Preparación de la biblioteca del ADNc para la secuenciación del transcriptoma (*RNA-seq*) 36
Análisis Bioinformáticos 37
Procesamiento de las lecturas de la secuenciación de ARN 37
Expresión diferencial de genes 37
Categorías funcionales enriquecidas 38
Análisis del *Splicing* alternativo 38
Análisis del Reloj Circadiano en Células Humanas *U2OS* 39
Cultivo celular y transfecciones reversas 39
Ensayo de bioluminiscencia en células U2OS y análisis de datos. 40
CAPÍTULO I 41
FACTORES DE SPLICING CON REGULACIÓN CIRCADIANA. 41
Introducción 42
El transcriptoma circadiano de *Arabidopsis thaliana* 42
Factores y reguladores del *splicing* en *Arabidopsis thaliana* 43
Resultados 45
Identificación de genes relacionados al *splicing* con regulación circadiana. 45
Caracterización circadiana de mutantes para genes relacionados al *splicing* 47
Conclusiones 50
CAPÍTULO II 51
LOS GENES LSMS Y SU ROL EN LOS RITMOS CIRCADIANOS EN PLANTAS Y MAMÍFEROS. 51
Introducción 52
La familia de proteínas Sm y Sm-Like (LSM) 52
Las proteínas LSM en *Arabidopsis thaliana* 54
Mecanismos de los ritmos circadianos en mamíferos. 55
Resultados 57
Caracterización de procesos biológicos controlados por el reloj circadiano en la mutante *sad1/lsm5.* 57
Análisis de los ritmos circadianos en la mutante *lsm4-1* de *Arabidopsis thaliana*. 60
Analisis de los ritmos circadianos en genes *LSM* de mamífero. 62
Conclusiones 66

CAPITULO III **68**

ANÁLISIS GLOBAL DEL TRANSCRIPTOMA DE LAS MUTANTES SAD1/LSM5 Y LSM4-1 ..... **68**

Introducción 69

LSM5 y el *splicing* alternativo 69

Resultados 70

Análisis de la expresión global en las mutantes *sad1/lsm5 y lsm4-1*. . 70

Análisis del *splicing* alternativo en las mutantes *sad1/lsm5 y lsm4-1* . 72

Análisis de eventos conocidos de *splicing* alternativo para genes del reloj en las mutantes *sad1/lsm5 y lsm4-1.* 74

Conclusiones 77

CAPÍTULO IV **79**

ESTUDIOS PRELIMINARES DEL ROL DE GENES INVOLUCRADOS EN EL DECAIMIENTO DE ARNM SOBRE LOS RITMOS CIRCADIANOS. **79**

Introducción 80

El complejo LSM1-7 y su rol en decaimiento de ARNm 80

Decaimiento de ARNm en plantas 81

El complejo LSM1-7 y su rol en PBs en plantas 84

Resultados 86

Análisis de mutantes de genes de la vía de decaimiento 5'-3' 86

Análisis de la expresión de genes del oscilador central en la mutante *xrn4-3* 91

Conclusiones 93

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES **95**

REFERENCIAS **101**

APENDICE **111**

Tabla 1 111

Tabla 2 114

El rol de los genes *LSM* en la regulación de los ritmos circadianos

RESUMEN

Los relojes circadianos son mecanismos auto-regulatorios endógenos que controlan la periodicidad de múltiples procesos biológicos. Éstos proporcionan a los organismos una ventaja adaptativa que permite sincronizar distintos eventos fisiológicos y del desarrollo al momento más adecuado del día. La regulación del reloj circadiano ocurre principalmente mediante circuitos de retroalimentación transcripcional. Sin embargo, estudios recientes muestran que se requiere de mecanismos post-transcripcionales para el correcto funcionamiento del reloj. Uno de estos mecanismos es el *splicing* alternativo, mediante el cual se producen múltiples variantes de ARNm a partir de un único gen.

En esta tesis se caracterizó el comportamiento circadiano de mutantes de factores de *splicing* cuyos transcriptos están regulados por el reloj. Se encontró que mutaciones en los genes *LSM5* y *LSM4*, que codifican para componentes del complejo spliceosomal *U6 snRNP*, alteran el período circadiano. Un análisis global del transcriptoma de ambas mutantes reveló enriquecimiento en genes implicados en la regulación de la transcripción y respuestas de estrés, así como alteraciones en el *splicing* alternativo de un subconjunto de genes, incluyendo genes centrales y de vías de salida del reloj.

Los genes *LSM* también forman parte de otro complejo involucrado en el decaimiento del ARNm. Dado que *LSM4* y *LSM5* son parte de los dos complejos nos preguntamos si parte del efecto circadiano observado era debido a su rol sobre el decaimiento de ARNm. Se encontró que mutaciones en varios genes involucrados en decaimiento de ARNm también generan alteraciones en los ritmos circadianos.

Estos resultados apoyan la idea de que ciertos genes *LSM* desempeñan un rol en los ritmos circadianos, mediante la regulación del *splicing* alternativo y del decaimiento de ARNm, lo cual contribuye a la sincronización de los ritmos biológicos con cambios ambientales.

Palabras Clave: *Arabidopsis,* ritmos circadianos*, LSM5, LSM4, splicing* alternativo, *U6snRNP,* decaimiento de ARNm.

Role for *LSM* genes in the regulation of circadian rhythms

ABTRACT

Circadian clocks are endogenous self-regulatory mechanisms that control the periodicity of multiple biological processes. These provide organisms with an adaptive advantage that allows them to synchronize different physiological and developmental events to the most appropriate time of day. The regulation of the biological clock occurs mainly through transcriptional feedback loops. However, recent studies show that post-transcriptional mechanisms are required for proper functioning of the clock. One of these mechanisms is alternative *splicing*, a process through which multiple mRNA variants are produced from a single gene.

In this thesis we characterized the circadian behavior of *splicing* factors mutants, affected in genes whose transcripts are regulated by the clock. We found that mutations in *LSM5* and *LSM4* genes, encoding *U6 snRNP* spliceosomal complex components, change the circadian period. Genome-wide transcriptome analysis of both mutants revealed enrichment in genes involved in transcriptional regulation and stress responses, as well as changes in alternative *splicing* of a subset of genes, including central and output clock genes.

The *LSM* genes are also part of another complex involved in mRNA decay. Since LSM5 and LSM4 are part of both complexes, we wondered if part of the circadian effect observed in the mutants was due to their role on mRNA decay. We found that mutations in other genes involved in mRNA decay also generate changes in circadian rhythms.

These findings support the idea that some *LSM* genes play a role in circadian rhythms through the regulation of alternative *splicing* and mRNA decay, which helps synchronize biological rhythms with environmental changes.

Key Words: *Arabidopsis, circadian rhythms, LSM, alternative splicing, U6snRNP, decay of mRNA.*

FINANCIAMIENTO y PUBLICACIONES

La presente tesis de doctorado la realice con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). El laboratorio del Dr. Marcelo J. Yanovsky, donde se realizó esta tesis, recibió financiamiento a lo largo de esos años de las siguientes instituciones, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y Howard Hughes Medical Institute.

Los hallazgos que se describen en los capítulos I al capítulo III se encuentran en las siguientes publicaciones:

- Perez-Santangelo, S., Schlaen, R. G., and Yanovsky, M. J. (2013). **Genomic analysis reveals novel connections between alternative splicing and circadian regulatory networks**. Brief. Funct. Genomics 12, 13–24.
- Perez-Santangelo, S., Mancini, E., Francey, L. J., Schlaen, R. G., Chernomoretz, A., Hogenesch, J. B., et al. (2014). **Role for LSM genes in the regulation of circadian rhythms**. Proc. Natl. Acad. Sci. 111, 15166–15171.

También durante la realización de esta tesis, colaboré en un trabajo de otro de los integrantes del laboratorio, como resultado participé de la siguiente publicación:

- Schlaen, R. G., Mancini, E., Sanchez, S. E., Perez-Santángelo, S., Rugnone, M. L., Simpson, C. G., et al. (2015**). The spliceosome assembly factor GEMIN2 attenuates the effects of temperature on alternative splicing and circadian rhythms**. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 9382–7.

Lo descripto en el capítulo IV será parte de un trabajo en preparación.

AGRADECIMIENTOS

El doctorado implica más que la mesada y los resultados, es una herramienta que permite aprender a lidiar y resolver distintos problemas que se presentan. Pero este camino puede ser muy difícil si no se está rodeado de gente que te alienta y contiene. Es por eso que quiero agradecer:

Primero que nada a Marcelo, mi director de tesis, que desde un principio confío en mí y me dio palabras de aliento en cada paso del doctorado. Por ser una excelente persona, que se preocupa no solo de los aspectos profesionales sino también de los personales. Gracias Marce por hacer del doctorado algo placentero.

A mi comité de seguimiento: Graciela, Pablo y Mariana, que en cada reunión sus críticas y comentarios me alentaron y ayudaron para que esta investigación concluyera. Gracias por guiarme en este camino.

A los chicos del lab:

A Gustavo, que en un comienzo me introdujo en las formas en que se trabaja en el labo. Que me acompañó, junto con Steve, a realizar el protocolo más estresante: la generación de bibliotecas de ARN. Gracias Gus por las largas y entretenidas charlas filosóficas.

A Esteban, que me enseñó, y me sigue enseñando, a trabajar con las plantas. Que junto con Gus formamos la comunidad de la placa, la cual se ocupó de llevar sana y salva la biblioteca de ARN a Rosario en su auto. Gracias Steve por tu compañía estos 5 años.

A Andrés, que siempre me alegra con su buena energía. Que me escucha y se preocupa tanto por las cosas del día a día del labo, así como las cosas buenas y malas de la vida. Con el cual también realice una biblioteca de ARN, pero ya no tan estresante. Gracias Andrew por tu buena predisposición siempre y por tus mates bien calientes.

A Julieta, que siempre está ahí para escucharme y darme consejos profesionales. Que me alienta cuando me enojo ya sea con cosas del labo como con cosas generales de la vida. Gracias Ju por guiarme.

A María José, mí por siempre pequeña becaria, que confió en mí para que la guíe en su tesina de licenciatura. Gracias Majus por las charlas, las risas y el tiempo compartido.

A Daniel, mi segundo pequeño becario, que recién se introduce en este mundo de la ciencia con mucho entusiasmo y dedicación. Gracias Dani por hacer más entretenido el fin del doctorado.

A Mariana, con la cual he tenido muchas charlas de diferentes tópicos en los pasillos del tercer piso. Gracias Marian por hacer más divertidas las horas en el flujo.

A Diego del droguero, con el cual hablamos de los viajes realizados y todos los que nos gustaría hacer. Gracias Die por hacer de mis viajes al subsuelo, viajes a remotas partes del mundo.

A Martina, que tiene una pasión por lo que hace y te lo transmite. Que me ha ayudado en miles de formas, con consejos profesionales, con palabras de aliento y acompañándome en el camino. Gracias Marti por tu cariño.

Y a todos los plantolocos, Joaco, Caro, Estefi, Gusti, Lu, Claudio, Sofi, Ceci y Majo I, gracias por la buena onda de cada día.

A mis amigos,

A Ana Depetris, que cuando me conoció no le caí bien, pero luego se convirtió en una compañera inseparable. Con ella compartimos cursadas, mateadas, salidas y charlas infinitas. Durante el doctorado estuvo presente con consejos y dándome fuerza en todo el camino, ya sea cuando estaba al final del pasillo, como a 11000 kms. Gracias Anne por la hermosa amistad que tenemos.

A Josefina, que desde un primer momento casi sin conocerme, se ofreció a ayudarme en mi viaje a New Zealand. Que sabe exactamente lo que quiere y hace todo lo que se propone. Gracias Jo por ser un ejemplo.

A Agustina, con al cual tenemos profundas charlas tanto de tópicos científicos como de familia. Gracias Agus por todos tus consejos.

A Flor Molinas, con la cual disfrutamos de los bailes en todas las fiestas. Gracias Moli por todos los reggaetones compartidos.

A Flor Ferrero, con la cual compartí mis primeros pasos por la ciencia. Gracias Flor por el aguante y la compañía allá por los pasillos del segundo de la FCEN.

A Laila, que en la era de los *whatapps*, mensajitos y *mails*, prefiere pasar por tu casa o salir a tomar una cerveza para charlar cara a cara. Gracias Lai por la compañía.

Y a todas las "genéticas" Gaby, Lu, Marian y Sol, que llenan mi casilla de *mail* y teléfono con largas cadenas de temas importantes, boludeces y locuras. Gracias a todas por estar ahí en los momentos felices y en los tristes.

A Albina, amiga de las de hierro. Que siempre anda con nuevas ideas y proyectos. Gracias Al por siempre estar ahí.

A Victoria, que siempre tiene la frase que te hace dar cuenta por donde sigue el camino. Gracias Vi por el cariño que transmitís.

A Leticia, con la cual compartimos los caminos del yoga y la ciencia. Gracias Letus por las palabras de aliento que me empujaron a llegar al final.

A Natalia M.C., quien más allá de estar siempre de viaje, está siempre presente. Gracias Nanu por las skypeadas.

A Natalia R, amiga inicialmente por propiedad transitiva. Con la cual podes hablar hoy y luego 2 años después, y es como si el tiempo no hubiera pasado. Gracias Natucha por tu bella locura.

Y a todas las personas que pasaron en estos 10 años de vida académica, que influyeron de distintas maneras en este camino. Gracias Alberto K, todos los chicos del ARK's Lab, Lean Q, Dai, Nati A, Beck, Sabri S, Mati R y Andrea D.

A mi familia,

A Agus y Mar, mis hermanitos, porque más allá de las idas y venidas, siempre estamos para los momentos importantes. Los quiero.

A mi madre, por estar pendiente y preocuparse por todos los eventos pequeños y grandes de la vida.

A mis Tíos Roxana y Sergio y mis primitos, Wan y Pato, por la hermosa tradición Navideña.

A Ser, a quien conocí 13 años atrás en una de las primera materia de la carrera, IBMC. Con el que llevamos casados 7 años y tenemos un hermoso hijo. No me va alcanzar todo el papel del mundo para agradecerte todo lo que haces por mí y por nuestra familia. Gracias bello por tus palabras de aliento constantes, por tus mate en la cama todos los días, por tu paciencia, por tu amor, por escucharme, por guiarme y por sobre todo, por ser el padre más amoroso y dulce que un hijo puede pedir. Y Gracias particularmente por leer y re leer la tesis, por darme el tiempo para escribirla y por acompañarme en las noches de correcciones. Te amo infinito.

Y por último, gracias a la personita más bella del mundo, el ser que me da fuerza, me guía y me enseña todos los días. Nehu, sos lo más lindo que nos pasó a papá y a mí. Te amamos con locura.

A mi pequeño Nehui

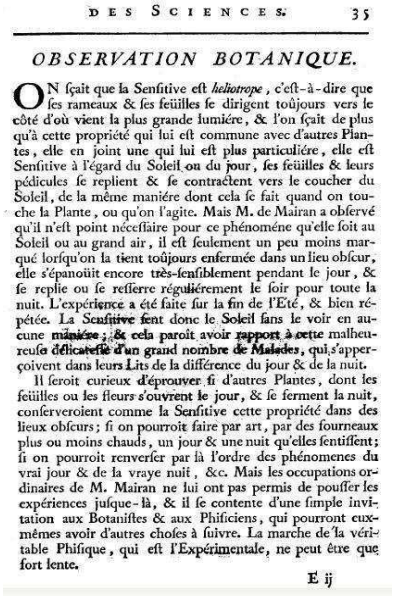
Introducción General

Aspectos Generales de los Ritmos Circadianos

Historia de los ritmos circadianos

En el año 1729, el astrónomo francés Jean Jacques d'Ortous de Mairan inició, con un informe de una página, el acercamiento experimental al estudio de los ritmos biológicos endógenos (*de Mairan 1729*) (Fig. 1A). El experimento consistió en colocar una planta en oscuridad continua en un armario y observarla a lo largo del tiempo. Para ello utilizó la planta *Mimosa púdica* que ya se sabía que cerraba sus hojas por la noche y las re-abría durante el día. Lo que observó fue que las hojas de la planta continuaban abriéndose durante el día subjetivo, aún en ausencia de luz (Fig. 1B). Es así como este experimento se convirtió en la primera evidencia de la persistencia de los ritmos endógenos en ausencia de señales ambientales externas. Sin embargo, en verdad, este experimento sólo descartó la participación de la luz, pero no de otros factores ambientales (*Somers 1999*).

A



DES SCIENCES. 35

OBSERVATION BOTANIQUE.

ON ſçait que la Senſitive eſt *heliotrope*, c'eſt-à-dire que ſes rameaux & ſes feüilles ſe dirigent toûjours vers le côté d'où vient la plus grande lumiére, & l'on ſçait de plus qu'à cette propriété qui lui eſt commune avec d'autres Plantes, elle en joint une qui lui eſt plus particuliére, elle eſt Senſitive à l'égard du Soleil ou du jour, ſes feüilles & leurs pédicules ſe replient & ſe contractent vers le coucher du Soleil, de la même maniére dont cela ſe fait quand on touche la Plante, ou qu'on l'agite. Mais M. de Mairan a obſervé qu'il n'eſt point néceſſaire pour ce phénoméne qu'elle ſoit au Soleil ou au grand air, il eſt ſeulement un peu moins marqué lorſqu'on la tient toûjours enfermée dans un lieu obſcur, elle s'épanoüit encore très-ſenſiblement pendant le jour, & ſe replie ou ſe reſſerre régulièrement le ſoir pour toute la nuit. L'expérience a été faite ſur la fin de l'Eté, & bien répétée. La Senſitive ſent donc le Soleil ſans le voir en aucune maniére ; & cela paroît avoir rapport à cette malheureuſe délicateſſe d'un grand nombre de Malades, qui s'apperçoivent dans leurs Lits de la différence du jour & de la nuit.

Il ſeroit curieux d'éprouver ſi d'autres Plantes, dont les feüilles ou les fleurs s'ouvrent le jour, & ſe ferment la nuit, conſerveroient comme la Senſitive cette propriété dans des lieux obſcurs ; ſi on pourroit faire par art, par des fourneaux plus ou moins chauds, un jour & une nuit qu'elles ſentiſſent ; ſi on pourroit renverſer par là l'ordre des phénomenes du vrai jour & de la vraye nuit, &c. Mais les occupations ordinaires de M. Mairan ne lui ont pas permis de pouſſer les expériences juſque-là, & il ſe contente d'une ſimple invitation aux Botaniſtes & aux Phiſiciens, qui pourront eux-mêmes avoir d'autres choſes à ſuivre. La marche de la véritable Phiſique, qui eſt l'Expérimentale, ne peut être que fort lente.

E ij

B

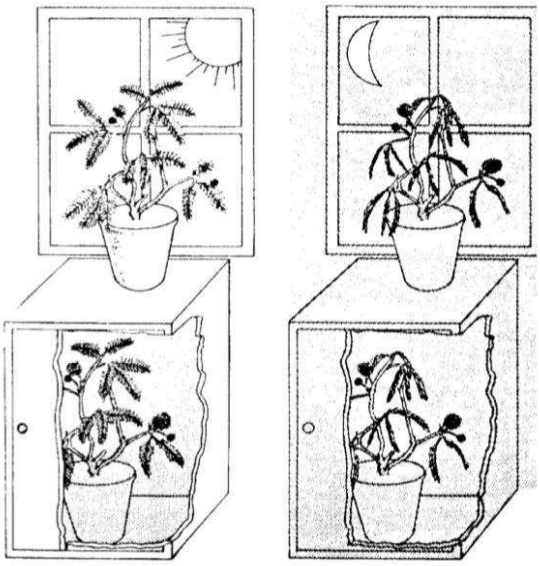


Fig. 1. Primer experimento circadiano. A) Reporte del astrónomo *De Mairan* publicado en 1729 describiendo el primer experimento circadiano realizado sobre la planta *mimosa púdica*. B) Diagrama del diseño experimental. Las plantas fueron estudiadas bajo condiciones de luz/oscuridad, donde se observó que sus hojas se cerraban durante la noche y se re-abrían durante el día. Luego fueron colocadas en un armario, en condiciones de oscuridad continua, y se observó que las plantas se comportaban de la misma manera, abriendo sus hojas durante el día subjetivo y cerrándolas durante la noche subjetiva (*de Mairan 1729*).

En 1759, 30 años después de *De Mairan*, dos autores demostraron la persistencia de los ritmos diarios del movimiento de hojas en condiciones de temperatura constante (*Zinn 1759*; *Duhamel Du Monceau 1759*). Pero no fue hasta varias décadas más tardes que se logró mediante experimentos fisiológicos demostrar el carácter endógeno del reloj biológico en plantas (*De Candolle 1832*). Luego, tomó casi un siglo encontrar similares evidencias para animales (*Richter 1922*) y 55 años más para humanos en particular (*Wever 1979*).

En 1932, Erwin Bünning, un biólogo alemán, identificó dos variantes del poroto común, que diferían en el largo de su período endógeno por 3 horas. Cuando las cruzó entre sí, la progenie exhibía períodos que oscilaban entre los valores extremos de los parentales, sugiriendo que esta propiedad de los ritmos circadianos era un rasgo heredable determinado genéticamente (*Bünning 1932*). Es así que se llegó a la conclusión de que los ritmos no podían ser atribuidos a ninguna señal ambiental sino que provenían del propio organismo (*Roenneberg and Merrow 2005*).

Características de los ritmos circadianos

En 1960, Colin Pittendrigh, un biólogo inglés, enumeró las características de los ritmos circadianos en 16 generalizaciones (*Pittendrigh 1960*). Entre ellas se pueden destacar tres principales. La primera es que son endógenamente generados y autosuficientes, por lo que persisten bajo condiciones ambientales constantes, típicamente luz y temperatura. Bajo estas condiciones controladas, el organismo carece de señales temporales externas y se observa un período, en libre curso, de aproximadamente 24 horas. Esta característica definitoria inspiró a Franz Halberg en 1959 para tomar el término circadiano, de las palabras en latín "circa" (cerca) y "die" (día). Una segunda característica de los ritmos circadianos es que señales ambientales como la luz/oscuridad o ciclos de temperatura pueden restablecer o "entrenar" la fase del ritmo para que coincida con el ciclo ambiental. Pero, aunque el reloj puede ser entrenado por los cambios de temperatura, una tercera característica es que el período circadiano casi no varía frente a un amplio rango de temperaturas, un fenómeno conocido como compensación térmica (*McClung 2006*).

Los ritmos circadianos toman forma de ondas sinusoidales, que pueden ser descriptas por los términos matemáticos período, fase y amplitud (Fig. 2). El período se define como el tiempo para completar un ciclo. La fase se entiende como el momento del día en el que la respuesta en estudio presenta su valor máximo. La fase a menudo se define en tiempo de *zeitgeber* (ZT) (del alemán, dador de tiempo). Cualquier estímulo que da información del tiempo al reloj es un *zeitgeber*. Por último, la amplitud del ritmo se define como la mitad de la distancia entre el valor máximo y el valor mínimo que presenta dicha respuesta (McClung 2006).

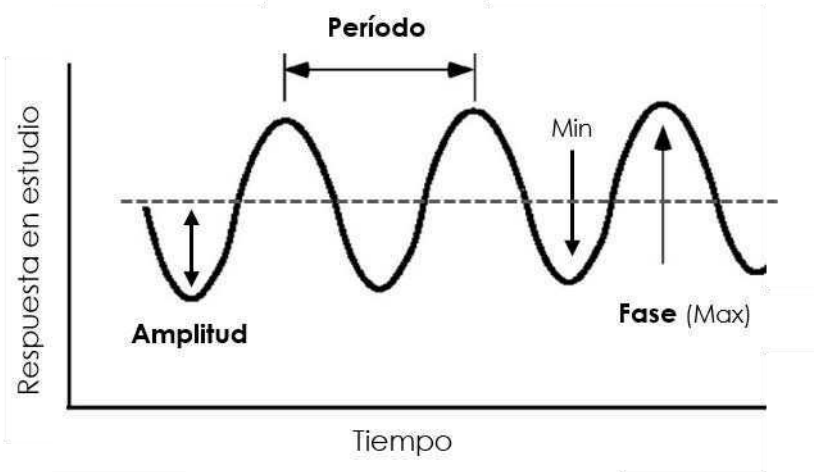


Fig. 2. Términos utilizados para describir un ritmo circadiano. Los ritmos circadianos pueden ser descriptos por los términos matemáticos periodo, fase y amplitud. El período es el tiempo que toma completar un ciclo, la fase se entiende como el momento del día en el que la respuesta en estudio presenta su valor máximo y la amplitud es la mitad de la distancia entre el valor máximo y el valor mínimo que presenta dicha respuesta. Figura adaptada de *(McClung, 2006)*.

Mecanismos de los Ritmos Circadianos

Modelo clásico del reloj circadiano

El reloj circadiano es un mecanismo celular generalizado que controla diversas funciones rítmicas en casi todos los organismos. El modelo conceptual clásico del reloj, que da lugar a estos ritmos circadianos, está conformado por tres componentes básicos, las vías de entrada, el oscilador y las vías de salida (Fig. 3). El oscilador es el marcapasos del sistema y es responsable de generar el ritmo circadiano. Sin embargo, para ser biológicamente significativo, la fase del ritmo debe estar sincronizada con el mundo exterior. Así, las vías de entrada traducen señales del tiempo del ambiente al oscilador. Estas señales se

presentan más comúnmente en las transiciones de luz/oscuridad o cambios de temperatura. Para completar el modelo del reloj circadiano se encuentran las vías de salida, que constituyen un vínculo entre el oscilador y los distintos procesos biológicos cuyos ritmos controla (*Barak et al. 2000*).

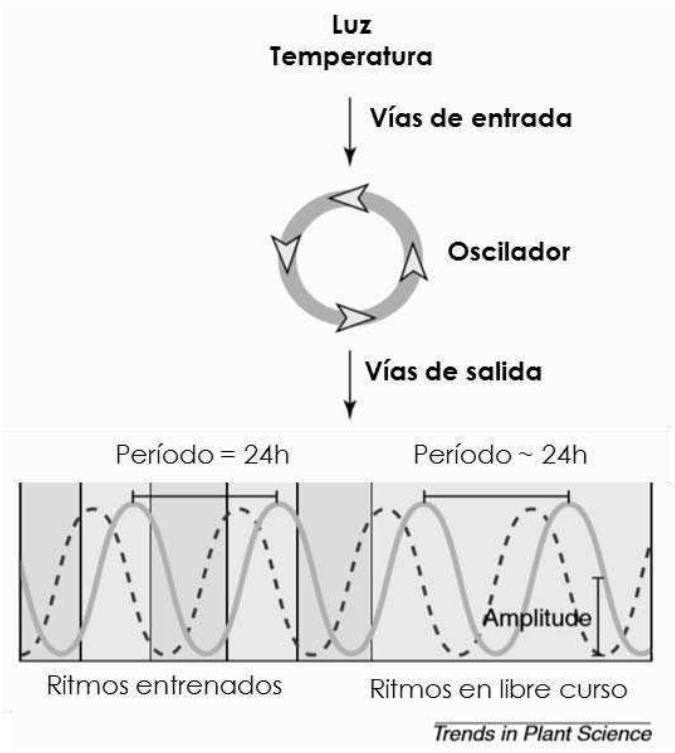


Fig. 3. Componentes de un sistema circadiano generalizado.
Este modelo simple incluye una vía de entrada (luz o temperatura) a un oscilador circadiano. El oscilador genera señales que son traducidas por medio de vías de salida para producir ritmos circadianos. Las vías de salida se representan como dos ritmos idealizados (línea continua y punteada) con diferentes fases. En condiciones de luz/oscuridad, el período del oscilador coincide con el período de los ciclos de entrenamiento (Ritmos entrenados). Bajo condiciones constantes, el reloj oscila con un período endógeno cercano pero no exactamente 24h (Ritmos en libre curso). Figura adaptada de *(Barak et al., 2000)*

En plantas, el reloj circadiano controla diversos procesos biológicos, desde la apertura de estomas y movimiento de hojas hasta la expresión génica y fosforilación de proteínas. Por ejemplo, el aumento antes del amanecer del gen CAB (gen asociado con la fotosíntesis), indica un papel para el reloj en la coordinación del metabolismo para maximizar el rendimiento fotosintético. También, se ha demostrado que las concentraciones citosólicas de calcio libre oscilan con un ritmo circadiano. Teniendo en cuenta la importancia del calcio como segundo mensajero y cofactor para muchas enzimas, este podría ser un medio por el cual el reloj regula una variedad de procesos celulares. En la planta *Kalanchoe fedtschenkoi* se observó actividad circadiana de una quinasa que fosforila la fosfoenol-piruvato carboxilasa. En un nivel superior de organización, el reloj controla el movimiento de los cloroplastos, la apertura estomática, la elongación del hipocótilo, el movimiento de cotiledones y hojas, la apertura de pétalos y el tiempo de floración (Fig. 4) (*Barak et al. 2000*).

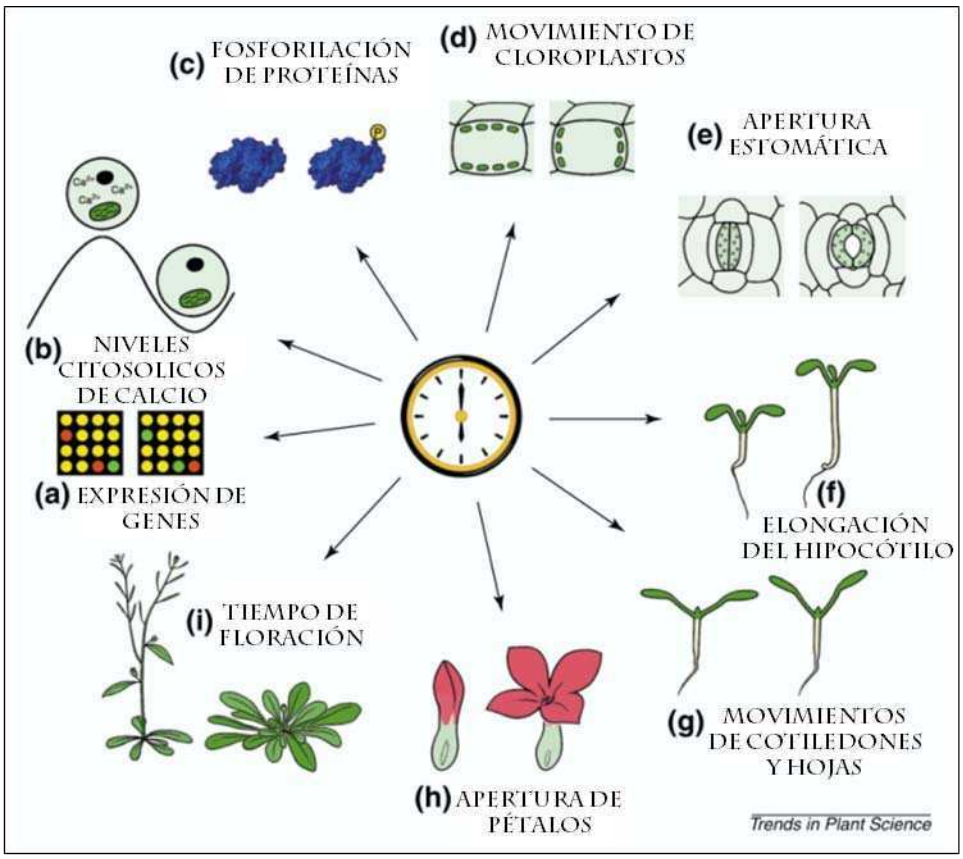


Fig. 4. Procesos biológicos controlados por el reloj circadiano de plantas. (a) Expresión de genes; (b) Niveles citosólicos de calcio; (c) Fosforilación de algunas proteínas. En un nivel superior de organización, (d) Movimiento de cloroplastos, (e) Apertura estomática, (f) Elongación del hipocótilo, (g) Movimientos de cotiledones y hojas, (h) Apertura de pétalos y (i) El tiempo de floración. Adaptado de (*Barak et al. 2000*)

Circuitos de retroalimentación transcripcional

En *Arabidopsis thaliana (L.) Heynh*, los estudios genéticos y bioquímicos fueron fundamentales para comprender la arquitectura molecular del reloj en un modelo vegetal. En la actualidad, se identificaron más de 20 componentes del o relacionados al reloj (*Hsu and Harmer 2014*). En las plantas, como en otros eucariotas, el modelo original del reloj estaba compuesto de circuitos de retro-alimentación positivos y negativos entre tres componentes centrales, dos factores de transcripción con dominio *MYB, CIRCADIAN ASSOCIATED 1 (CCA1)* y *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY),* y un miembro de la familia de *PSEUDORESPONSE REGULATORS (PRR): TIMING OF CAB2 EXPRESSION 1 (TOC1)* (*Alabadí et al. 2001*). Estos tres componentes fueron considerados el centro del oscilador ya que la pérdida de función de cualquiera de estos tres genes resulta en un reloj de período corto y la sobreexpresión confiere arritmicidad en múltiples vías de salida.

El circuito comienza cuando *CCA1* y *LHY* reprimen la expresión directa de *TOC1*, uniéndose específicamente a un elemento en *cis* (en la secuencia de ADN) dentro de su promotor. Esta secuencia es conocida como el elemento de la noche (EE, del inglés *Evening Element*), un motivo que se encuentra a menudo en promotores de genes regulados por el reloj que se expresan por la noche (*Harmer and Kay 2005*). A su vez, se había propuesto que *TOC1* inducia la expresión de *CCA1* y *LHY* a través de un mecanismo desconocido. Este se presentó como un modelo transcripcional simple, basado en datos genéticos y de modelado (*Locke et al. 2005*). Sin embargo, con la falta de actividad bioquímica para *TOC1*, el mecanismo transcripcional que controla al oscilador central era desconocido.

Fue en el año 2012 que finalmente se pudo caracterizar la función bioquímica y molecular de *TOC1*. Se demostró que *TOC1* es un represor transcripcional de *CCA1* y *LHY*, que se une directamente al ADN de estos dos genes y reprime su expresión (*Gendron et al. 2012*; *Huang et al. 2012*; *Pokhilko et al. 2012*). De esta manera el modelo central *CCA1/LHY-TOC1* se actualizó a un modelo basado exclusivamente en la represión transcripcional (*Pokhilko et al. 2012*).

El circuito central *CCA1/LHY-TOC1* está interconectado, a su vez, con un circuito que esta preferencialmente activo por la mañana y con otro circuito que está preferencialmente activo por la noche. A través del circuito de la mañana, *LHY y CCA1* activan la expresión de los genes de la familia de *PSEUDORESPONSE REGULATORS*, *PRR9* y *PRR7* (*Farré et al. 2005*) quienes a su vez reprimen la expresión de *CCA1 y LHY*. La expresión de *PRR7 y PRR9* se apaga durante la noche a través del complejo de la noche (EC del inglés, *Evening Comple*x) que consiste del factor de transcripción tipo MYB, *LUX ARRHYTHMO (LUX)* y las proteínas *EARLY FLOWERING 3 (EFL3) y ELF4* (*Nusinow et al. 2011*). Como resultado se re-activa la transcripción de *CCA1* y *LHY* (Fig. 5).

Así como *CCA1* y *LHY*, hay un grupo de factores de transcripción con dominio *MYB* que muestran regulación circadiana de su expresión; estos son los genes *REVEILLE (RVE)* (*Rawat et al. 2011*). Tres de ellos *RVE1*, *RVE2* (también llamado *CIRCADIAN 1/CIR1*) y *RVE7* (también llamado *EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE1/EPR1*), principalmente desempeñan funciones en las vías de salida

del reloj (*Kuno et al. 2003*; *Zhang et al. 2007*; *Rawat et al. 2009*). Sin embargo, *RVE8* (también llamado *LHY-CCA1-LIKE5 / LCL5*) parece tener una función más central en el oscilador del reloj. *RVE8* se une al promotor de *TOC1* y al EE del promotor de *PRR5* para activar su transcripción (*Farinas and Mas 2011*; *Rawat et al. 2011*; *Hsu et al. 2013*). Los cuatro *RVE* restantes (*RVE3, 4, 5, y 6*) también se unen al EE de *PRR5* (*Gong et al. 2008*), aumentando la posibilidad de redundancia funcional entre ellos (*McClung 2014*).

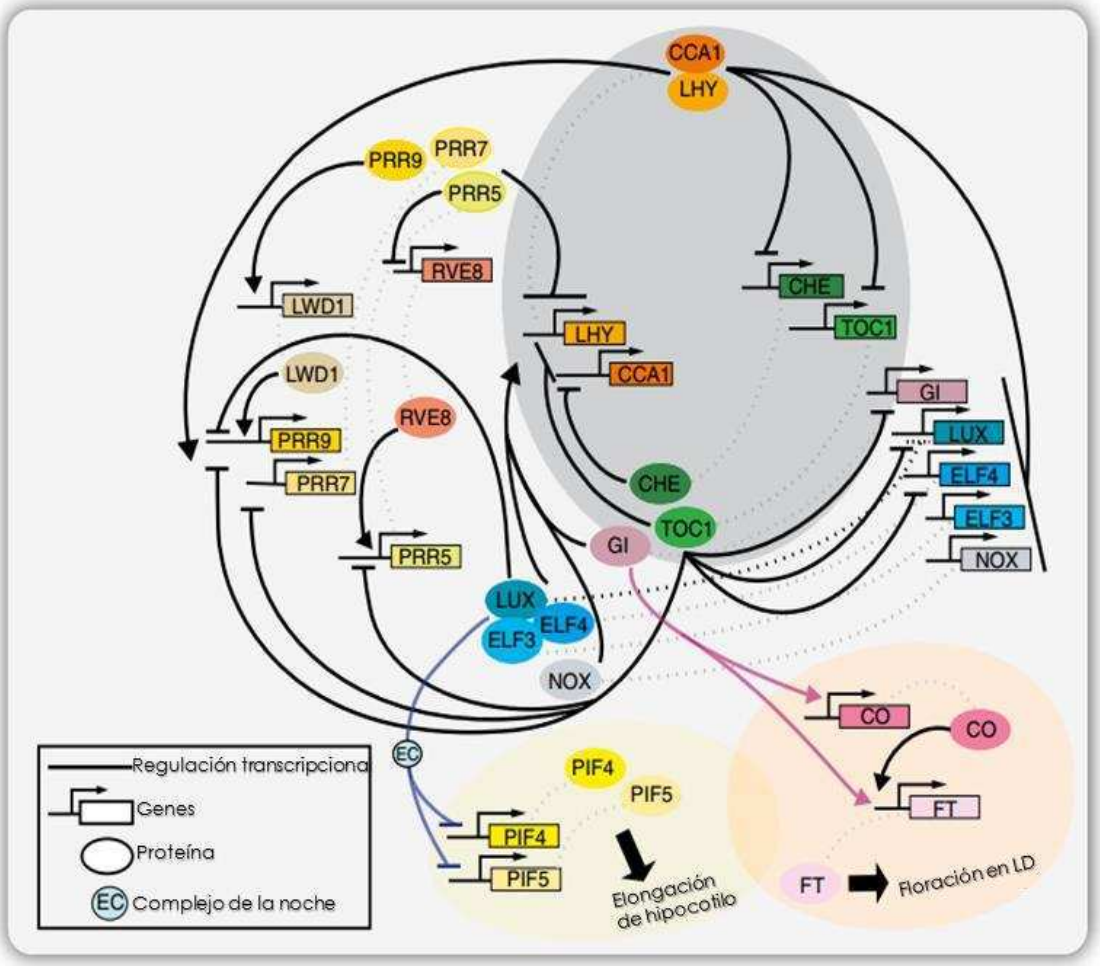


Fig. 5. Modelo molecular del reloj circadiano de *Arabidopsis thaliana*. El núcleo del oscilador consiste en *CCA1, LHY* y *TOC1*. Otros componentes expresados durante el día están interconectados con este núcleo formando múltiples circuitos de retroalimentación. Para simplificar, algunos componentes que afectan el funcionamiento del reloj fueron omitidos en esta figura. Adicionalmente, se muestran algunas conexiones mecanisticas directas entre componentes del reloj y moduladores de algunos procesos fisiológicos, como el crecimiento del hipocotilo y la floración fotoperiódica. Las flechas representan activación transcripcional y las líneas horizontales representan represión transcripcional. Las líneas de puntos vinculan a la proteína con su gen. LD= luz/oscuridad. Figura adaptada de *(Nagel and Kay, 2012)*.

Para la identificación de componentes del reloj se han utilizado enfoques de genética directa y reversa. En este tipo de enfoques se utilizan comúnmente ciclos de 12 horas luz/12 horas oscuridad para entrenar al reloj, y luego se colocan las plantas en libre curso en luz continua para observar la función del reloj endógeno. Se utilizan promotores de genes del reloj fusionados al gen de la luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis* (Luc), se monitorean ritmos por varios días, y se observa el fenotipo basado en los ritmos de bioluminiscencia observada (principalmente el período de estos ritmos analizados). En la Figura 6 se observan las distintas alteraciones en la periodicidad del reloj, período largo, corto o arrítmico, para perdida de función o sobre expresión de diferentes genes candidatos del reloj central.

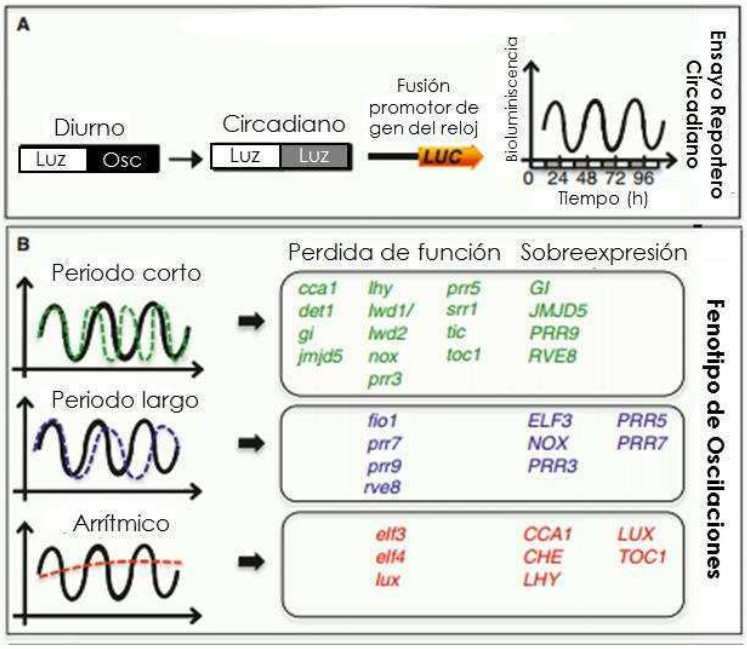


Fig. 6 Enfoques de genética directa y reversa en la búsqueda de genes del oscilador y de vías de salida. A) Se utiliza el gen de la luciferasa *Photinus pyralis* (Luc) rio abajo de promotores de genes del reloj. Se entrena en luz-oscuridad y luego se monitorea el periodo en luz continua por varios días. B) Efecto de pérdida de función o sobre expresión de genes candidatos involucrados en la regulación del reloj circadiano. Posibles alteraciones en la periodicidad del reloj son periodo corto, periodo largo o arritmicidad. Las líneas negras representan las oscilaciones circadianas normales, las líneas punteadas representan las posibles alteraciones. Además, las alteraciones en el reloj pueden reflejarse como cambios en la fase y la amplitud. Figura adaptada de *(Nagel and Kay, 2012)*.

La regulación transcripcional es considerada el mecanismo primordial en la expresión rítmica de genes, tanto de los genes centrales del reloj, así como de los genes de vías de salida, pero no es el único nivel de regulación. Mecanismos post-transcripcionales están tomando protagonismo en la regulación de los ritmos circadianos (*Nolte and Staiger 2015*; *Romanowski and Yanovsky 2015*).

Mecanismos post-transcripcionales: El *splicing*

Al comienzo de la transcripción, se recluta a la enzima ARN polimerasa al promotor del gen por factores de transcripción. Una vez que este proceso inicia, el ARNm precursor (pre-ARNm) entra en una serie de pasos hasta su maduración (ARNm). Las moléculas de pre-ARNm están compuestas de una serie de segmentos continuos, conocidos como intrones y exones. Los intrones deben ser removidos del pre-ARNm para producir un ARNm funcional a través de un proceso conocido como *splicing*. En particular, los exones pueden unirse de distintas maneras y los intrones retenerse selectivamente a través del *splicing* alternativo (Fig. 7).

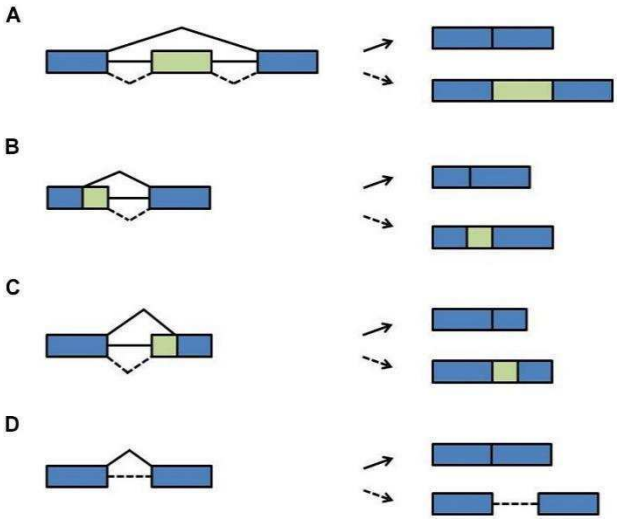


Fig. 7. Tipos de eventos de *splicing* alternativo. (A) Exclusión de exón (EE), (B) selección alternativa del sitio de reconocimiento de splicing 5' (5'alt), (C) selección alternativa del sitio de reconocimiento de splicing 3' (3'alt), (D) retención de intrón (RI). Las cajas azules representan los exones constitutivos; las cajas verdes representan los exones alternativos; las líneas negras representan los intrones. Las líneas continuas marcan los eventos de *splicing* constitutivos. Las líneas puntuadas marcan los eventos de *splicing* alternativo. Figura de (*Nolte and Staiger 2015*)

Es así como, diferentes usos de los sitios de *splicing* pueden dar lugar a múltiples isoformas de ARNm a partir de un único pre-ARNm, lo cual aumenta enormemente la capacidad de codificación del genoma (*Graveley 2001*). El *splicing* alternativo regula diversos procesos biológicos mediante el control de los niveles de transcripción y/o la función de proteínas. Por ejemplo, el *splicing* alternativo puede generar isoformas de ARNm que contienen codones de terminación prematuros (PTC), que puede conducir a la degradación del ARNm a través de la vía de decaimiento NMD (*Kalyna et al. 2012*).También, el *splicing* alternativo en el 5' o 3' UTR pueden afectar la estabilidad del ARN a través de la inclusión o exclusión de sitio de unión a micro ARNs (*Salomonis et al. 2010*). Por último, dada la variación en los patrones de *splicing*, las proteínas correspondientes pueden estar compuestas de distintos dominios y por lo tanto tener diferentes funciones (*Nilsen and Graveley 2010*).

El *splicing* es llevado a cabo por un complejo conocido como spliceosoma, el cual está compuesto por pequeños ácidos ribonucleicos nucleares (snARNs) ricos en uridina, llamados, U1, U2, U4, U5 y U6 snARN, que forman pequeñas partículas ribonucleoproteicas nucleares (snRNPs) con un conjunto de proteínas específicas (*Wahl et al. 2009*). En plantas no ha sido posible realizar ensayos de *splicing in vitro*, generando una limitación en el estudio de los mecanismos involucrados en el reconocimiento de intrones y ensamblado del spliceosoma. Sin embargo, con la llegada de la era genómica y la posibilidad de secuenciación de todo el genoma, permitió la identificación de proteínas ortólogas y snARNs centrales del spliceosoma, sugiriendo que los principios fundamentales del procesamiento de intrones son aplicables también en plantas (*Wang and Brendel 2004*; *Barta et al. 2012*; *Koncz et al. 2012*).

Dos tipos de spliceosomas coexisten en la mayoría de los eucariotas: el spliceosoma dependiente de U2, que cataliza la remoción de intrones tipo U2 y el spliceosoma dependiente de U12, menos abundante, que está presente en algunos eucariotas y está involucrado en la remoción de intrones poco comunes del tipo U12.

La información proveniente del pre-ARNm que contribuye a la definición de un intrón es limitada. Ésta consta de una secuencia conservada en el sitio dador de *splicing* 5' (5'ss), en el sitio aceptor de *splicing* 3' (3'ss) y en el punto de ramificación. El punto de ramificación está típicamente ubicado a 18-40 nucleótidos río arriba del 3'ss y es seguido por un tracto de polipirimidinas (PPT). Existen también otros elementos en *cis* en el pre-ARNm, que se conocen como activadores (ESE e ISE, del inglés *Exonic / Intronic Splicing Enhancers*) y silenciadores (ESS e ISS, del inglés *Exonic / Intronic Splicing Silencers*) del *splicing*. Estas secuencias son típicamente cortas y modulan tanto el *splicing* constitutivo como alternativo, reclutando proteínas regulatorias que activan o reprimen el ensamblado del complejo spliceosomal (*Will and Lührmann 2011*).

El ensamblado del spliceosoma se produce por la interacción ordenada de los complejos snRNPs spliceosomales y numerosos factores de *splicing*. El primer complejo spliceosomal, U1 snRNP, es reclutado al 5'ss y otros factores no snRNPs como SF1 y U2AF interactúan con el punto de ramificación y el tracto de polipirimidinas, respectivamente. En el siguiente paso, el complejo U2 snRNP se

asocia establemente con el punto de ramificación, formando el complejo A (también llamado pre-spliceosoma). El complejo U4/U6.U5 tri-snRNP, es reclutado generando el complejo pre catalítico B. El spliceosoma se activa (complejo B^{act}) luego de la desestabilización de U1 y U4 snRNPs, dado por cambios en interacciones ARN-ARN y ARN-proteína. La subsiguiente activación catalizada por la DEAH-box ARN helicasa Prp2, genera el complejo B^{*}, que cataliza los dos primeros pasos de *splicing*. Esto produce el complejo C, que a su vez cataliza el segundo paso. El spliceosoma luego se disocia y, después de una remodelación adicional, los complejos snRNP liberados toman parte en rondas adicionales de *splicing* (Fig. 8) (*Will and Lührmann 2011*).

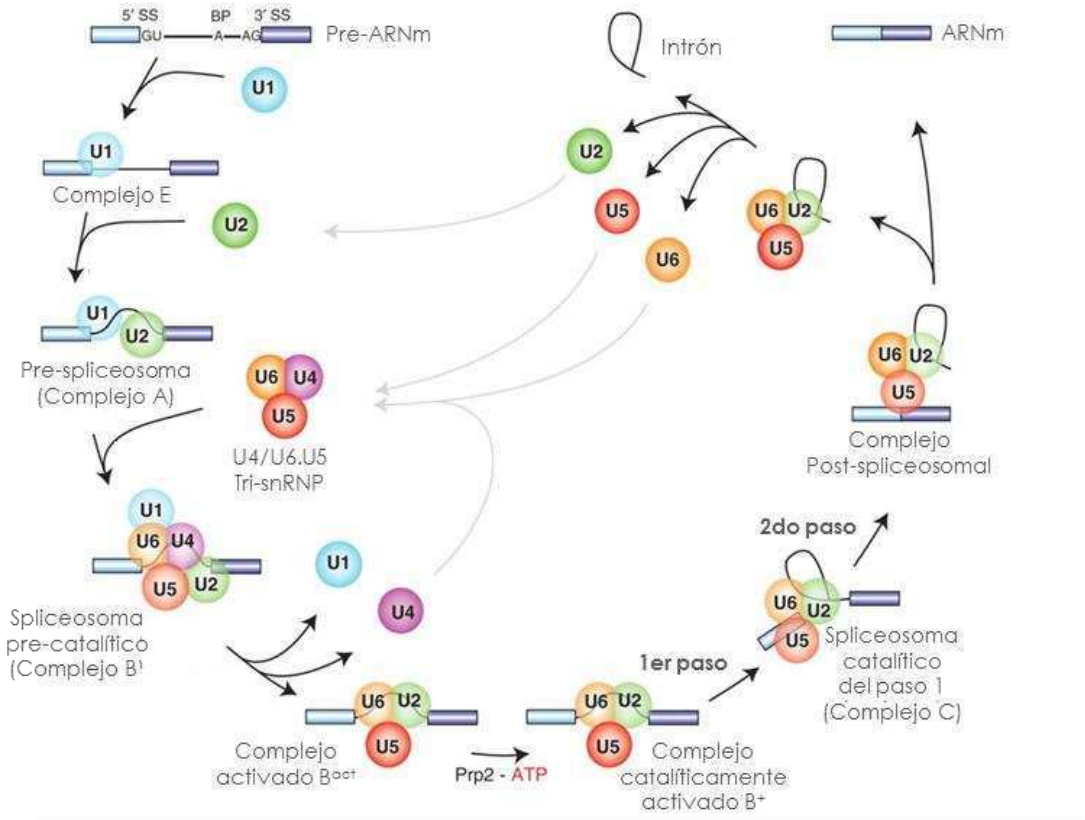


Fig. 8. Representación esquemática del ensamblado del spliceosoma y ciclo catalítico. Las cajas y líneas solidas representan los exones (E1 y E2) y los intrones respectivamente. El punto de ramificación está indicado con la letra A También están indicados los sitios 5'ss y 3'ss. Figura adaptada de *(Will and Lührmann, 2011)*

La decisión de la elección del sitio de *splicing* a usar, está influenciado por proteínas adicionales de unión a ARN que interaccionan con distintos motivos en el pre-ARNm para favorecer o inhibir el reclutamiento del spliceosoma a la cercanía a los sitios de *splicing* alternativo (*Reddy et al. 2013*). Las proteínas

reguladoras son principalmente proteínas ricas en serina/arginina (SR) o ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs). Las proteínas SR contienen uno o dos dominios RRM (motivos de reconocimiento del ARN, del inglés *RNA Recognition Motif*), así como dominios con una alta proporción de repeticiones arginina/serina (*Barta et al. 2010*). Las proteínas hnRNPs son una clase diversa de proteínas de unión a RNA con uno o múltiples RRM.

El *splicing* alternativo y el reloj circadiano.

En los últimos 15 años se han encontrado numerosos eventos de *splicing* alternativo en genes del reloj circadiano. En 1998 en *Drosophila melanogaster*, se encontraron dos isoformas de ARNm para el gen del reloj central *PER,* las cuales codifican proteínas idénticas, pero que difieren en la presencia o ausencia de un intrón corto en la región de 3'UTR (*Cheng et al. 1998*). En *Neurospora crassa*, se observó que el gen del reloj *FRQ* daba lugar a dos isoformas de proteínas diferentes que difieren en longitud por 99 aminoácidos. La proporción de isoformas cambia en función de la temperatura, lo cual contribuía a la robusta ritmicidad a través de un amplio rango de temperaturas (*Colot et al. 2005*; *Diernfellner et al. 2005*).

En *Arabidopsis thaliana* mediante técnicas de secuenciación masiva, se ha podido estimar que del 42% a 61% de los transcriptos sufren *splicing* alternativo, siendo el evento más abundante la retención de intrón. (*Filichkin et al. 2010*; *Marquez et al. 2012*). Cuando un intrón es retenido por *splicing* alternativo, en el transcripto puede aparecer un codón de terminación prematuro (PTC). Este tipo de codón es reconocido por un mecanismo que elimina transcriptos aberrantes, llamado la vía de decaimiento NMD (del inglés, *Nonsense-Mediated Decay*) (*Isken and Maquat 2008*). Un tercio de los eventos de *splicing* alternativo encontrados por técnicas de secuenciación masiva en *Arabidopsis thaliana* resultaron en aparentes transcriptos aberrantes. Mediante el mecanismo de NMD se puede regular la expresión temporal de genes. Por ejemplo, tanto el estrés abiótico y biótico pueden alterar los perfiles de oscilación mediante el cambio reversible de proporciones de la isoforma funcional y la isoforma conteniendo un PTC (*Filichkin et al. 2010*; *Filichkin et al. 2014*; *Filichkin et al. 2015*).

El evento de *splicing* alternativo más estudiado del reloj en *Arabidopsis thaliana* hasta el momento, está asociado al gen *CCA1*. Este evento es la

retención del Intrón 4, un intrón largo que se encuentra luego del exón que codifica el dominio MYB y da lugar a una proteína trunca debido a un PTC (*Filichkin et al. 2010*). Mediante el análisis de la secuencia se predijo que la retención del intrón 4 generaba otra proteína, que posee el dominio de dimerización C –terminal, sin el dominio MYB de unión al ADN, a esta versión se la llamó *CCA1*β (*Seo et al. 2012*). Cuando se sobre expresó en plantas transgénicas, la versión *CCA1*β regulaba negativamente la actividad de la versión más frecuente *CCA1*α y a *LHY* mediante la formación de homo y heterodímeros no funcionales. (*Seo et al. 2012*). Este evento disminuía frente a condiciones de baja temperatura. (*Filichkin et al. 2010*).

Un estudio reciente analizó sistemáticamente eventos de *splicing* alternativo de un grupo de genes centrales del reloj (*CCA1, LHY, TOC1/PRR1, PRR3, PRR5, PRR7 ,y PRR9, ZTL, y CHE)* mediante un sistema de RT-PCR de alta resolución (HR RT-PCR) (*James et al. 2012*). El análisis se realizó para diferentes temperaturas y distintos momentos del día, y permitió identificar 63 eventos de *splicing* alternativo para diez genes del reloj. Para 26 de estos eventos observaron una abundancia significativa, sugiriendo que son fisiológicamente relevantes y no simplemente un resultado de procesamiento incompleto. En este trabajo se confirmaron importantes eventos de *splicing* alternativo que ya habían sido descriptos, como la retención del intrón 1 de *LHY* y la retención del intrón 4 de *CCA1*, y se identificaron nuevos eventos no anotados para los genes *LHY, CCA1, PRR3, PRR5, PRR7, PRR9* y *TOC1,* como la inserción del exón alternativo 5α en *LHY*, la retención del intrón 3 de *PRR9*, el uso alternativo de un 5'ss del intrón 2 de *PRR9*, entre otros, los cuales en su mayoría generan PTC (Fig. 9).

Por otro lado, al menos 13 de estos eventos alternativos, que están asociados a siete genes del reloj, se vieron afectados por la exposición a bajas temperaturas, entre ellos el evento ya reportado regulado por temperatura, la retención de intrón 4 de *CCA1*. El *splicing* alternativo es claramente sensible a cambios en temperatura y juega un rol importante en la respuesta a la transición de temperatura (*James et al. 2012*).

La regulación por *splicing* alternativo ocurre también en componentes de vías de salida del reloj central. *GLYCINE RICH RNA BINDING PROTEIN7 (GRP7;* también conocida como *COLD CIRCADIAN RHYTHM AND RNA BINDING2*

[CCR2]) y GRP8 son proteínas de unión al ARN ricas en glicinas, con un pico de expresión al final del día. Tanto *GRP7* como *GRP8* tienen una autorregulación negativa mediante *splicing* alternativo, dada por la utilización de un sitio de *splicing* 5' (5'ss) críptico en el medio del único intrón (*Staiger et al. 2003*), lo cual genera un PTC y rápido decaimiento por la vía de NMD (*Schöning et al. 2008*). Este es un ejemplo de interconexión entre la vía de *splicing* alternativo y NMD, y uno de los primeros ejemplos de circuitos de retroalimentación basados en regulación post-transcripcional en el sistema circadiano (*Nolte and Staiger 2015*; *Romanowski and Yanovsky 2015*).

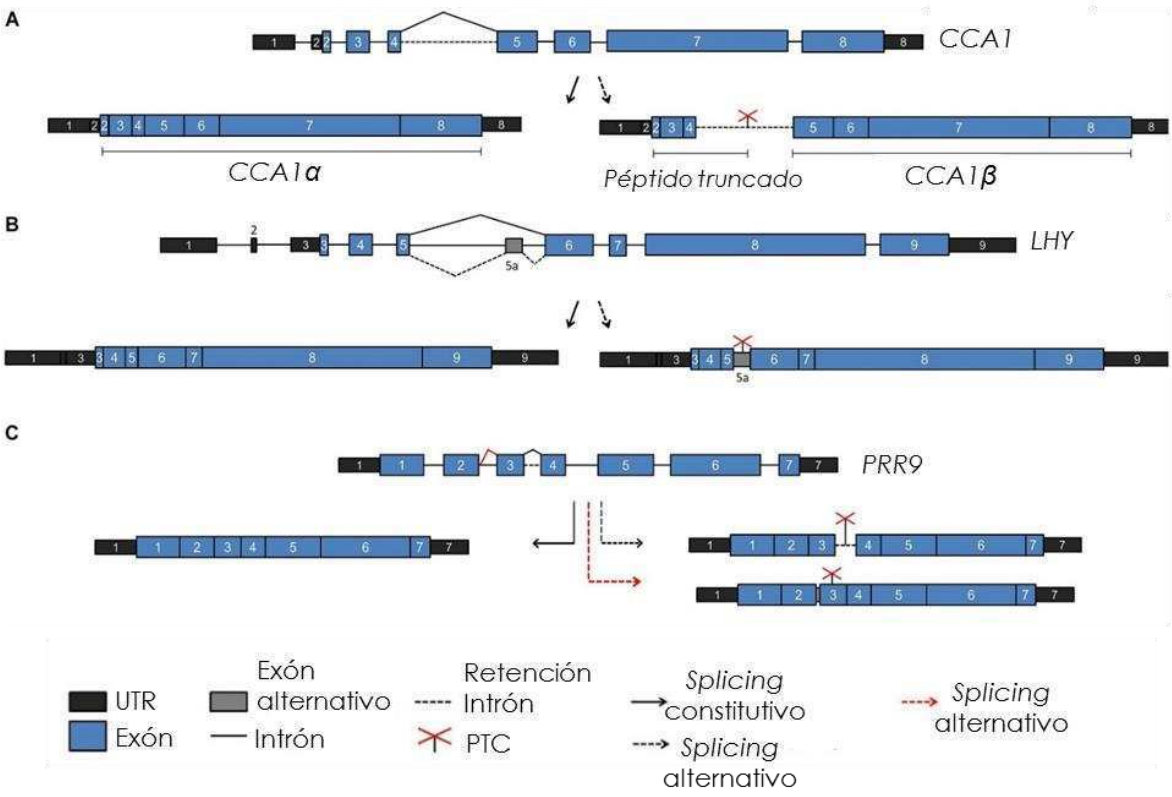


Fig. 9. **Eventos de *Splicing* alternativo para los genes del reloj circadiano en *Arabidopsis thaliana*.** Se muestran los esquemas de cada gen en la parte superior de cada panel, la forma completamente procesada debajo a la izquierda y la isoformas alternativas debajo a la derecha. (A) CCA1, se muestra el evento alternativo reteniendo el intrón 4. (B) LHY, se muestra el evento alternativo que incluye al exón 5α. (C) PRR9, se muestra el evento alternativo reteniendo el intrón 3 y uso alternativo de 5' ss, el cual genera el agregado de ocho nucleótidos en el exón 2. Adaptado de *(Nolte and Staiger, 2015)*.

En nuestro laboratorio en el año 2010, se identificó un rol para *PROTEIN METHYLTRANSFERASE 5 (PRMT5)*, una metil transferasa de argininas simétrica, en la red circadiana de *Arabidopsis thaliana* (*Sanchez et al. 2010*). PRMT5 metila histonas y numerosas proteínas implicadas en procesamiento de ARN,

incluyendo las proteínas AtSmD1, AtSmD3 y LSM4, que son componentes centrales del spliceosoma (*Deng et al. 2010*; *Zhang et al. 2011*). La mutante *prmt5* mostraba un período circadiano alargado y el transcripto del componente central del reloj *PRR9* presentaba una acumulación incrementada de la isoforma alternativa que utiliza el sitio 5'ss en el intrón 2, la cual genera un PTC. Esto sugería que el fenotipo de período largo de la mutante *prmt5* podría ser parcialmente atribuido a alteraciones en el *splicing* alternativo del gen *PRR9*. Además, el reloj circadiano regula la expresión de *PRMT5* en plantas y esto contribuye a modular cambios diarios en la expresión de genes y en el *splicing* alternativo de un subgrupo de genes.

Unos años después dos grupos de investigación describieron que mutaciones en los factores de *splicing SNW/Ski-interacting protein (SKIP)* y *SPLICEOSOMAL TIMEKEEPER LOCUS 1 (STIPL1)*, generaban alteraciones en el período circadiano (*Jones et al. 2012*; *Wang et al. 2012*). *SKIP*, homologo a *SKIP* en mamíferos, interactúa físicamente con el factor de *splicing* SR45, se asocia con pre-ARNm de genes del reloj como *PRR7* y *PRR9* y es necesario para la regulación de su *splicing* alternativo y maduración de ARNm (*Wang et al. 2012*). *STIPL1*, homologo a la proteína spliciosomal TFP11 de humanos y Ntr1p de levadura, está involucrada en el desensamblado del spliceosoma. Un análisis global utilizando RT-PCR de alta resolución reveló que la mutante genera *splicing* menos eficiente para casi todos los intrones analizados. Se cree que la expresión alterada de los genes *CCA1*, *LHY*, *PRR9*, *GI* y *TOC1* causada por *splicing* aberrante, podría ser el causante del defecto circadiano encontrado en la mutante *stipl1* (*Jones et al. 2012*).

Basados en los resultados de nuestro laboratorio para la proteína PRMT5 y en los datos de la bibliografía sobre la conexión entre *splicing* alternativo y el reloj circadiano nos propusimos:

OBJETIVO

Dado que se desconocen la mayor parte de los factores que vinculan al *splicing* alternativo con la regulación de ritmos circadianos, se ha determinado como **objetivo general** para esta tesis profundizar el conocimiento de la conexión entre estos dos procesos. Para ello, se ha planteado como **objetivo particular** identificar y caracterizar el rol en el control de ritmos circadianos de factores de *splicing* con regulación circadiana de sus mensajeros, mediante el análisis de mutantes en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

HIPÓTESIS

La hipótesis principal de esta tesis es que la regulación del *splicing* alternativo, tanto en respuesta a señales endógenas como en respuesta a señales ambientales, contribuye fuertemente al ajuste de los ritmos circadianos. Suponemos que esta regulación sería clave no sólo para el control del reloj circadiano, sino también de los ritmos que este genera, permitiendo que el crecimiento y el desarrollo de la planta estén mejor sincronizados con los cambios diarios y estacionales en diversos condiciones ambientales.

Materiales y Métodos

Material Vegetal y Condiciones de Crecimiento

Las líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en esta tesis son del ecotipo Columbia y C-24. Las plantas se cultivaron en macetas plásticas de 110 cm^3 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 22ºC y 24ºC. Las condiciones lumínicas en término de fotoperiodo varían para cada experimento. Se utilizaron fotoperiodos de día largo (16h luz/ 8h oscuridad), de día corto (8h luz/16h oscuridad), de 12:12 (12h luz/12h oscuridad) y de luz continua.

Las mutantes empleadas fueron: *sad1/lsm5 (CS24935), lsm4-1 (SALK_063398), grp7 (SALK_039556), grp1e (SALK_038244), scl30 (SALK_012838), sr30 (SALK_116747), lsm1a (SALK_106536), lsm1b (SAIL_898_D06), dcp5-1 (SALK_008881), xrn4-3 (SALK_014209) y xrn4-5 (SAIL_681_E01)*. La mutante doble *lsm1a/lsm1b* se obtuvo mediante cruzas de las mutantes simples.

Las mutantes que expresan los reporteros bioluminiscentes se obtuvieron mediante transformaciones con *Agrobacterium tumefaciens* o cruza con plantas transgénicas que ya portaban las construcciones correspondientes.

La línea CS24935 *sad1/lsm5* es una mutante puntual la cual se obtuvo mediante mutagenesis con etil metanosulfonato, en una búsqueda a gran escala de mutantes con respuesta alterada al estrés (*Xiong et al. 2001*). Las líneas "SALK" y "SAIL" presentadas en este trabajo provienen del *SALK (Institute Genomic Analysis Laboratory)* y de Syngenta, respectivamente, y son mutantes por inserción de T-DNA.

Análisis del Reloj Circadiano en *Arabidopsis thaliana*

Medición del ángulo entre hojas

Las semillas se sembraron directamente en macetas plásticas cilíndricas (diámetro: 13mm, alto: 35mm) que contienen el sustrato ya especificado, y se colocaron en la condición de entrenamiento, en un fotoperiodo de día largo. Después de aproximadamente 10 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 fotografío una vez por hora durante

aproximadamente una semana. Luego 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. Dicha medición se realizó empleando el *software ImageJ* (*Schneider et al. 2012*).

Medición de la bioluminiscencia

Las plántulas se cultivaron directamente en medio Murashige & Skoog (*Murashige and Skoog 1962*) 0.8% agar suplementado con 1% de sacarosa en placas de 96 pocillos apropiadas para el uso en el luminómetro de microplacas modelo LB-960 (Berthold Technologies, Wildbad, Alemania), que funciona con el software Mikrowin 2000 (versión 4.29) (Mikrotek laborsysteme, Overath, Alemania). Se sembró una semilla por pocillo y se dejó a la placa en oscuridad a 4°C por 3 días. Luego se la colocó en la condición de entrenamiento, en un fotoperiodo de día largo. Después de aproximadamente 7 días cuando se registra la aparición de los cotiledones, se agregó el sustrato luciferina a cada pocillo y la placa completa se transfirió a condiciones de temperatura y luz constantes. Se programó el luminómetro para medir la bioluminiscencia emitida por cada plántula una vez cada 2 horas. Una vez terminado el experimento (5 a 7 días), se procede al análisis de los datos.

Estimación del período

La estimación del período se realizó empleando el *software Brass 3.0,* del inglés *Biological rhythms analysis software system* (*Millar et al. 1995*). 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*). Estos cálculos se realizaron para las mediciones de movimiento de hojas y bioluminiscencia. Para comparar estadísticamente las diferencias observadas entre los distintos genotipos se realizaron pruebas de t de Student (α=0.05).

Generación de Líneas Transgénicas

Líneas transgénicas *pLSM5::LSM5 sad1/lsm5*

El clonado se realizó utilizando la tecnología Gateway (Invitrogen), ésta 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. La construcción de *pLSM5::LSM5* se generó levantando por PCR el ADN genómico del gen LSM5 y 1.6Kb de la región no codificante rio arriba del sitio de comienzo de la transcripción. Los sitios de recombinación específica necesarios para emplear la tecnología Gateway se le colocaron mediante los *primers* que se utilizaron para levantar el fragmento. Luego se incubó el fragmento con el vector de clonado pDONR/Zeo en presencia de la enzima *BP Clonase II (Invitrogen)*. El plásmido resultante de la reacción de recombinación se utilizó para transformar bacterias electrocompetentes de la cepa DH5α 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 expresión en plantas pEarlyGate301 (*Earley et al. 2006*) en presencia de la enzima *LR Clonase II (Invitrogen)*. El plásmido resultante fue clonado en bacterias DH5α. Los clones positivos fueron seleccionados en placas con medio LB y el antibiótico kanamicina (100 µg/ml), confirmados por *colony* PCR. Luego se secuenciaron para confirmar su identidad y que no se hayan introducido mutaciones. Este vector binario fue purificado e introducido por electroporación en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*. Luego, se transformaron plantas mutantes *sad1/lsm5* siguiendo el método de "*floral dip*"(*Clough and Bent 1998*). Las plantas transformadas fueron seleccionadas en medio Murashige and Skoog (*Murashige and Skoog 1962*) conteniendo 15 µg/ml del herbicida PPT (*phosphinothricin* o *glufosinato* de amonio). Se obtuvieron alrededor de 10 líneas transgénicas independientes (T1). Para algunas de ellas se obtuvieron semillas homocigotas de la tercera generación (T3). Tres líneas se utilizaron para evaluar la complementación de la mutante *sad1/lsm5*.

Líneas transgénicas con reporteros bioluminiscentes

Para las mutantes *lsm4-1 y lsm1a/lsm1b* se utilizaron plantas segregantes debido a que las plantas homocigotas no dan semillas. Las plantas fueron crecidas en macetas conteniendo el sustrato ya especificado. Al desarrollar entre 6-8 hojas se tomó una muestra de tejido foliar y se realizó una extracción de ADN (*Murray and Thompson 1980*). Luego se genotipificaron (ver genotipificación de mutantes más adelante) para seleccionar sólo las plantas heterocigotas para *lsm4-1* y heterocigotas *lsm1b* (*lsm1a* no segrega, ya se encuentra en homocigosis en la doble mutante). Una vez que comenzaron a florecer, se las transformó con la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo el vector *CCA1::Luc* o *CCR2::Luc* mediante el método *floral dip* (*Clough and Bent 1998*). Las plantas transformadas con *CCA1::Luc* fueron seleccionadas en medio Murashige and Skoog (*Murashige and Skoog 1962*) conteniendo 15 µg/ml del herbicida PPT (*phosphinothricin* o *glufosinato* de amonio) y las plantas transformadas con *CCR2::Luc* fueron seleccionadas con gentamicina (125 µg/ml). Tres líneas independientes de cada reportero se utilizaron para los ensayos de bioluminiscencia.

Análisis Fisiológicos

Medición del largo del hipocotilo

Las semillas se sembraron en cajas plásticas transparentes (40 x 33 mm, 15 mm altura) conteniendo 5 ml de agar-agua al 0,8% (p/v), y se incubaron por 3-4 días a 4ºC 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 22ºC antes de ser transferidas al fotoperiodo de día largo o día corto por 3 días. Posteriormente, se midió el largo del hipocotilo traspasando cada plántula a una caja con agar agua en forma vertical para su posterior escaneo. Se utilizó el programa *ImageJ* (*Schneider et al. 2012*) y se midió el largo del hipocotilo de cada plántula. Se realizaron 10 mediciones por tratamiento de cada mutante, a partir de las cuales se obtuvo el promedio, el cual se consideró como la unidad experimental. Cada tratamiento cuenta con dos réplicas biológicas. Para comparar estadísticamente las diferencias observadas entre los distintos genotipos se realizó una prueba de t de Student (α=0.05).

Medición del tiempo a floración

El tiempo de floración se determinó contando el número de hojas en la roseta de plantas donde la floración ya estaba inducida, cuando el escapo floral tenía aproximadamente 1cm. El número de hojas de la roseta fue determinado para cada planta como indicador de la duración de la fase vegetativa del desarrollo, de este modo uno estima el tiempo biológico que tarda en florecer independizándose de la velocidad de crecimiento de la planta (*Koornneef 1991*). Se realizaron tres experimentos independientes y en cada experimento se cuantificaron las hojas de 10-15 plantas para cada genotipo. Para comparar estadísticamente las diferencias observadas entre los distintos genotipos se realizó una prueba de t de Student (α=0.05).

Análisis Moleculares

Genotipifcación de mutantes

Para verificar que las poblaciones de semillas mutantes adquiridas poseían la inserción de T-DNA en ambos alelos del *loci* de interés se procedió a su genotipificación mediante reacciones de PCR. Se cultivaron las plantas y cuando poseían entre 6-8 hojas se tomó una muestra de tejido foliar y se realizó una extracción de ADN (*Murray and Thompson 1980*). Para el diseño de *primers* se empleó el software *Beacon Designer* 5.0 *(Premier Biosoft International*) y se siguió el protocolo de diseño de *primers* del SIGnAL *(Salk Institute Genomic Analysis Laboratory* [http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress]), donde un set de *primers* específicos (LP y RP) amplifica el alelo salvaje, mientras que otro set (RP y LBFGH o LB3) amplifica el alelo que contiene la inserción de T-DNA. Los *primers* LBFGH y LB3 hibridan en la inserción de T-DNA de las líneas SALK y SAIL respectivamente. Para las reacciones de PCR se empleó la enzima *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de las reacciones de PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% revelado con bromuro de etidio (concentración final: 0,5µg/ml).

Verificación de la expresión nula

Para verificar la expresión nula de los genes de interés en las plantas mutantes utilizadas, se analizó la presencia de ARNm de dichos genes. Para ello se realizaron extracciones de ARN total de tejido foliar empleando *Trizol Reagent* (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras de ARN fueron tratadas con enzima *DNAasa* empleando la enzima *RQ1 RNase-Free Dnase* (Promega) y se realizó una retro-transcripción empleando la enzima *MMLV (Invitrogen)* en ambos casos siguiendo el protocolo del fabricante. El ADNc sintetizado se empleó como templado en reacciones de PCR con *primers* específicos para cada ARNm evaluado. El diseño de *primers* y las reacciones de PCR se realizaron con la misma metodología de la genotipificación de mutantes. Se amplificó el gen ACTINA, el cual fue empleado como control de carga para independizarse de diferencias en la eficiencia de la reacción de retro-transcripción. El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 2% revelado con bromuro de etidio (concentración final: 0,5µg/ml).

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

Para el estudio de la expresión génica mediante qPCR (del inglés *quantitative* PCR), el material biológico utilizado proviene de plántulas crecidas según el tratamiento lumínico que se indica en cada caso. Se purificó el ARN total de tejido foliar utilizando *RNeasy Miniprep kit (Quiagen) o TRIzol* (*Invitrogen*). 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 ADNc utilizando la enzima *MMLV-RT* o *SuperScript III (Invitrogen)* y *oligo-dT*. La amplificación del ADNc fue realizada utilizando *Fast Start Universal SYBR Green Master* (ROX) (*Roche*) en un equipo *Real Time Mx3000p qPCR System* (*Agilent technologies*). El gen *PP2A* (*Protein Phosphatase 2A Subunit A*) fue empleado como control para relativizar la expresión e independizarse de diferencias en la eficiencia de la reacción de retro-transcripción. La cuantificación de la expresión de genes se realizó mediante el método de CT (*Schmittgen and Livak 2008*).

Detección de isoformas de *splicing* por RT-PCR

La reacción de PCR fue realizada de acuerdo al protocolo convencional, utilizando de acuerdo al caso entre 25-30 ciclos de amplificación. Como templado se utilizó ADNc que se obtuvo mediante retro-transcripción empleando la enzima *MMLV* (*Invitrogen*). Al producto de amplificación de PCR obtenido se le agrego *SYBR Green I* (*Invitrogen*) en una dilución 1:10000 y se sembró en gel de agarosa 2%. Luego de la corrida electroforética se detectó por trans-iluminación con luz UV.

Preparación de la biblioteca del ADNc para la secuenciación del transcriptoma *(RNA-seq)*

Para el ecotipo C-24 y la mutante *sad1/lsm5* las plantas se crecieron en macetas plásticas con el sustrato ya especificado anteriormente. Las semillas fueron colocadas por 4 días en oscuridad a 4°C y luego transferidas a luz continua. Las plántulas crecieron durante 30 días y luego fueron cosechadas. El material vegetal fue utilizado para la extracción de ARN mediante el uso de *TRIzol* (*Invitrogen*) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para el ecotipo Columbia y la mutante *lsm4-1*, se trabajó con plantas segregantes *lsm4-1* (heterocigotas), dado que las plantas *lsm4-1* homocigotas son estériles. Las plántulas se crecieron en medio MS (*Murashige and Skoog)* conteniendo 0.8% de agar. Las semillas fueron colocadas por 4 días en oscuridad a 4°C y luego transferidas a luz continua. Las plántulas crecieron durante 10 días, y el día de la cosecha se seleccionaron las plántulas homocigotas *lsm4-1* por su crecimiento lento y pequeño tamaño de roseta (ver recuadro Fig. 20B). El material vegetal fue utilizado para la extracción de ARN mediante el uso de *RNeasy Plant Mini Kit* (*Qiagen*) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ambos ecotipos, se determinó la concentración y calidad del ARN obtenido con *NanoDrop 2000c (Thermo Scientific)* y mediante corrida en gel de agarosa. Una vez obtenido el ARN en las condiciones necesarias se procedió a construir las bibliotecas utilizando el *kit TruSeq™ RNA Sample Preparation Guide (Illumina)*. Para ello se usaron 3 µg de ARN total, a partir del cual se purificó y fragmentó el ARN con poli-A. Se sintetizó ADNc con la enzima transcriptasa reversa *SuperScript II* (*Invitrogen*) y hexámeros al azar. A continuación se degradó el ARN y se sintetizó ADN doble cadena. La reparación de los extremos y la adición de un nucleótido

de Adenina al extremo 3' posibilitaron la ligación de secuencias adaptadoras que luego permitieron identificar a qué muestra corresponde cada secuencia generada. Finalmente las muestras fueron amplificadas con 12 ciclos de reacción de PCR. Las bibliotecas fueron validadas mediante la determinación de su pureza y el tamaño de los fragmentos con *Agilent 2100 Bioanalyzer* y *Agilent DNA1000 kit (Agilent Technologies)*. Para su análisis, se utilizó el servicio de secuenciación del instituto INDEAR en Rosario, Argentina. Las muestras fueron secuenciadas por el método de *paired-end* con el kit correspondiente, compatible con la plataforma *Illumina HiSeq 1500*. Se obtuvieron alrededor de 16 millones de lecturas de 100pb para cada muestra. Se secuenciaron tres réplicas por genotipo y los datos obtenidos fueron alojados en la base de datos *Gene Expression Omnibus* bajo el número de accesión GSE60387.

Análisis Bioinformáticos

Procesamiento de las lecturas de la secuenciación de ARN

Las lecturas obtenidas fueron mapeadas al genoma de *Arabidopsis thaliana* TAIR10 (*Lamesch et al. 2012*) usando *TopHat v2.0.9* (*Trapnell et al. 2009*) con los parámetros preestablecidos, a excepción del largo máximo del intrón que fue establecido en 5000pb. A partir de los archivos de alineación (archivos *bam*) generados y empleando scripts de R (*Ihaka and Gentleman 1996*) creados en el laboratorio, se obtuvieron las tablas de cuentas (*counts*) que permiten analizar expresión diferencial y procesamiento alternativo de pre-ARNm, en base al transcriptoma del TAIR10.

Expresión diferencial de genes

Previo al análisis de la expresión diferencial, se decidió descartar los genes con menos de 10 lecturas en promedio por condición. La expresión diferencial de genes se estimó usando el paquete edgeR versión 3.4.2 (*Robinson et al. 2010*) y los p-valores resultantes fueron ajustados usando el criterio de tasa de falso descubrimiento, del inglés *false discovery rate (fdr)* (*Benjamini and Hochberg 1995*). Se consideró genes diferencialmente expresados a genes con valores de *fdr* menores a 0.15 y una tasa de cambio del $\log_2$ absoluto mayor a 0.58, que corresponde a una diferencias de 1.5 veces. Los análisis de superposición fueron realizados con la herramienta Venny (*Oliveros 2007*).

Categorías funcionales enriquecidas

Para identificar las categorías funcionales asociadas a grupos específicos de genes se usó la herramienta *BioMaps* del software *Virtual Plant* (http://virtualplant.bio.nyu.edu/cgi-bin/vpweb). A su vez, esta herramienta nos permite determinar que categorías funcionales están estadísticamente sobrerrepresentadas en una lista de genes particulares, en comparación con todo el genoma (*Katari et al. 2010*). Se analizaron 16 categorías funcionales de nuestro interés, determinando para cada una los genes en común con nuestros conjuntos de datos, así como un factor de representación (FR) y la probabilidad de que estas superposiciones sean por azar. Se define como factor de representación al número de genes en común observado, dividido por el número de genes en común esperado de la superposición de dos grupos independientes de genes. Un factor de representación mayor a 1 indica mayor solapamiento de lo esperado por azar en dos grupos independientes de genes o eventos de *splicing* mientras que un factor de representación menor que 1 indica un menor solapamiento que lo esperado. La probabilidad de cada solapamiento se determinó usando el test exacto de *Fisher (α=0.05)*.

Análisis del *Splicing* alternativo.

Para el análisis del *splicing* alternativo, el transcriptoma fue particionado en regiones sub-génicas llamadas "*bin*", como se propuso en *Dexseq* (*Anders et al. 2012*). Dado nuestro especial interés en el descubrimiento de nuevos eventos de retención de intrones, no solo los exones sino también los intrones fueron considerados en nuestro análisis. Se separaron en 3 tipos de *bins, exon-bin, intron-bin o splicing alternativo(AS)-bin*. Además, los *AS-bins* se sub-clasificaron en *bins* de exclusión de exón (EE), de selección alternativa del sitio de *splicing* 5' o 3' (5'alt, 3'alt), de retención de intrón (RI) o múltiple (esto incluye tres o más eventos de *splicing* alternativo diferentes en la misma región sub-génica). Para nuestro análisis se descartaron los *bins* de genes mono-exónicos y con lecturas con valores promedio menores que 5 lecturas por condición. Para evaluar niveles diferenciales de *bins* entre genotipos, se realizó el mismo análisis que para la expresión diferencial de genes pero tomando como unidad de estudio el *bin*. Para diferenciar los casos en los cuales la expresión diferencial del *bin* corresponde a un evento de *splicing* alternativo y no a la expresión diferencial

del gen, se utilizó el "índice de *splicing*". Este se define como (RD bin/RD gen), donde RD es la densidad de lecturas, es decir, el número de lecturas de un dado intervalo dividido la longitud del intervalo, ya sea *bin* o gen; en el caso de los genes, la longitud se entiende como la suma de la longitud de los exones que lo constituyen. Para el análisis se utilizó genes con RD mayor a 0.05 en todos los genotipos e bins con RD mayores a 0.05 en al menos un genotipo. Para la comparación entre genotipos se utilizó el cociente de los índices de *splicing*. Este se define como $(RD\ bin/RD\ gen)_{mutante}$ /$(RD\ bin/RD\ gen)_{salvaje}$. Se consideraron eventos con *splicing* alternativo diferencial cuando el log_2 absoluto de la tasa de cambio absoluto ($RD\ bin_{mutante}/RD\ bin_{salvaje}$) era mayor a 0.58, con valores de *fdr* menores a 0.1. EL valor de log_2 absoluto del cociente de los índices de *splicing* mayor a 0.58 corresponde a una diferencias de 1.5 veces. Los análisis de superposición fueron realizados con la herramienta *Venny* (*Oliveros 2007*).

Análisis del Reloj Circadiano en Células Humanas *U2OS*

El análisis del reloj circadiano en células humanas fue realizado mediante una colaboración con el laboratorio de Dr. Hogenesch en la Universidad de Pennsylvania *Perelman School of Medicine*, USA. La estudiante de doctorado Lauren J Francey, realizó los experimentos y analizó los datos. A continuación se describe los métodos experimentales.

Cultivo celular y transfecciones reversas

Las células humanas osteosarcoma U2OS fueron mantenidas en *DMEM* (Glbco) suplementado con 10% FBS (*HyClone*) y 1x penicilina-estreptomicina-glutamina (PSG, Invitrogen) e incubada a 37°C. Para la transfección, un mix de siARN (pequeños ARN de interferencia) (n=4/gen, Quiagen) se diluyó a una concentración final de 24mM en medio de transfección (*Opti-MEM I Reduced Serum Medium [Gibco]*) suplementado con 2% lipofectamina RNAi MAX (Life Technologies). Luego de 20 minutos de incubación en medio de transfección, los mix de siARN fueron agregados a las células en una densidad de 2x105 células/ml en DMEM suplementado con 20% FBS (*HyClone*), con 2x-glutamina (Invitrogen) pero sin antibióticos. Las células fueron colocadas en placas de 96 pocillos a una concentración final de 30.000 células/pocillo y a una concentración final de siARN de 9,6mM. Las células transfectadas fueron incubadas por 24h a 37°C previo al experimento de bioluminiscencia.

Ensayo de bioluminiscencia en células U2OS y análisis de datos.

El medio transfectado con el mix siARN se aspiró luego de 24h de la transfección y fue reemplazado por medio para la medición de bioluminiscencia, *DMEM* libre de rojo fenol (Sigma D-2902), bicarbonato de sodio (Invitrogen), D-(+)-glucosa (Sigma), 10mM HEPES (Invitrogen), penicilina-estreptomicina-glutamina (PSG, Invitrogen), luciferina 0,1mM (*Promega*) y suplementado con 0,1uM dexametasona *(Sigma-Aldrich),* la cual sincroniza las células previo al experimento. Las células U2OS se crecieron en placas de 96 pocillos por 6 días a 32°C. Se usó un lector de microplaca *Synergy* (*BioTek*) para el ensayo de bioluminiscencia. Las transfecciones de siARN para cada gen se realizaron por triplicado. La cuantificación del período se realizó usando el paquete *Waveclock* implementado en R (*Price et al. 2008*).

CAPÍTULO I

Factores de splicing con regulación circadiana.

Introducción

El transcriptoma circadiano de *Arabidopsis thaliana*

Los ritmos circadianos son importantes para la anticipación a distintas condiciones ambientales, para así poder coordinar distintas funciones fisiológicas al momento apropiado del día. Esto es especialmente importante para organismos sésiles, como las plantas. Es por eso que muchos grupos de investigación en plantas están interesados en la regulación de estos ritmos, particularmente, a nivel de expresión de genes.

En los últimos 15 años, tres grupos de investigación realizaron trabajos a gran escala utilizando micro-arreglos en *Arabidopsis thaliana* que han dado diversas estimaciones de la fracción del transcriptoma que se encuentra controlada por el reloj circadiano, estas variaban entre 5.5% y 15.4% (*Harmer et al. 2000*; *Edwards et al. 2006*; *Covington and Harmer 2007*). Dada la variación encontrada en el porcentaje entre los distintos laboratorios, en 2008 el grupo investigación de la Dra. Harmer integró la información de los múltiples micro-arreglos circadianos realizados hasta el momento en la planta *Arabidopsis thaliana,* para poder estimar de mejor manera la fracción del transcriptoma regulada circadianamente (*Covington et al. 2008*). En este trabajo se compararon 9 conjuntos de datos de micro-arreglos de tres trabajos, los cuales se llamaron según su primer autor (*Edwards et al. 2006*; *Covington and Harmer 2007*; *Michael et al. 2008*).

Dado que los procedimientos experimentales en los trabajos de *Edwards* y *Covington* fueron muy similares, decidieron analizarlos como una sola serie de tiempo. Luego de normalizar los valores de expresión a la mediana de cada conjunto de datos, combinaron los dos experimentos en tres formas distintas: intercalando los dos conjuntos de datos para generar una resolución de dos días cada 2 horas ("CECE" *dataset*); colocando la serie de *Edwards* después de la serie de *Covington* generando un resolución de cuatro días cada 4 horas ("CCEE" *dataset*); y colocando la serie de *Covington* luego de la serie de *Edwards* para generar otra serie de cuatro días cada 4 horas ("EECC" *dataset*).

Las tres series de tiempo fueron analizadas en concordancia con los parámetros utilizados originalmente por *Edwards*, y encontraron en cada caso que del 35-37% de los transcriptos expresados eran regulados circadianamente (*Covington et al. 2008*). La intersección de las 3 listas de genes con regulación circadiana predicha, poseían una superposición del 76% ("C+E" dataset). Para mejorar la predicción de genes regulados por el reloj, agregaron dos conjuntos de datos más que habían sido generados recientemente por *Michael et. al* (*Michael et al. 2008*). Estos poseían condiciones experimentales distintas a las analizadas hasta el momento, pero la comparación de las listas de genes considerados circadianos entre estos dos nuevos grupos de datos y la intersección C+E compartían más del 65%. De este análisis global de múltiples micro-arreglos concluyeron que entre el 30% y 40% de los genes expresados son regulados por el reloj. Además, entre los genes regulados por el reloj encontraron una sobre representación en vías de respuesta a hormonas y a distintas vías de estrés, sugiriendo que estas vías están influenciadas por el reloj circadiano. También encontraron cuatro elementos en promotores de genes con 4 fases discretas, que podrían contribuir a cambios en la abundancia de genes específicos según el momento del día (*Covington et al. 2008*).

Factores y reguladores del *splicing* en *Arabidopsis thaliana*

Para facilitar los estudios de *splicing* de pre-ARNm a nivel global en plantas, los Dres. *Wang y Brendel* (*Wang and Brendel 2004*) realizaron una exhaustiva comparación computacional de secuencias, utilizando proteínas relacionadas con el *splicing* ya conocidas de plantas y animales. De esta manera identificaron 74 genes que codifican snARN y 395 genes que codifican proteínas relacionadas al *splicing* en el genoma de *Arabidopsis thaliana*. Aproximadamente la mitad de los genes poseían múltiples copias y parecían haber derivado de eventos de duplicación cromosómica y de duplicación de genes individuales. Todos los genes fueron nombrados, anotados y clasificados, tomando en cuenta la estructura génica inferida, los dominios proteicos predichos y la probable función. Las clasificaciones y el análisis de los resultados se integraron en la base de datos digital ASRG, del inglés, *Arabidopsis Splicing Related Genes* (*Wang and Brendel 2004*).

De esta manera se dividieron a las proteínas spliceosomales de *Arabidopsis thaliana* en 5 categorías. Categoría I: proteínas snRNPs (91 genes), que incluye a las proteínas Sm y LSM, y proteínas específicas de los distintos U snRNPs; categoría II: factores de *splicing* (109 genes), que incluyen a proteínas de selección de sitio de *splicing* y proteínas SR, entre otras; categoría III: reguladores del *splicing* (60 genes), como quinasas de proteínas SR y proteínas de la familia hnRNPs; categoría IV: nuevas proteínas del spliceosoma (84 genes), como proteínas de unión a la cola poli A, helicasas DEAD/H box, entre otras y por último la categoría V: proteínas posiblemente relacionadas con el *splicing* (51 genes).

Un estudio más reciente generó una compilación de factores de *splicing* de *Arabidopsis thaliana*, mediante una análisis comparativo de datos de espectrometría de masa de 27 complejos spliceosomales tipo-U2, purificados de levadura, mosca y humanos (*Koncz et al. 2012*). Este análisis, a diferencia del realizado por *Wang y Brendel*, contenía la información de proteínas involucradas en el complejo NTC (del inglés, Nine Teen Complex), el cual se asocia con el spliceosoma y es esencial para la eliminación de intrones (*Hogg et al. 2010*). Este análisis mostró que alrededor de 430 factores spliceosomales estaban conservados en *Arabidopsis thaliana* (*Koncz et al. 2012*).

Resultados

Identificación de genes relacionados al *splicing* con regulación circadiana.

Para alcanzar el objetivo particular de esta tesis, se generó una lista de factores y reguladores de *splicing* candidatos, mediante la búsqueda de la intersección entre dos listas de genes: Una conteniendo los datos de C+E ("C+E" *dataset*) y *Michael et. al,* que comprende 5230 genes expresados circadianamente y otra conteniendo los datos de *Wang y Brendel, y Koncz* que comprende 426 genes relacionados al *splicing* en *Arabidopsis thaliana*.

La comparación de estas listas dió como resultado 83 genes candidatos (Fig. 10A y Tabla 1 del apéndice). Si bien este número no indica un enriquecimiento de genes regulados por el reloj entre las distintas categorías de factores y reguladores de *splicing* (Fig. 10B), el subconjunto de 83 genes identificado podría permitir revelar vínculos entre la maquinaria de control del *splicing* alternativo y el reloj circadiano. La intersección no sólo incluye proteínas SR y hnRNPs, sino también proteínas spliceosomales centrales, reguladores del ensamblado del spliceosoma, componentes de snRNPs específicos, así como algunas quinasas reguladoras de la función de proteínas SR (Tabla 1 del apéndice).

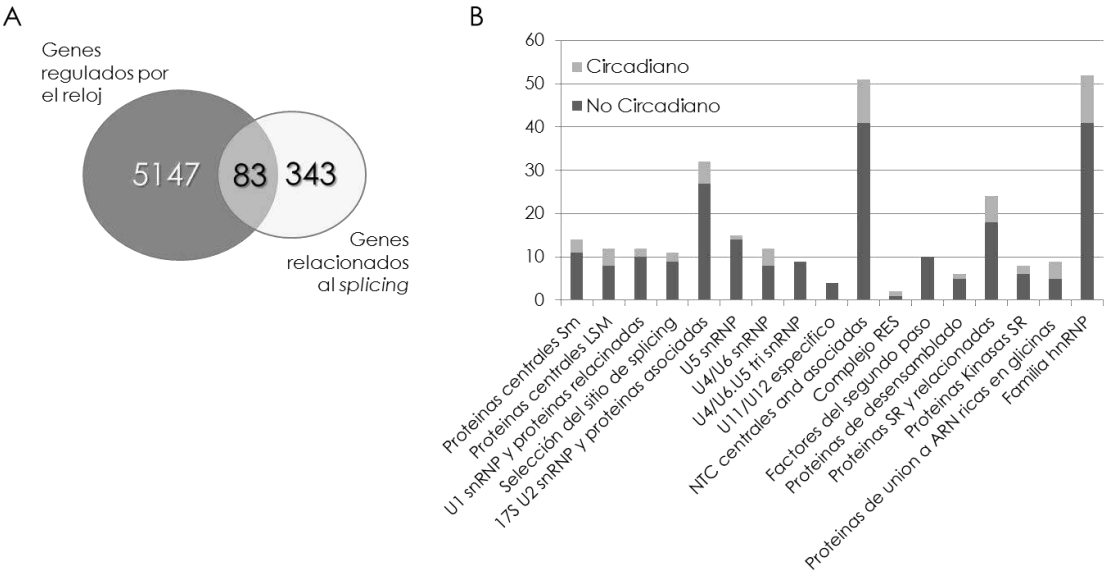


Fig. 10. Factores y reguladores del *splicing* de *Arabidopsis thaliana* con regulación circadiana de sus ARNm. (A) Superposición entre genes regulados por el reloj y genes relacionados al *splicing* representados en un diagrama de *Venn*. (B) Grafico del número de genes pertenecientes a cada grupo de componentes del spliceosoma y, factores y reguladores del *splicing* que son regulados (gris claro) o no (gris oscuro) por el reloj circadiano.

Para validar la expresión circadiana de los genes candidatos, se evaluaron los niveles de ARN de cinco genes seleccionados por pertenecer a tres grandes familias de proteínas spliceosomales. Estos fueron *UBA2c* y *GRP7* de la familia de proteínas hnRNPs, *SR45a* y *SR30* de la familia de proteínas SR, y *LSM5* de la familia de proteínas snRNPs. Para ello se utilizó ADNc de plantas salvajes crecidas en fotoperiodo de día corto y se midieron por qPCR los niveles de ARNm (Fig. 11). También se midió la expresión del gen del oscilador central *CCA1* como control interno de oscilación circadiana de las muestras. Todos los genes analizados mostraron oscilación en su expresión, confirmando el control circadiano de sus transcriptos. También se observó el pico característico del gen *CCA1* al comienzo de la mañana, corroborando la correcta toma de muestras y la validez de las mismas para estudios temporales de expresión génica.

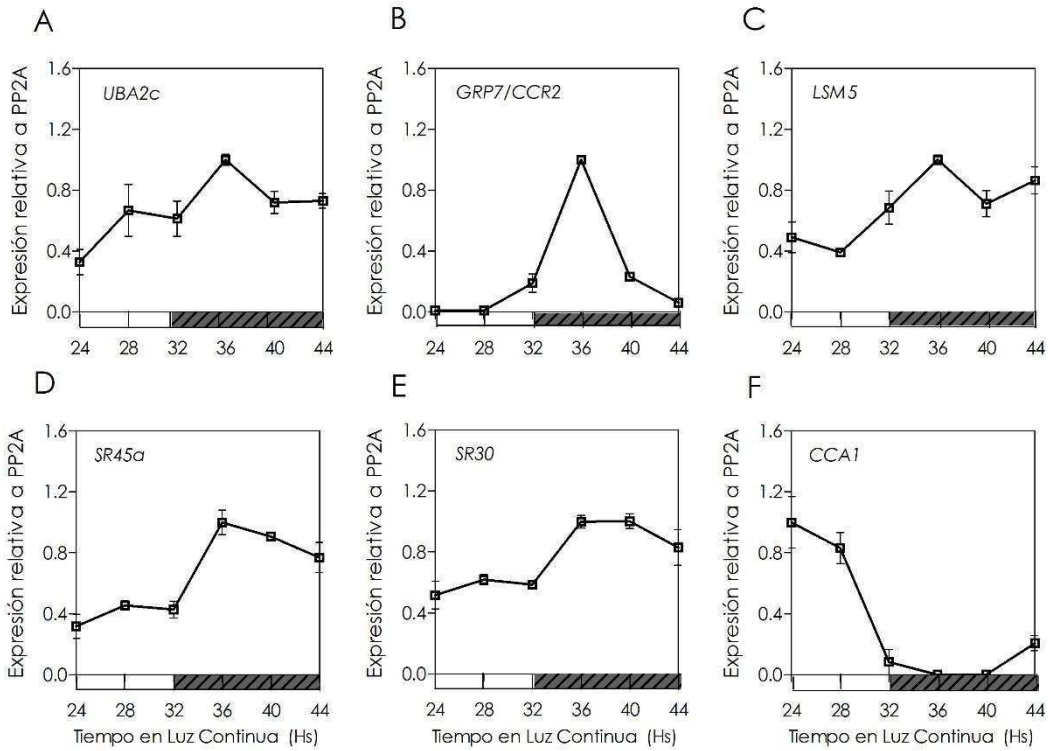


Fig. 11. Confirmación de la expresión circadiana de genes seleccionados relacionados al *splicing*. Expresión génica medida por qPCR en plántulas del genotipo salvaje, entrenadas en fotoperiodo de día corto previo a ser transferidas a luz constante. (A,B) Genes hnRNP; (C) LSM5 (D,E) Genes SR; (F) CCA1, un gen del oscilador central utilizado como control interno de oscilación. Los datos son el promedio de 3 réplicas biológicas expresados relativo al gen PP2A y normalizados al máximo valor. Las cajas blancas representan el día y las cajas grises ralladas representan la noche subjetiva. Las barras de error representan el desvío estándar (DE). Hs: Horas.

Caracterización circadiana de mutantes para genes relacionados al *splicing*

Para determinar si alguno/s de estos factores de *splicing* influenciaban la función del reloj, se pidieron mutantes para 13 de los 83 genes candidatos (Tabla 2 del apéndice). Los 13 genes fueron seleccionados por pertenecer a las tres principales familias de proteínas del spliceosoma, las proteínas *SR, hnRNPs* y *snRNP,* y por la disponibilidad de mutantes en el ABRC *(Arabidopsis Biological Resource Center)*. La mayoría de las mutantes pedidas habían sido generadas por inserción de transposones al azar en el genoma (líneas SALK y SAIL). Pero otro grupo de mutantes habían sido generadas mediante mutagénesis, lo que genera mutaciones puntuales.

Una vez recibidas las semillas y corroborada la homocigosis de la mutación (ver Materiales y Métodos), se llevó a cabo el estudio del efecto de mutaciones en genes relacionados al *splicing* sobre los ritmos circadianos. Este se realizó mediante el análisis de uno de los procesos fisiológicos más robustos controlado por el reloj circadiano, el movimiento de hojas. Para esto se crecieron a las plantas en condiciones de día largo, lo que se conoce como período de entrenamiento. Luego de 9 días, cuando el primer par de hojas se pudo observar, se las colocó en condiciones de libre curso, es decir luz y temperatura constantes, donde se realizaron las mediciones. En la Fig. 12 se puede observar que, el ritmo del movimiento de hojas para 4 mutantes representativas analizadas es igual que el ritmo de las plantas salvajes medidas. Se obtuvieron los mismos resultados para 12 de las 13 plantas mutantes medidas.

Sólo una de las plantas mutantes analizadas mostró un cambio significativo en el ritmo del movimiento de hojas bajo condiciones de libre curso. El período circadiano observado para ésta mutante fue 3 horas mayor que el de la plantas salvajes (29.09 ± 1.83 h y 24.20 ± 0.32 h, respectivamente, $p < 0.001$) (Fig. 13). Ésta era una planta con una mutación puntual en el gen *LSM5*, que codifica para un componente del complejo spliceosomal U6 snRNP. La mutante había sido originalmente identificada en una búsqueda de genes que controlaran la respuesta a estrés abiótico y fue nombrada súper sensible al ácido abscísico y sequia (*supersensitive to abscisic acid and drought, sad1*) (*Xiong et al. 2001*). La proteína *LSM5* posee dominios característicos de esta familia, dominio Sm I y dominio Sm II los cuales median la interacción proteína-proteína y proteína-ARN.

La mutante, de ahora en adelante llamada *sad1/lsm5,* posee una mutación puntual en un dominio alfa hélice por fuera del dominio Sm I. Ésta genera un cambio de un aminoácido glutámico altamente conservado de carga negativa por un aminoácido lisina de carga positiva.

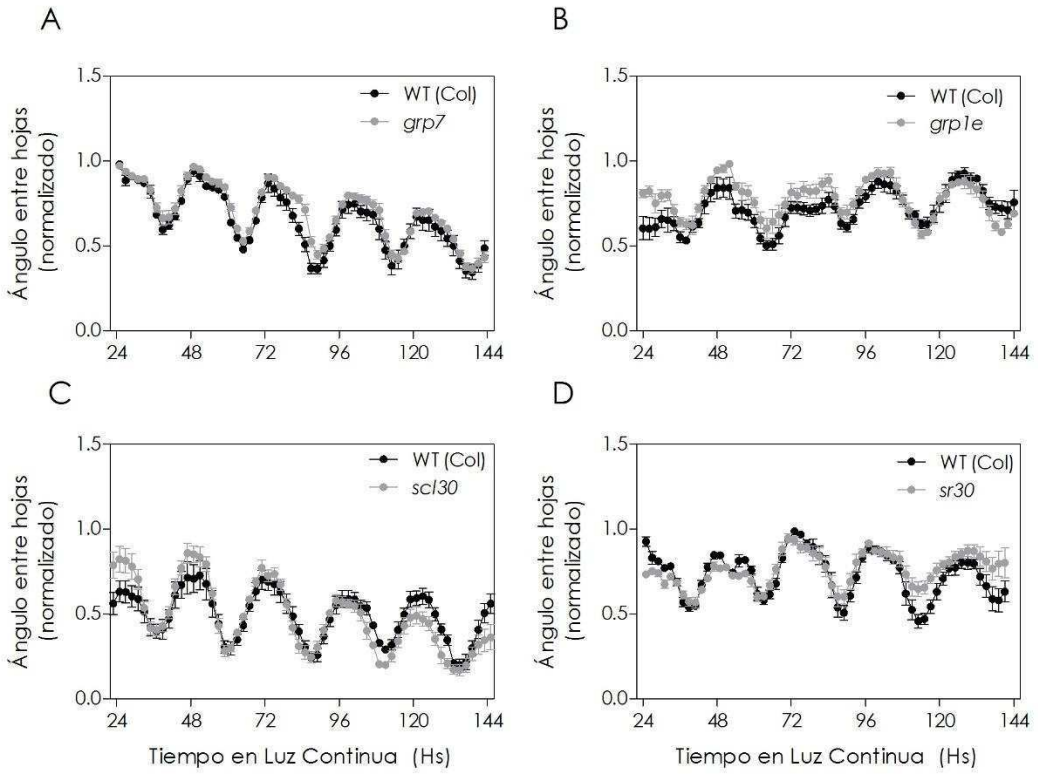


Fig. 12. Ritmo del movimiento de hojas de mutantes insercionales de T-DNA afectadas en genes relacionados al *splicing*. Se midió el ángulo del primer par de hojas en plantas entrenadas en fotoperiodo largo y luego transferidas a condiciones de luz continua. Los datos fueron normalizados al valor máximo de las plantas salvajes. Los datos corresponden a las siguiente mutantes insercionales de T-DNA: (A) *grp7*; (B) *grp1e*; (C) *scl30; (D) sr30* (n=6). Genotipo salvaje, WT (Col); línea negra. Mutantes insercionales de T-DNA, línea gris. La barra de error representa el desvío estándar (DE). Hs: Horas.

Para corroborar que el período circadiano observado era debido a la mutación puntual en el gen *LSM5*, se complementó la mutante *sad1/lsm5* con el gen *LSM5* salvaje controlado por su propio promotor. Para esto se transformaron plantas *sad1/lsm5* con 1.6kb del promotor y el gen entero de *LSM5* y luego de dos generaciones se usaron para analizar el ritmo del movimiento de hoja. Como se puede observar en la Fig. 13, las plantas *sad1/lsm5* complementadas con *LSM5* recuperan el ritmo de movimiento de hoja salvaje.

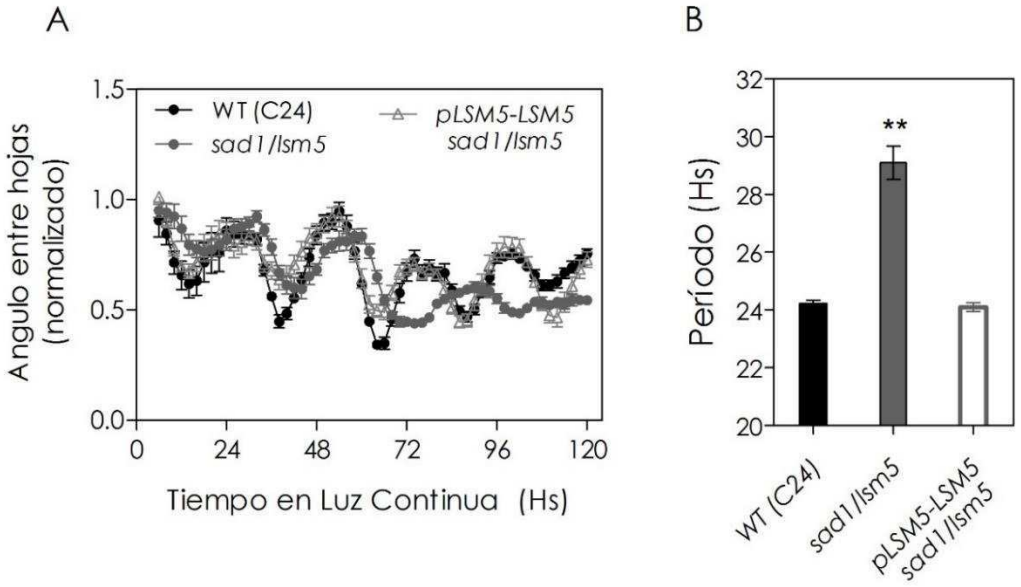


Fig. 13. Análisis del ritmo del movimiento de hojas en la mutante *sad1/lsm5*. (A) Ritmo del movimiento de hojas. Se midió el ángulo del primer par de hojas en plantas entrenadas en fotoperiodo largo y luego transferidas a condiciones de luz continua. Los datos fueron normalizados al valor máximo de las plantas salvajes. WT (C24): genotipo salvaje ecotipo C24 (círculos negros; n=6). Mutante *sad1/lsm5* (círculos grises; n=10). *pLSM5-LSM5 sad1/lsm5*: Plantas mutantes *sad1/lsm5* transformadas con la versión salvaje del gen *LSM5* (triángulo gris; n=9). (B) Período del ritmo del movimiento de hojas estimado por FFT-NLLS. Las barras de error representan el desvió estándar (DE). Hs: horas. **p < 0.001 (prueba *t* de *Student*).

Conclusiones

Se encontraron 83 genes spliceosomales cuyos ARNm son controlados por el reloj circadiano. El análisis del movimiento de hojas, un robusto proceso biológico controlado por el reloj, para mutantes de 13 genes de los 83 mostró que 12 de ellos no tenían afectada la función del reloj. Esto sugiere dos posibilidades: que los componentes spliceosomales analizados regulan el *splicing* de genes de vías de salida del reloj y no el propio reloj, o que actúan de forma redundante con otros genes para controlar la función de reloj, dado que la mayoría de los genes spliceosomales se encuentran duplicados.

Se encontró diferencias en el período del movimiento de hojas sólo para la mutante de uno de los 13 genes analizados. Ésta era una mutación en el gen *LSM5*, de la familia de proteínas asociadas a U6snRNP. Este gen es de copia única y la mutante no es nula, sino que posee una mutación puntual que posiblemente genere un cambio conformacional en la proteína afectando su funcionalidad. No fue posible estudiar una mutante nula para el gen *LSM5* debido a que no se encontraron plantas viables. Probablemente una mutante nula para el gen *LSM5* sea letal embrionaria.

CAPÍTULO II

Los genes LSMs y su rol en los ritmos circadianos en plantas y mamíferos.

Introducción

La familia de proteínas Sm y Sm-Like (LSM)

La familia de proteínas Sm fueron originalmente identificadas como blancos de los anticuerpos de una paciente con un tipo de lupus eritematoso sistémico, una enfermedad crónica, autoinmune y sistémica. Fueron nombradas Sm en honor a esta paciente Stephanie Smith (*Reeves et al. 2003*). Los anticuerpos anti-Sm reconocen a las proteínas Sm asociados a los U1, U2, U4 y U5 snARN. Asociadas a U6 snARN se encuentran otras proteínas que fueron encontradas también utilizando el anticuerpo anti-Sm dado que el U6 snARN forma los complejos U4/U6 y U4/U6-U5 snRNPs, los cuales contienen a proteínas Sm. Las proteínas asociadas específicamente al U6 snARN no son reconocidas por el anti-Sm y se las llamo similares a Sm (Sm-Like, LSM) (*Séraphin 1995*).

Los miembros de ésta familia de proteínas son ubicuos y se encuentran presentes no sólo en todos los eucariotas sino también en procariotas. Estos comparten al menos 4 características importantes. Primero, a nivel de estructura primaria, todas las proteínas conservan el dominio Sm (*Séraphin 1995*; *Salgado-Garrido et al. 1999*). Este dominio es bipartito y consiste del motivo Sm I y Sm II. El motivo Sm I posee 32 residuos, y es más largo y más cercano al extremo N-terminal que el motivo Sm II que posee 14 residuos (*Hermann et al. 1995*). Los dos dominios están separados por una región conectora no conservada de tamaño variable, que va de 8 a 22 residuos. Típicamente, son proteínas pequeñas (10-25kDa) donde el dominio Sm ocupa prácticamente todo el largo de la proteína. Segundo, la estructura terciara está altamente conservada. Ésta consiste de un extremo N-terminal con alfa hélice seguido de cinco hojas plegadas beta. Ésta estructura se conoce como "*sm fold*" (*Kambach et al. 1999*). Muchas veces la homología entre la estructura terciara de estas proteínas es más fuerte que la estructura primaria. Tercero, existen típicamente como complejos en forma de anillos heptaméricos. Cuarto, en general, los complejos de las proteínas son complejos de unión a ARN, que participan en funciones relacionadas con ARN como, decaimiento de ARNm, pre-ARNm *splicing*, procesamiento de ARN, regulación génica mediante ARN anti-sentido, entre otros (*Tharun 2009*).

Las proteínas Sm fundadoras de esta familia son siete y se las nombró en forma consecutiva según su tamaño B/B', D1, D2, D3, E, F, y G. Las proteínas LSM, homologas a cada una de seis proteínas Sm D1, D2, D3, E, F, y G se las llamó secuencialmente LSM2, LSM3, LSM4, LSM5, LSM6, y LSM7, respectivamente. Hay dos proteínas más, LSM1 y LSM8 que se relacionan débilmente con la proteína Sm-B (*Séraphin 1995*; *Achsel et al. 1999*; *Salgado-Garrido et al. 1999*).

Mediante análisis de estructuras cristalinas de sub-complejos de proteínas Sm y el conocimiento de la interacción entre proteínas Sm (*Camasses and Bragado-Nilsson 1998*), se generó un modelo en el cual las siete proteínas Sm forman un anillo mediante la interacción de sus láminas beta (*Kambach et al. 1999*). Varios ensayos de co-inmunoprecipitación sugieren que las proteínas LSM también forman un anillo de siete miembros (*Mayes et al. 1999*; *Salgado-Garrido et al. 1999*). Por un lado se encontró que siete proteínas LSM (LSM2 a LSM8) co-inmunoprecipitan con U6 (*Achsel et al. 1999*; *Stevens and Abelson 1999*). Del mismo modo, se encontró que otras siete proteínas LSM (LSM1 a LSM7) co-inmunoprecipitan con factores de decaimiento de ARNm (*Tharun et al. 2000*). Por último, estudios de microscopia electrónica de las proteína LSM2 a LSM8 purificadas de células humanas mostraron que forman una estructura de anillo de siete miembros, que a diferencia de las proteínas Sm se mantiene aún en ausencia de ARN (*Achsel et al. 1999*) (Fig. 14).

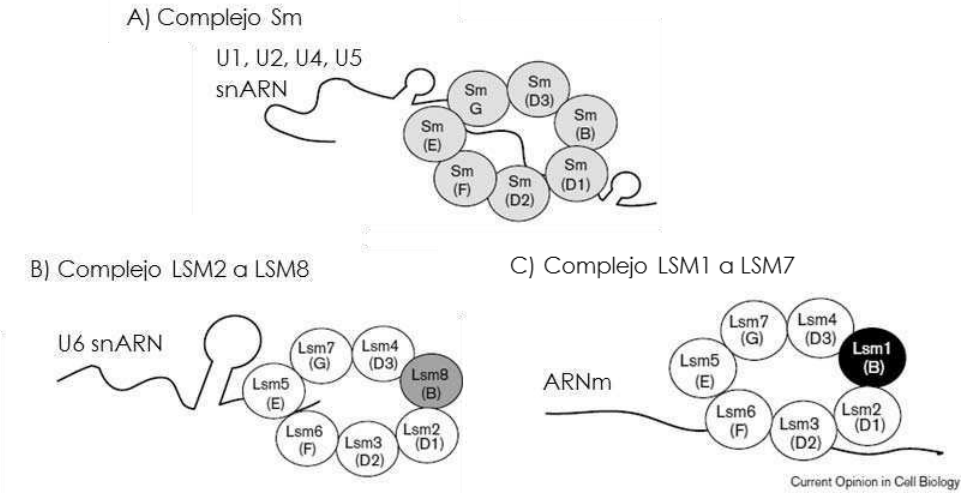


Fig. 14. Estructura de los complejos heptaméricos Sm y LSM. Las proteínas Sm y LSM forman complejos en forma de anillos heptaméricos que interactúan con distintos ARNs. A) Complejo de proteínas Sm unido a U1, U2, U4, U5 snARNs. B) Complejo de proteínas LSM2 a LSM8 unido a U6 snARN. C) Complejo de proteínas LSM1 a LSM7 unido a ARNm. Adaptado de *(He and Parker, 2000)*

Las proteínas LSM en *Arabidopsis thaliana*

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se identificaron 11 genes que codifican para las ocho proteínas LSM altamente conservadas en eucariotas. Los genes que codifican a las posibles LSM1, LSM3 y LSM6 se encuentran duplicados (*Wang and Brendel 2004*).

Recientemente dos trabajos realizaron una caracterización molecular y funcional de la familia de genes *LSM* en *Arabidopsis thaliana*. Encontraron que, así como en otros organismos eucariotas, las proteínas LSM de plantas están organizadas en dos complejos heptaméricos localizados en el citoplasma y en el núcleo (*Perea-Resa et al. 2012*; *Golisz et al. 2013*). El complejo citoplasmático, que involucra las proteínas LSM1 a LSM7, se encuentra involucrado en decaimiento de ARNm. El complejo nuclear, que involucra las proteínas LSM2 a LSM8, está involucrado en el *splicing* de pre-ARNm. Las proteínas LSM1 y LSM8 definen y confieren especificidad a cada complejo, mientras que las demás proteínas (LSM2 a LSM7) participan de ambos complejos.

La función del complejo LSM en *splicing* estaría relacionada principalmente con la función y estabilización del U6snRNP. Las mutantes *lsm2* y *lsm8* en levaduras muestran defectos que correlacionan con un nivel reducido de U6snARN (*Mayes et al. 1999*). Esta reducción también se observó en plantas mutantes para *sad1/lsm5* y *lsm8* pero no *lsm1a/lsm1b*. La expresión de las proteínas LSM5 y LSM8 en las respectivas mutantes restituye la expresión de U6snARN a niveles normales (*Golisz et al. 2013*). Por otra parte, la sobreexpresión de U6snARN puede compensar parcialmente la perdida de las proteínas LSM2 a LSM8, suprimiendo el defecto en el crecimiento de las mutantes *lsm2* a *lsm8* en levaduras (*Mayes et al. 1999*). Se cree que el complejo LSM2 a LSM8 afecta la función de U6snRNP facilitando varios re arreglos conformacionales que ocurren durante el ciclo de *splicing*. Se ha demostrado en células humanas que puede facilitar la formación del complejo U4-U6 y que se une mediante interacción directa al extremo 3' del U6 snARN *in vitro* (*Achsel et al. 1999*; *He and Parker 2000*). En plantas, inmunoprecipitación de ARNm mediante el uso de extractos de plantas que expresan a la proteína LSM8 con un *tag*, mostró interacción especifica del complejo LSM2 a LSM8 con U6 snARN (*Perea-Resa et al. 2012*; *Golisz et al. 2013*). Estos datos sugieren fuertemente que el complejo nuclear

LSM2 a LSM8 de plantas también tiene un papel en el *splicing* de pre-ARNm, como componente central U6 snRNP y en la estabilización del U6snARN. Se ha demostrado que los complejos U2 y U6 snARN libre de proteínas tienen la capacidad de funcionar como el dominio catalítico del spliceosoma, siendo esenciales para el correcto *splicing* de pre-ARNm (*Valadkhan and Manley 2001*).

Mecanismos de los ritmos circadianos en mamíferos.

En los mamíferos, el núcleo supraquiasmático (NSQ) en el hipotálamo es el reloj circadiano maestro de todo el cuerpo. El NSQ sincroniza las células individuales del cuerpo a un tiempo interno uniforme. El NSQ es entrenado por ciclos de luz del ambiente mediante foto-receptores exclusivos de los ojos (*Buhr and Takahashi 2013*).

El mecanismo molecular del reloj de mamíferos, así como en plantas, consiste de un circuito de retroalimentación transcripcional que involucra al menos 10 genes. El circuito comienza durante el día cuando dos factores de transcripción bHLH-PAS, *CLOCK* y *BMAL1*, heterodimerizan, se translocan al núcleo, e inician la transcripción de genes que contienen los elementos regulatorios en *cis* denominados *E-box* (5'-CACGTG-3') o *E'-box* (5'-CACGTT-3'), que incluyen a los genes *PER y CRY* (*King et al. 1997*; *Gekakis et al. 1998*; *Kume et al. 1999*; *Zheng et al. 1999*; *Bunger et al. 2000*; *Yoo et al. 2005*). Las proteínas PER y CRY heterodimerizan y, junto con otras proteínas como CK1ε (*Casein Kinase 1*) forman un complejo en el citoplasma que transloca al núcleo, donde se acumulan y subsecuentemente reprimen la transcripción de sus propios y otros genes mediante la inhibición directa de *CLOCK*:*BMAL1*. Es así como, el heterodimero *CLOCK*:*BMAL1* forma el componente positivo en el circuito, mientras que el complejo *PER:CRY* forma el componente negativo. Luego de varios pasos post-transcripcionales y post-traduccionales, el complejo *PER:CRY* es marcado para degradación vía proteasoma (Fig. 15). (*Lowrey and Takahashi 2011*).

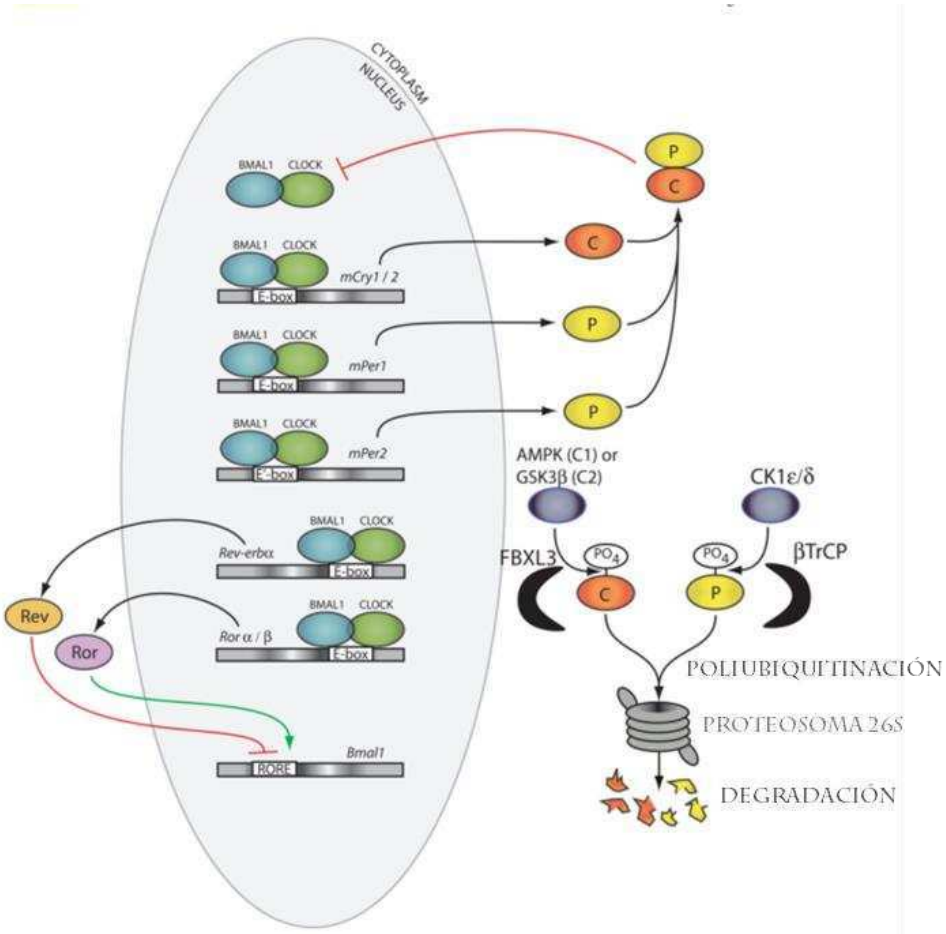


Fig. 15. Esquema del reloj molecular de mamíferos. El heterodimero *CLOCK:BMAL1* (óvalos verdes y azules) se unen al ADN de genes target del reloj e inician la transcripción de genes que contienen los elementos denominados E-box o E'-box, que incluyen a los genes *PER* y *CRY*. Como resultado las proteínas PER y CRY (óvalos rojos y amarillos) dimerizan en el citoplasma y translocan al núcleo donde inhiben que el dimero CLOCK: BMAL1 inicie la transcripción de nuevos genes. Adaptado de *(Buhr and Takahashi, 2013)*.

Resultados

Caracterización de procesos biológicos controlados por el reloj circadiano en la mutante *sad1/lsm5.*

Dado que la mutante *sad1/lsm5* afecta el ritmo del movimiento de hojas, nos decidimos a analizar el efecto de esta mutación sobre otros procesos biológicos controlados por el reloj circadiano (ver Fig. 4 en introducción general). Uno de los eventos más importantes en el desarrollo de las plantas es el pasaje del estado vegetativo al reproductivo, la transición a la floración. Para evaluar el efecto de la mutación *sad1/lsm5* sobre el tiempo de floración se crecieron plantas de los genotipos salvajes y mutantes en fotoperiodo de día largo y día corto. Las plantas mutantes *sad1/lsm5* tienen un retraso en el crecimiento, son aproximadamente 60% más pequeñas, con hojas verde oscuro y redondeas (*Xiong et al. 2001*). Se encontró que la mutante florecía antes que la planta salvaje (expresado en tiempo biológico), en las dos condiciones probadas (Fig. 16A). Luego estudiamos otro de los procesos biológicos controlados por el reloj circadiano, la inhibición del alargamiento del hipocotilo durante la des-etiolación. Se estudió la capacidad de respuesta de la mutante frente a condiciones de día largo y día corto. Se encontró que la mutante poseía un hipocotilo más largo respecto al largo del hipocotilo en la oscuridad en ambos fotoperiodos respecto a las plantas salvajes (Fig. 16B).

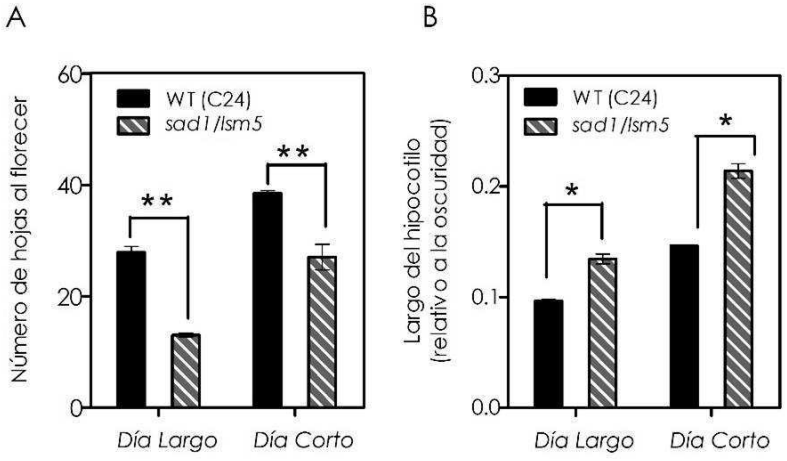


Fig. 16. Análisis de procesos fisiológicos en la mutante sad1/lsm5 (A) La floración se evaluó como el número de hojas de la roseta al momento de florecer en condiciones de día largo y de día corto. (B) Longitud del hipocotilo relativizado al largo del hipocotilo en oscuridad en condiciones de día largo y de día corto. WT (C24), genotipo salvaje. *lsm5/sad1* mutante para el gen *LSM5*. **p < 0.001; *p < 0.05 (prueba de t de Student). Las barras de error representan el DE.

Nos propusimos luego a analizar el efecto de la mutación *sad1/lsm5* sobre la expresión de los componentes centrales del reloj circadiano. Para ello se emplearon plántulas del genotipo mutante y salvaje, en distintas condiciones de entrenamiento. Por un lado, se crecieron plantas en condiciones de día largo y a las dos semanas se cosecharon cada 4 horas a lo largo de un día (Fig. 17). Por otro lado, y con el objetivo de analizar el funcionamiento del reloj endógeno en condiciones de libre curso, se realizó el mismo experimento pero las plántulas fueron entrenadas en condiciones de día largo y luego colocadas en condiciones de libre curso, donde los perfiles de expresión de los genes dependen exclusivamente del reloj endógeno (Fig. 18). Este experimento permite visualizar efectos que pasan desapercibidos en condiciones de entrenamiento, en las que los estímulos ambientales, la luz en este caso, re-sincronizan diariamente al reloj. Para ambos experimentos, se extrajo ARN total y se realizó una RT-qPCR utilizando *primers* específicos para los genes del oscilador central *CCA1*, *LHY*, *PRR9*, *PRR7*, *PRR5* y *TOC1* de *Arabidopsis thaliana*.

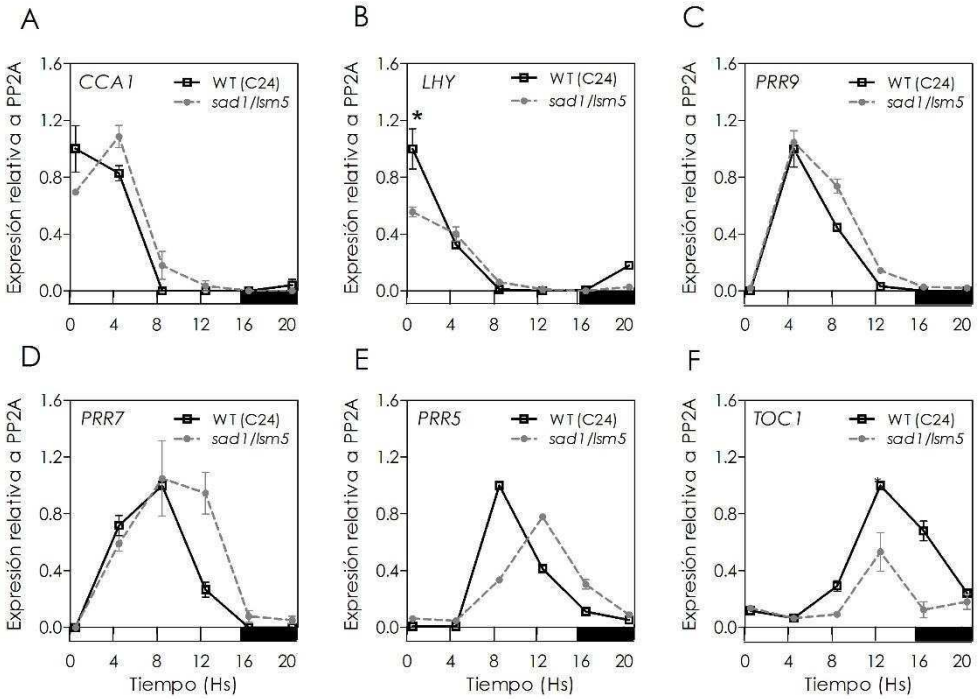


Fig. 17. Análisis de la expresión de genes del oscilador central en condiciones de luz/oscuridad en la mutante *sad1/lsm5*. Expresión de los genes (A) *CCA1*, (B) *LHY*, (C) *PRR9*, (D) *PRR7*, (E) *PRR5* y (F) *TOC1*, medida por qPCR en plántulas entrenadas en día largo y cosechadas cada 4h. WT (C24) (línea negra), mutante *sad1/lsm5* (línea gris punteada). Los datos fueron relativizados a los valores registrados para el gen de PP2A y normalizaron al valor máximo de las plantas salvajes de cada gen. Los datos representan el promedio de tres réplicas biológicas. Barras de error representan el DE. *p<0.05 (prueba de t de Student). Las cajas blancas y negras, indican el día y la noche, respectivamente.

En condiciones de entrenamiento en día lago se encontró un retraso de fase en la mutante para los genes *CCA1*, *PRR7* y *PRR5* (Fig. 17 A, D, E), lo cual es consistente con el fenotipo período largo observado en su movimiento de hojas. Se observó también una reducción en los niveles generales de ARNm en *LHY* y *TOC1* (Fig. 17 B, F), aunque es incierto como y si esta reducción provoca el fenotipo de período largo en la mutante.

En condiciones de libre curso, se encontraron alternaciones en los patrones de expresión en la mutante para todos los genes analizados. Particularmente, los niveles de los genes de la mañana *CCA1* y *LHY* se vieron significativamente reducidos (Fig. 18 A, B). A su vez, la expresión de los genes de mediodía *PRR9* y *PRR7* mostraron un atraso en sus picos de expresión de aproximadamente 8 horas (Fig. 18 C, D), mientras que los picos de expresión de los genes de la noche *PRR5* y *TOC1* se vieron atrasados 4 horas (Fig. 18 E, F), sin cambios significativos en los niveles globales de mensajeros.

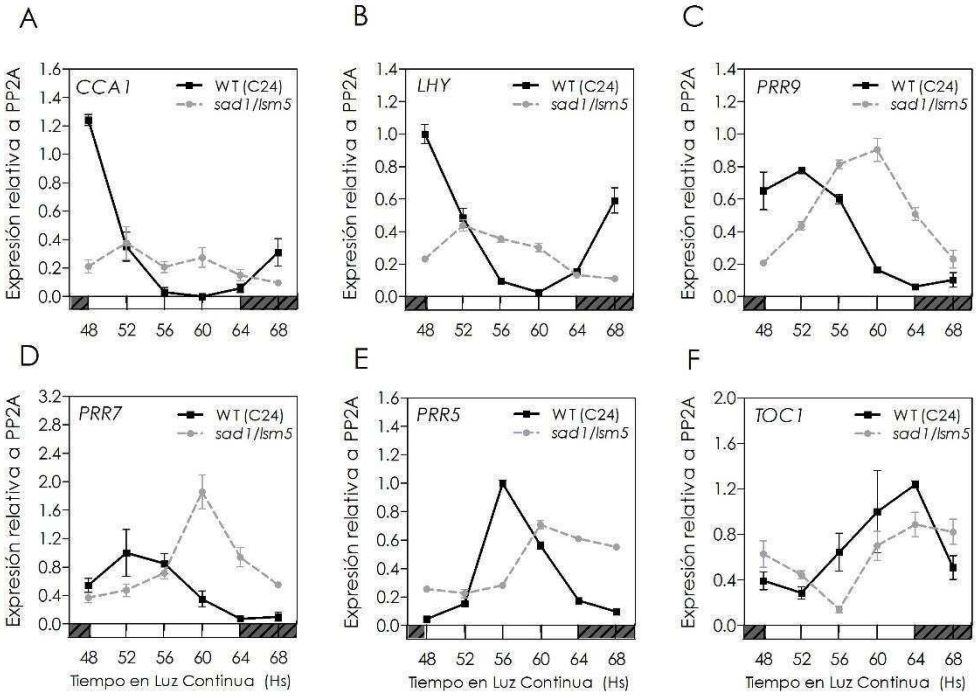


Fig. 18. Análisis de la expresión de genes del oscilador central en condiciones de libre curso en la mutante *sad1/lsm5*. Expresión de los genes A) *CCA1*, (B) *LHY*, (C) *PRR9*, (D) *PRR7*, (E) *PRR5* y (F) *TOC1*, medida por qPCR en plántulas entrenadas en día largo, luego transferidas a condiciones de luz continua y cosechadas el 3er día cada 4h. WT (C24) (línea negra), mutante *sad1/lsm5* (línea gris punteada). Los datos fueron relativizados a los valores registrados para el gen de PP2A y normalizaron al valor máximo de las plantas salvajes de cada gen. Los datos representan el promedio de tres réplicas biológicas. Barras de error representan el DE. Las cajas blancas y rayadas grises, indican el día y la noche subjetiva, respectivamente.

Análisis de los ritmos circadianos en la mutante *lsm4-1* de *Arabidopsis thaliana*.

Dado que la proteína LSM5 está formando un anillo con otras 6 LSM, nos preguntamos si mutaciones en estos genes también afectaban al reloj circadiano. Observando la lista inicial de genes relacionados al *splicing* regulados por el reloj, se encontró que los ARNm de los genes *LSM1a*, *LSM1b* y *LSM3b* también oscilaban. En la Fig. 19 se puede observar los perfiles de los cuatro genes *LSM* cuyos ARNm oscilan en *Arabidopsis thaliana* según los datos de (*Edwards et al. 2006*) que se recopilaron en (*Covington et al. 2008*).

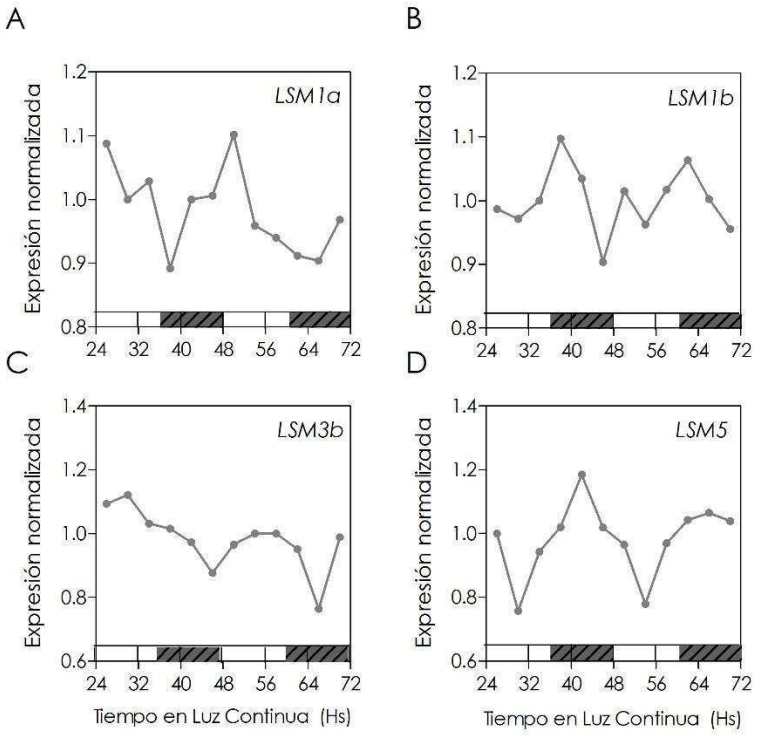


Fig. 19. Expresión circadiana de los genes *LSM* de *Arabidopsis thaliana*. Expresión circadiana de (A) *LSM1a*, (B) *LSM1b,* (C) *LSM3b*, (D) *LSM5* según los datos de (*Edwards et al. 2006*), los cuales corresponden a los 4 genes *LSM* que se encontraron en la superposición de los 83 genes candidatos. Los datos se obtuvieron de muestras de ARN de plantas salvajes crecida en ciclos de 12h luz, 12h oscuridad y luego transferidas a luz continúa. Se colectaron muestras cada 4h, comenzando a las 26hs luego de la última transición de oscuridad a luz. La expresión fue normalizada a la expresión promedio de todos los puntos para cada gen.

Luego nos dispusimos a buscar mutantes para estos genes, aunque la mayoría de las inserciones de T-DNA en mutantes *lsm* causan letalidad. Sólo una mutante por inserción de T-DNA para el gen *LSM4* (Fig. 20 A), que había sido previamente caracterizada por Zhang et al. (*Zhang et al. 2011*), era viable, aunque mostraba un severo retraso en el desarrollo comparado a plantas

salvajes y era infértil (Fig. 20 B). Dado que la planta homocigota *lsm4-1* no da semillas, se tuvo que trabajar con plantas heterocigotas segregantes. Primero verificamos que las plantas *lsm4-1* homocigotas eran mutantes nulas. Para esto se crecieron plantas heterocigotas en luz continua y al cabo de 10 días se cosecharon plantas salvajes y plantas homocigotas seleccionadas por su fenotipo, como se observa en el recuadro de la Fig. 20 B. Se observó que las plantas homocigotas *lsm4-1* no poseían ARNm para *LSM4*. Se puede decir entonces que *lsm4-1* es una mutante nula por inserción de T-DNA (Fig. 20 C).

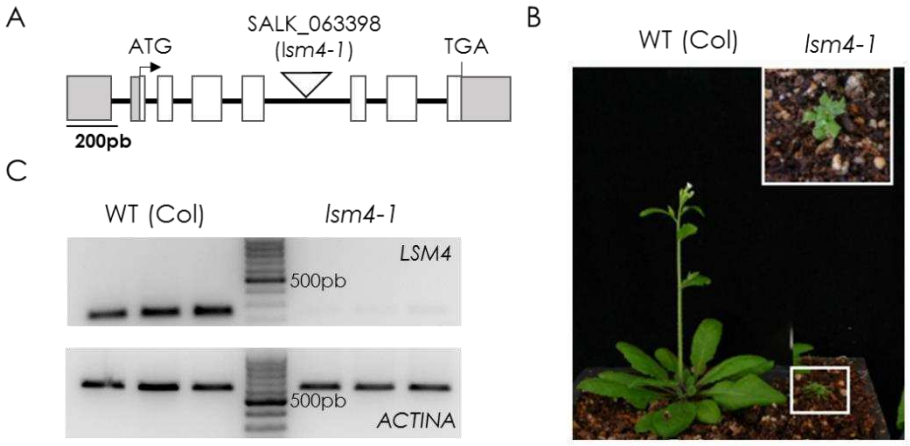


Fig. 20. Caracterización de la mutante *lsm4-1*. (A) Estructura del gen *LSM4*. Los intrones están representados por líneas y los exones por rectángulos; las porciones blancas indican regiones codificantes y las grises, no codificantes. El triángulo invertido marca el lugar de inserción del T-DNA (B) *Arabidopsis thaliana* salvaje WT (Col) y la mutante *lsm4-1*, crecidas en día largo por 35 días. (C) Expresión de LSM4 medida por RT-PCR para plantas salvaje WT (Col) y para el alelo nulo *lsm4-1*. El gen de ACTINA fue utilizado como control de carga. Se muestra la banda de 500 bp en el marcador de peso molecular.

Para analizar el efecto de la mutación *lsm4-1* sobre los ritmos circadiano se transformaron plantas heterocigotas con reporteros bioluminiscentes para medir las oscilaciones en la expresión de la proteína luminiscente luciferasa, guiados por los promotores del gen *CCA1*, uno de los genes centrales del oscilador y *CCR2*, un conocido gen controlado por el reloj. No se pudo realizar estudios de ritmicidad mediante la medición del movimiento de hojas dado el pequeño tamaño de la planta mutante. Como puede observarse en la Fig. 21, la mutante *lsm4-1* muestra un período circadiano más largo que las plantas salvajes en condiciones de libre curso para los dos genes estudiados, 26.24 ± 0.70 h vs 23.91 ± 0.73 h para el reportero *CCA1*::Luc y 27.07 ± 1.47 h ($p<0.001$) vs 23.64 ± 0.50 h ($p<0.05$)para el reportero CCR2::Luc. El fenotipo co-segrega totalmente con la inserción de T-DNA en gen *LSM4*.

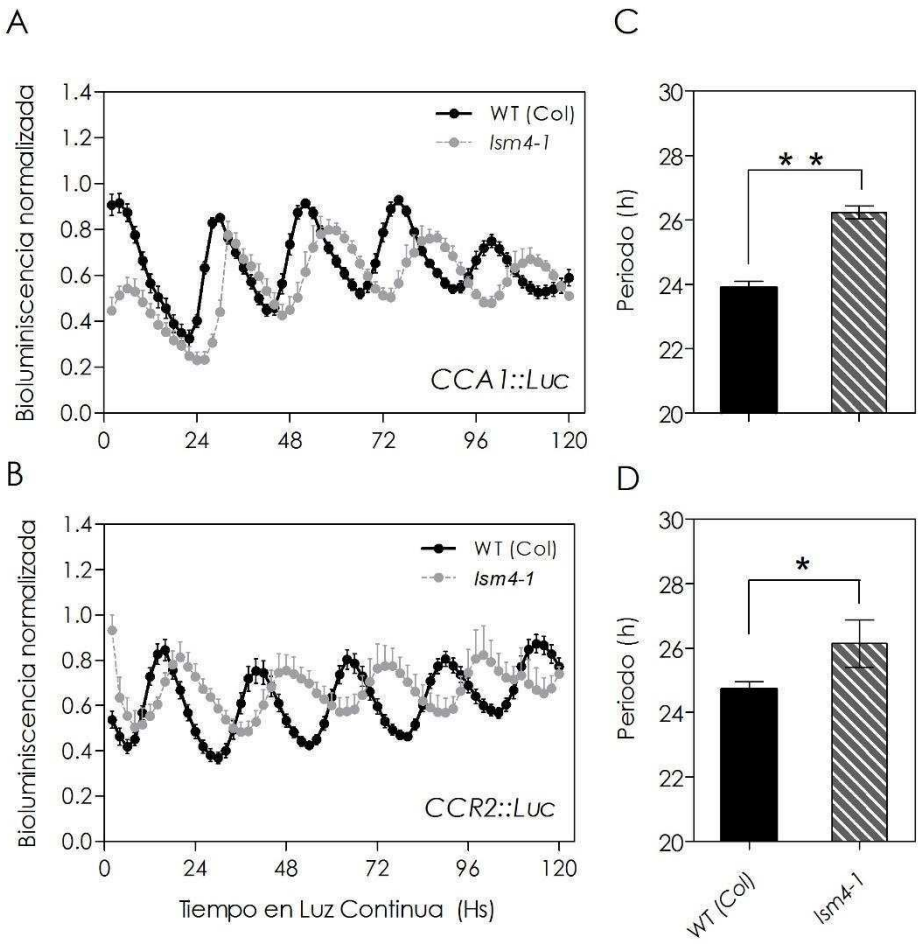


Fig 21. Análisis de los ritmos circadianos en la mutante *lsm4-1*. Medición de bioluminiscencia emitida por plántulas que llevan la construcción (A) *CCA1::Luc* y (B) *CCR2::Luc*, entrenadas en fotoperiodo de día largo y luego transferidas a luz continua. Las mediciones se tomaron cada 2h por 5días. La bioluminiscencia normalizada se calculó como el valor detectado dividido el máximo registrado. Plantas salvajes WT (Col) (círculos negros); mutante *lsm4-1* (círculos grises). (C y D) Estimación del período circadiano calculado a partir del ritmo en la bioluminiscencia. Los valores representan la media y la barra de error, el desvío estándar (n=3-14). ** p<0,001, * p<0,05 (Prueba de t-Student).

Analisis de los ritmos circadianos en genes *LSM* de mamífero.

Dada la importancia del complejo U6 snRNP en la regulación del *splicing* en organismos eucariotas, se evaluó la regulación circadiana de genes *LSM* de mamífero usando la base de datos CircaDB (*Pizarro et al. 2013*), que contiene perfiles transcripcionales de células humanas (*Hughes et al. 2009*) y varios órganos de ratón (*Panda et al. 2002*; *Rudic et al. 2004*; *Miller et al. 2007*; *Andrews et al. 2010*). Para ello se buscó en el NSQ de ratones si los ARNm de genes *LSM* mostraban perfiles circadianos. Se encontró fuertes oscilaciones circadianas de los ARNm para los genes *LSM3, LSM4, y LSM7* en el NSQ de *Mus musculus* (Fig. 22).

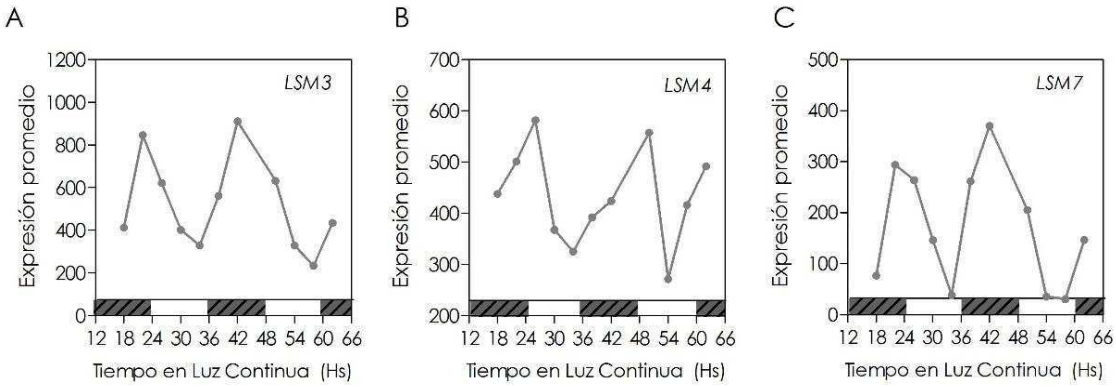


Fig. 22. Expresión circadiana de los genes *LSM* en *Mus musculus*. Expresión circadiana de ARNm de los genes (A) LSM3, (B), LSM4, (C) LSM7 en NSQ de ratón según los datos de (*Panda et al. 2002*). Los ratones C57BL/6J se entrenaron en ciclos de 12h luz/12h oscuridad por dos semanas y luego fueron transferidos a oscuridad constante. Se colectaron muestras cada 4h, comenzando 18h después de ser transferidos a oscuridad constante.

Para establecer si estos genes influencian la función del reloj en células humanas, se utilizó el portal BioGPS (*Wu et al. 2009*). Este contiene la información de estudios mediante ARN de interferencia pequeños (siARN), donde se redujo la expresión de alrededor de 1000 genes en células humanas U2OS y se analizaron los ritmos circadianos mediante el reportero bioluminiscente controlado por el promotor de uno de los genes centrales del oscilador en humanos, *Bmal1-dLuc*, (*Zhang et al. 2009*) (Fig. 23).

Se observó que la utilización de dos siARN diferentes sobre el gen *LSM7* generaba un fenotipo de período largo similar al generado por siARN que afectan la expresión de *CRY2*, otro gen central del oscilador de humanos (Fig. 23 G, H). También se observó un fenotipo de período largo sólo para uno de los pares de siARN sobre los genes *LSM3* y *LSM5*. (Fig. 23 A, F). Para un segundo par de siARN, las oscilaciones circadianas se vieron fuertemente reducidas, probablemente a causa de la nocividad de afectar la expresión de estos genes (Fig. 23 B, E). Este fenotipo se observó también luego de disminuir la expresión de *LSM4* con ambos pares de siARN (Fig. 23 C, D).

Para verificar el fenotipo observado para los genes *LSM3 y LSM5* sobre los ritmos circadianos, se generó una colaboración con el laboratorio del Dr Hogenesch en la Universidad de Pennsylvania, los cuales habían realizado los experimentos que se encuentran disponibles en el portal BioGPS. Se decidió repetir el experimento con el reportero biolumiscente *Bmal1-dLuc* pero utilizando una combinación de cuatro siARN contra los genes *LSM3 y LSM5*.

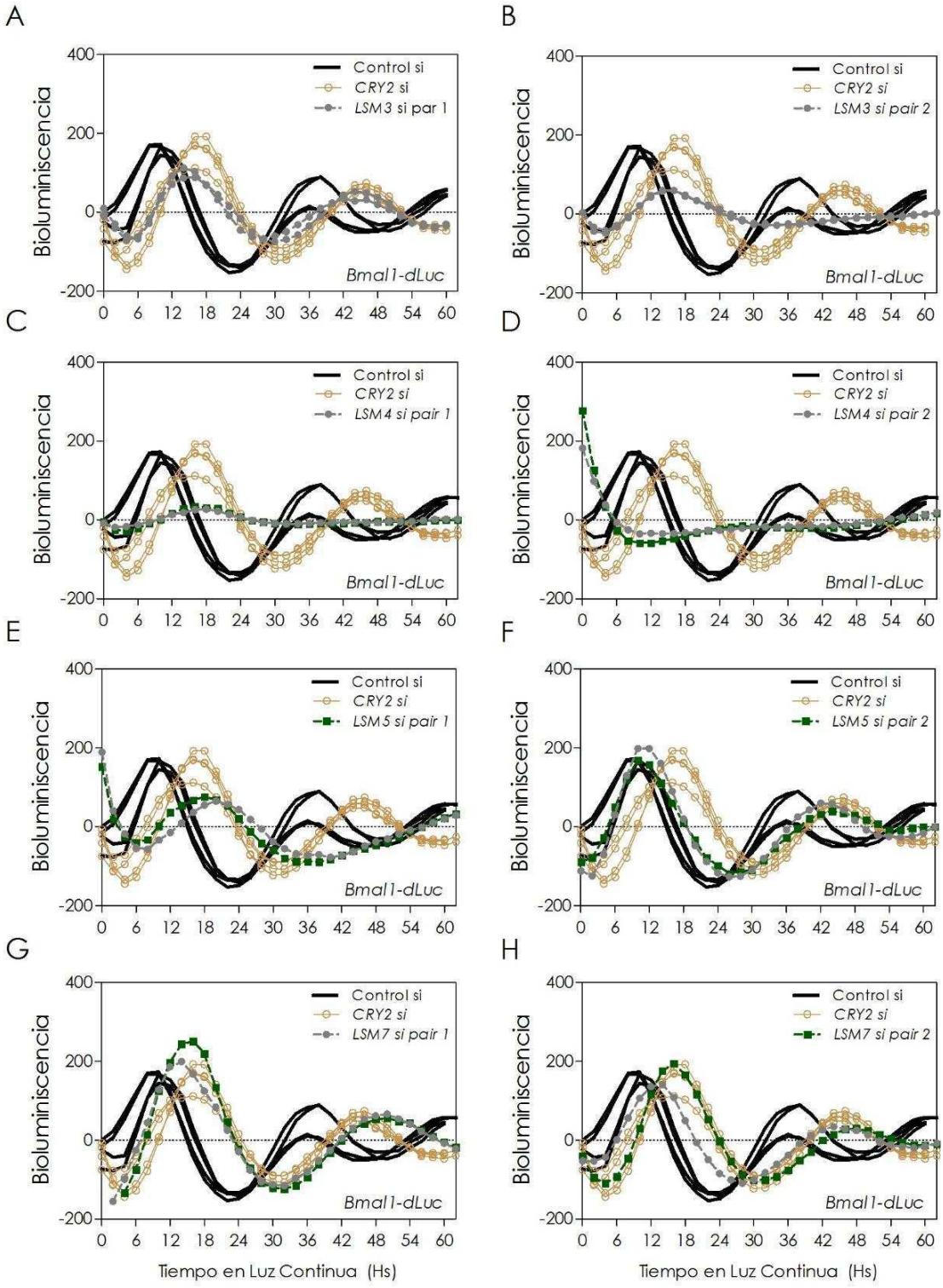


Fig. 23. Perfiles circadiano del reportero *Bmal1::Luc* frente a la disminución de la expresión de genes *LSM* en células humanas. Perfiles observados en las células humanas U2OS con el reportero Bmal1-dLuc luego de la diminución de la expresión mediada por siARN de (A,B) LSM3, (C,D) LSM4, (E,F) LSM5 y (G,H) LSM7, según datos de (*Zhang et al. 2009*). Se muestran los datos para dos pares de siARN distintos.

Primero se confirmó que los siARN generaran una disminución de la expresión del ARNm de *LSM3 y LSM5* utilizando la técnica de qPCR. Como se observa en la Fig. 24 A y B, ambos siARN generaron una notable disminución de la expresión. Entonces se prosiguió a realizar el experimento con este grupo de siARN sobre células humanas con el reportero *Bmal1-dLuc*. Se observó que la disminución de la expresión de *LSM3 y LSM5* en células humanas generaba un fenotipo de período circadiano alargado (Fig. 24 C y D). Para siLSM3 se encontró un período de 26.30 ± 0.13h comparado con el control 24.41 ± 0.11h ($p<0.001$). Por otro lado, para siLSM5 se encontró un período de 25.78 ± 0.25h comparado con el control 24.41 ± 0.11h ($p<0.05$).

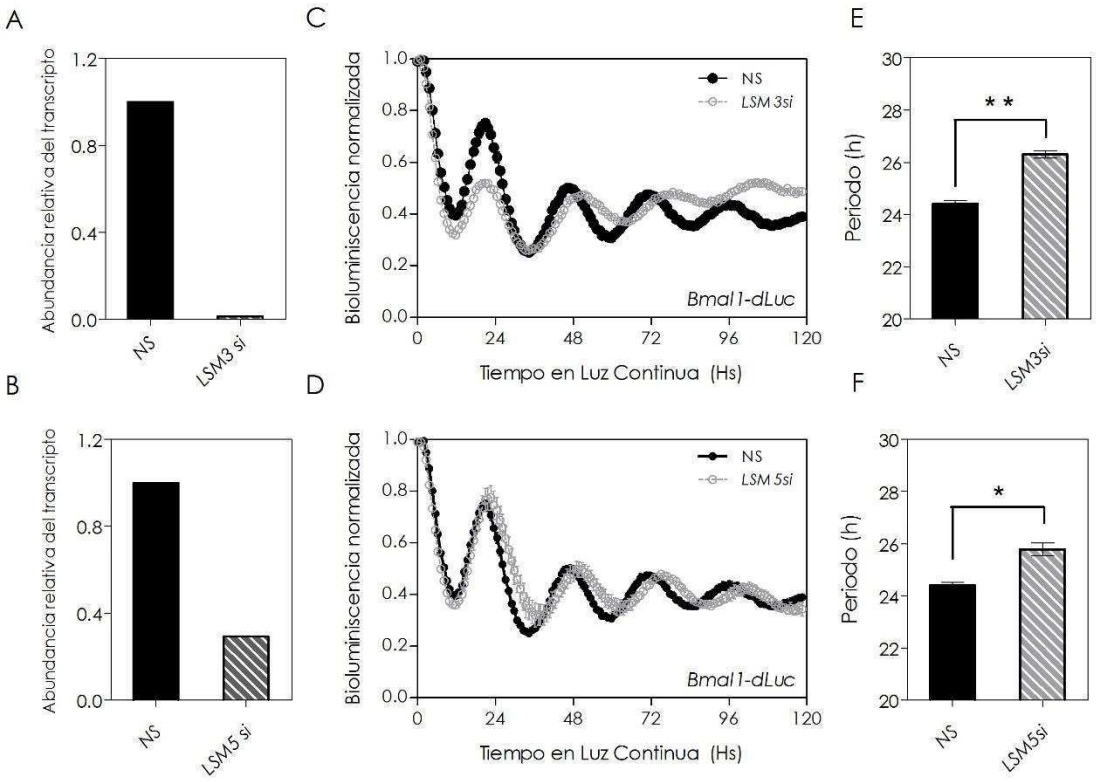


Fig. 24. Análisis del efecto de la disminución de la expresión de genes *LSM* sobre los ritmos circadianos en células humanas. (A, B) Validación de la disminución de la expresión de los genes *LSM3* y *LSM5* en células humanas U2OS. (C, D) Actividad del reportero *Bmal1-dLuc* en células humanas U2OS medido cada 1 hora por 5 días. NS, Control negativo siRNA (negro); LSMsi, disminución de la expresión mediante siARN de los genes *LSM* (gris). (E, F) Estimación del período del reloj circadiano calculado a partir del ritmo en la bioluminiscencia. Los datos representan el promedio de bioluminiscencia de tres replicas. Hs: Horas. *p<0,05; **p<0,001 (Prueba t de Student).

Conclusiones

En este capítulo se estudió el efecto de la mutación *sad1/lsm5* sobre la función del reloj analizando distintos procesos biológicos controlados por el reloj circadiano. Se observó que el tiempo de floración de plantas mutantes *sad1/lsm5* era más corto, expresado en número de hojas, en comparación a la planta salvaje. El tiempo de floración corto no concuerda con el fenotipo de período largo observado para el movimiento de hojas en *sad1/lsm5*. Sin embrago LSM5 podría estar afectando la expresión o el procesamiento de genes vinculados al control de momento de floración independiente del reloj circadiano.

También se observó un hipocotilo más largo relativo a oscuridad para las plantas *sad1/lsm5* en comparación a las plantas salvajes. Se puede decir entonces que las mutantes *sad1/lsm5* son hiposensibles a señales lumínicas

Luego se analizó otro proceso controlado por el reloj, la expresión de genes del oscilador central en la mutante *sad1/lsm5*. Lo que se observó fue un retraso en el pico de expresión para algunos de los genes del reloj analizados en condiciones de entrenamiento en día largo. En condiciones de libre curso se observaron retrasos en los picos de expresión para todo los genes analizados. Esto es consecuente con el fenotipo de período largo observado en el movimiento de hojas para esta mutante.

Estos experimentos permiten concluir que la mutación *sad1/lsm5* afecta al reloj circadiano, ya que se encontraron alterados varios procesos biológicos controlados por él. Entonces, el gen *LSM5* podría regular de alguna manera el oscilador central, y como su propia expresión se encuentra controlada por el reloj circadiano, éste formaría parte de un circuito regulatorio del oscilador central desconocido hasta el momento.

Para analizar más en profundidad el posible rol de los genes *LSM* en la regulación de los ritmos circadianos, analizamos el efecto que tenían la mutación de otros genes *LSM* sobre el reloj circadiano en *Arabidopsis thaliana*. La única mutante viable para genes *LSM* que se encontró fue para el gen *LSM4*. La mutante *lsm4-1* carece de ARNm funcional y el gen es de copia única. Esto nos permitió el estudio del efecto de una mutación fuerte sobre los ritmos

circadianos. Lo que se observó fue un período alargado de la expresión del gen del oscilador central *CCA1* y del gen controlado por el reloj *CCR2* en plantas mutantes *lsm4-1*. A diferencia de *LSM5*, el ARNm de *LSM4* no se encuentra controlado por el reloj. Sin embargo, dado que LSM4 y LSM5 son parte del mismo complejo, la actividad de LSM4 estaría indirectamente controlada por el reloj a través del efecto de este sobre LSM5. También es posible que la alteración de cualquiera de los genes *LSM* que forman parte del complejo LSM2-8 afecten la regulación del reloj.

El complejo U6 snRNP es de suma importancia en la regulación del *splicing* en todos los organismos eucariotas, y por eso que se decidió evaluar si genes *LSM* también se encontraban regulados por el reloj en mamíferos. Se observó, mediante la utilización de la base de datos CircaDB, que los ARNm de *LSM3, LSM4 y LSM7* oscilaban en el NSQ de ratón. También se observó en células humanas que tenían disminuida la expresión de los genes *LSM3*, *LSM5* y *LSM7*, un alargamiento en el período de expresión del reportero Luc controlado por el promotor del gen central del reloj *Bmal1*.

Tomando en conjunto estos resultados, los mismos proveen una fuerte evidencia de que los genes *LSM* regulan los ritmos circadianos en plantas y mamíferos, mediante el control del oscilador central.

CAPITULO III

Análisis global del transcriptoma de las mutantes sad1/lsm5 y lsm4-1

Introducción

LSM5 y el *splicing* alternativo

En uno de los trabajos recientes que caracterizó a las *LSM* de *Arabidopsis thaliana*, observaron que en las mutantes *sad1/lsm5* la expresión de U6snARN estaba reducida y había acumulación de precursores de ARN (*Golisz et al. 2013*). Por otro lado, el grupo de investigación que había descripto por primera vez a la mutante *sad1/lsm5*, investigó el posible rol regulatorio de la proteína LSM5 sobre el *splicing*. Para ello utilizó la técnica de secuenciación masiva de ARN (RNA-Seq) para estudiar la mutante *sad1/lsm5* y una sobre-expresante para el gen LSM5 (*Cui et al. 2014*). Lo que encontraron fue que LSM5 controla la eficiencia del *splicing* y el reconocimiento del sitio de *splicing* de varios eventos, pero es particularmente requerida para la regulación de la eficiencia de *splicing* de genes de respuesta a estrés. El *splicing* de pocos intrones se vio afectado, lo que podría deberse a un rol especifico de LSM5 en el *splicing* de genes de estrés, o podría ser el reflejo de la naturaleza débil de la mutación *sad1/lsm5*.

Para estudiar el efecto global de las mutaciones en los genes *LSM* decidimos utilizar la técnica de secuenciación masiva de ARN (RNAseq) sobre la mutante *sad1/lsm5* y sobre la mutante *lsm4-1*, una mutante fuerte debido a que carece de ARNm funcional.

Resultados

Análisis de la expresión global en las mutantes *sad1/lsm5 y lsm4-1.*

Para realizar la técnica de secuenciación masiva de ARN, se prepararon y secuenciaron bibliotecas de ADNc de tres replicas biológicas independientes de cada una de las mutantes y sus accesiones salvajes correspondientes. Se mapearon las lecturas resultantes al genoma de *Arabidopsis thaliana* (versión TAIR10) y se evaluaron cambios en la expresión de genes, en *splicing* de eventos alternativos anotados y un análisis profundo del *splicing* de todos los intrones presentes en genes expresados sobre un umbral.

Se identificaron cambios en la expresión de 1845 genes en la mutante *sad1/lsm5*, 6578 en la mutantes *lsm4-1* y 759 estaban compartidos en ambas mutantes, de un total de 21.806 genes expresados (Fig. 25 A). Entre estos, se buscó identificar genes del oscilador central o genes controlados por vías de salidas del reloj, tales como genes vinculados al control del tiempo de floración y respuestas al desarrollo reguladas por la luz. Mientras que ningún gen del oscilador se encontró afectado de la misma manera en las dos mutantes *lsm*, se encontró que la expresión de *FT* y *MAF5*, dos genes claves del control del tiempo de floración estaban aumentados y disminuidos, respectivamente en ambas mutantes (Fig. 25B). Del mismo modo, se encontraron cambios en común en la expresión de *RRC1* y *LAF3*, dos genes involucrados en la regulación de las respuestas fotomorfogénicas en *Arabidopsis thaliana*, la cual se encontró aumentada y disminuida respectivamente en ambas mutantes (Fig. 25B). Finalmente se encontró en ambas mutantes un aumento en la expresión de *DREB19*, un factor de transcripción involucrado en la activación de la respuesta a estrés abiótico, y una disminución en la expresión de *ABA4*, un gen que se requiere para la biosíntesis de ABA en condiciones de estrés (Fig.25B).

Luego se realizó un análisis de las ontologías de genes asociados con genes alterados comúnmente en las mutantes. Este reveló un enriquecimiento en genes implicados principalmente en regulación de la transcripción y respuestas de estrés (Fig. 25 C) (α=0,05; Test de Fisher).

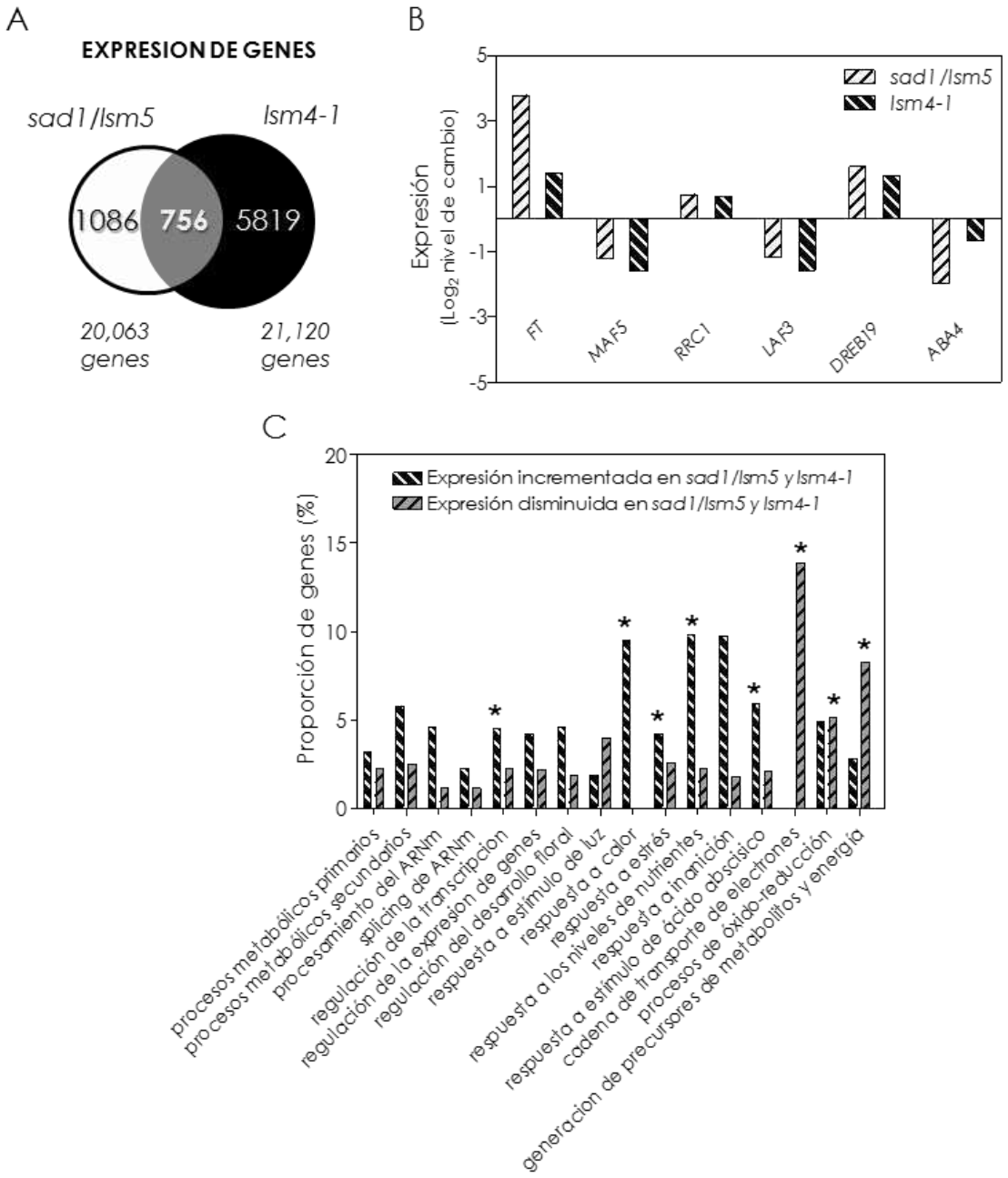


Fig. 25. Análisis de la expresión a nivel global de las mutantes *lsm4-1 y sad1/lsm5*. (A) Diagrama de Venn comparando genes con expresión génica alterada en las mutantes *lsm4-1* y *sad1/lsm5* respecto de las salvajes. (B) Cambio en la expresión de un subconjunto de genes representado como el log2 del nivel de cambio para cada mutante relativo a su accesión salvaje. n=3. (C) Proporción de genes con expresión incrementada o disminuida en ambas mutantes para los términos de ontología de genes (GO) seleccionados, de acuerdo a la herramienta on-line Virtual-Plant 1.3. * p<0,05 (Test de Fisher).

Análisis del *splicing* alternativo en las mutantes *sad1/lsm5 y lsm4-1*

Luego se evaluó particularmente las alteraciones en eventos de *splicing* alternativo anotados, en ambas mutantes. El análisis encontró un total de 6.567 eventos alternativos anotados correspondientes a genes expresados sobre un umbral mínimo en las mutantes y sus correspondientes plantas salvajes. De estos, 363 eventos estaban alterados en la mutante *lsm4-1* y 57 en la mutante *sad1/lsm5*, con 24 eventos alternativos igualmente cambiados en ambas mutantes, una superposición 7,6 veces mayor de lo esperado por azar ($p<0.001$ test de Fisher) (Fig. 26A). En la Fig. 26B se muestran dos ejemplos representativos de alteraciones en el *splicing* alternativo observadas en las mutantes utilizando el navegador de genoma integrativo (*Integrative Genome Browser*, IGB) (*Nicol et al. 2009*). En plantas salvajes, el evento de *splicing* alternativo más abundante fue asociado con la selección alternativa del sitio de reconocimiento de *splicing* 3' (3'SS; 33%), seguido de la retención de intrón (RI; 32%), selección alternativa del sitio de reconocimiento de *splicing* 5' (5'SS; 22%) y exclusión de exón (EE; 13%) (Fig. 26C). Entre los eventos de *splicing* alternativo afectados en las mutantes *lsm4-1 y sad1/lsm5*, se encontró un aumento en la proporción de eventos de retención de intrón, lo cual es consistente con lo reportado previamente para la mutante *sad1/lsm5* (*Golisz et al. 2013*; *Cui et al. 2014*).

Por otro lado, también se evaluó el *splicing* de todos los intrones presentes en los genes expresados sobre un umbral mínimo. Dentro de los 87.241 intrones analizados se detectaron alteraciones en el *splicing* de 553 y 4.354 intrones en *sad1/lsm5 y lsm4-1* respectivamente, siendo 212 de ellos afectados de la misma manera en ambos mutantes, una superposición de 7,7 veces mayor de lo esperado por azar ($p<0.001$ test de Fisher) (Fig. 26D). En la Fig. 26E se muestran ejemplos representativos de alteraciones en el *splicing* constitutivo de intrones observadas en las mutantes utilizando el IGB. En un análisis más profundo se observó que la proporción de eventos de retención de intrón incrementada entre las mutantes *lsm* era el doble para eventos de retención de intrón anotados como alternativos que para intrones considerados constitutivos (o al menos no anotados como alternativos) (Fig. 26F).

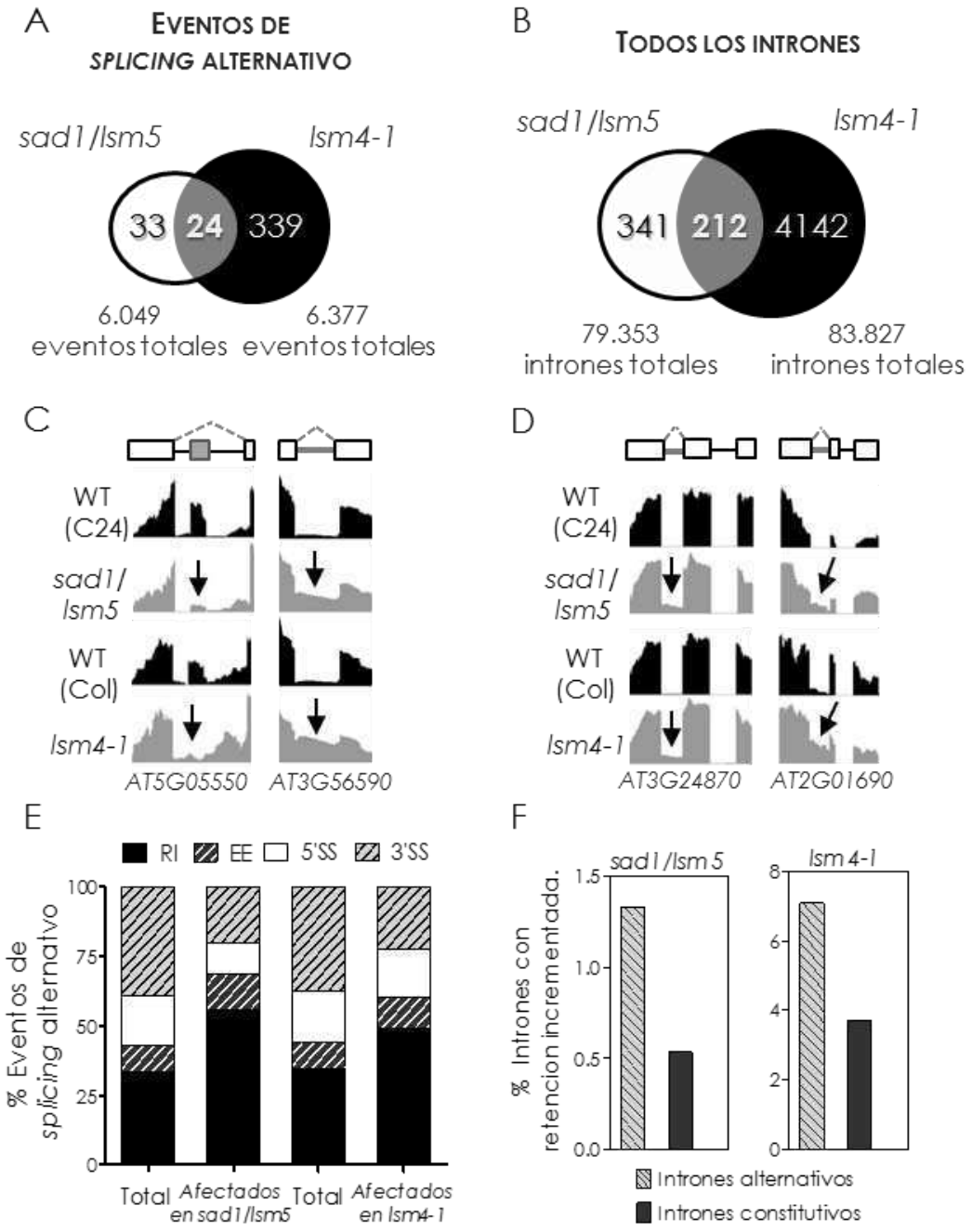


Fig. 26. Análisis a nivel global mediante *RNAseq* del *splicing* alternativo y constitutivo en las mutantes *sad1/lsm5* y *lsm4-1*. Diagramas de *Venn* mostrando alteraciones en el *splicing* afectando, (A) eventos alternativos o (B) todos los intrones en las mutantes lsm4 y sad1/lsm5. (C y D) Ejemplos de RI y EE usando el programa IGB. La flecha negra marca el evento de interés. (E) Frecuencia relativa de los diferentes tipos de *splicing* alternativo para todos los eventos de *splicing* alternativo detectados. 3'SS y 5'SS, selección alternativa del sitio de reconocimiento de splicing 3' y 5' respectivamente; EE, exclusión de exón; RI, retención de intrón (F) Porcentaje de intrones alternativos y constitutivos que se encuentran retenidos en las mutantes *sad1/lsm5* y *lsm4-1* relativo a la accesión salvaje correspondiente.

Análisis de eventos conocidos de *splicing* alternativo para genes del reloj en las mutantes *sad1/lsm5 y lsm4-1.*

Para analizar las variantes de *splicing* de genes del reloj en las mutantes *sad1/lsm5 y lsm4-1,* se realizaron RT-PCRs semi cuantitativas para varios eventos reportados de *splicing* alternativo de genes del reloj. Se comenzó con el análisis del evento de *splicing* alternativo más descripto en *Arabidopsis thaliana* para un gen del reloj, la retención del intrón 4 del gen *CCA1*.

No se observaron cambios en la retención de este intrón en la mutante *sad1/lsm5*, en cambio se observó una leve retención del intrón 2, un evento no reportado como alternativo hasta el momento. Este cambio se observó en todas las condiciones lumínicas analizadas (Fig. 27 A-C).

Utilizando los datos obtenidos mediante *RNA-seq* se corroboró lo observado mediante la técnica de RT-PCR para la mutante *sad1/lsm5* y se observó que la mutante *lsm4-1* también poseía un aumento en la retención del intrón 2 de *CCA1* (Fig. 28. D). Además, se observó en la mutante *lsm4-1* una disminución de la retención del intrón 4 del gen *CCA1*, que es alternativamente retenido en las plantas salvajes (Fig. 28 E). En la mutante *sad1/lsm5* se observó una pequeña disminución de la retención del intrón 4, la cual no había sido posible detectar mediante RT-PCR realizadas (Fig. 28 E). En la Fig. 28 G se observa, mediante el uso del programa IGB, el *splicing* de los intrones restantes de *CCA1*, los cuales no se encontraron afectados en las mutantes, revelando la selectividad de los defectos en el *splicing* de ambas mutantes.

Continuamos con el análisis de la retención alternativa del I4 del gen del oscilador central *TOC1*. Se analizó mediante RT-PCR esta retención y se observó para ambas mutantes un aumento marcado en todas las condiciones lumínicas analizadas (Fig. 27. D-F y Fig. 28 A, F).

Otro evento de *splicing* alternativo reportado para genes del reloj es la retención de I3 de *PPR9*, que estaba fuertemente asociada con el defecto circadiano de la mutante para el gen *PRMT5* (*Sanchez et al. 2010*). Se analizó entonces si este evento también estaba cambiado en las mutantes *lsm*. Como se puede observar en la Fig. 27 G y Fig. 28 B no se observaron cambios en el *splicing* del gen *PRR9* en ninguna de las dos mutantes *lsm*, como se observaba

para la mutantes *prmt5-5* (Fig. 28 C). No se observó tampoco cambios en el *splicing* de otros genes del reloj que poseen eventos de *splicing* alternativo reportados, como es el caso de la retención del intrón 5 de *LHY* o el intrón 1 del gen *RVE8* (Fig. 27 H, I).

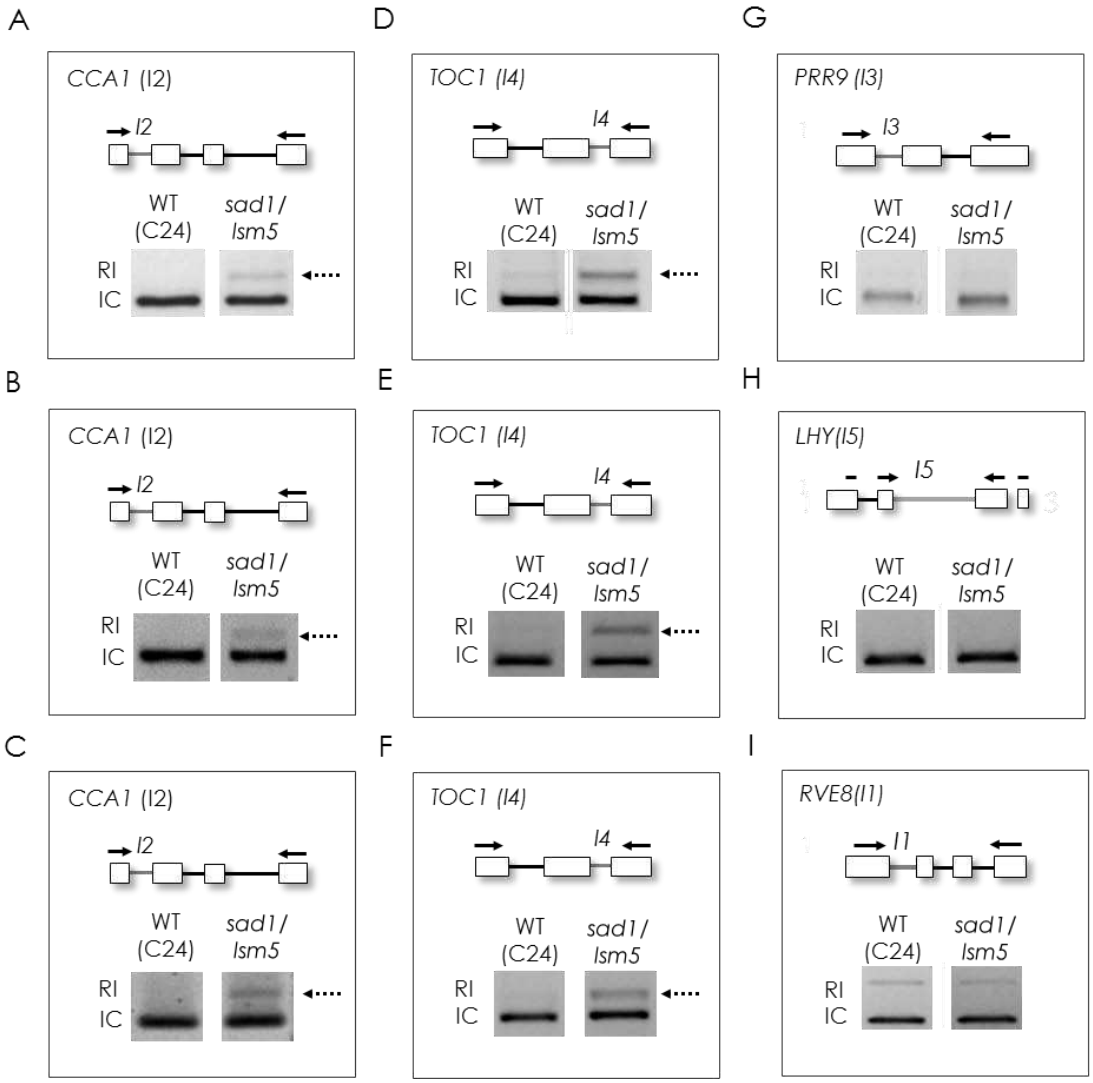


Fig.27. Análisis de los eventos de *splicing* alternativo conocidos de los genes centrales del reloj en la mutante *sad1/lsm5*. Patrones de *splicing* evaluados mediante RT-PCR semi cuantitativa. Los exones e intrones se muestran como cajas y líneas, respectivamente. Las líneas grises representan el intrón de interés. La flecha negras indican la posición del *primer*, las flechas punteadas indican el evento de retención de intrón (RI), IC= isoforma canónica. (A y D) Las muestras de ARN fueron obtenidas de plantas crecidas en 16h luz/8h oscuridad y el análisis se realizó en el momento del pico de expresión de cada gen. (B y E) Las muestras de ARN fueron obtenidas igual que en A y D, pero se cosecharon muestras cada 4h por un día y se juntaron para el análisis. (C y F) Las muestras de ARN fueron obtenidas de plantas que fueron crecidas en condiciones de luz y temperatura constantes. (A-C) Alteraciones en el evento de retención del intrón 2 de *CCA1*. (D-F) Alteraciones en el evento de retención del intrón 4 de *TOC1*. (G-I) Eventos de *splicing* alternativo que no mostraron diferencias comparado con las plantas salvajes. Se muestran el análisis de la retención del intrón 3 de PRR9 (G), del intrón 5 de LHY (H) y del intrón 1 de RVE8 (I).

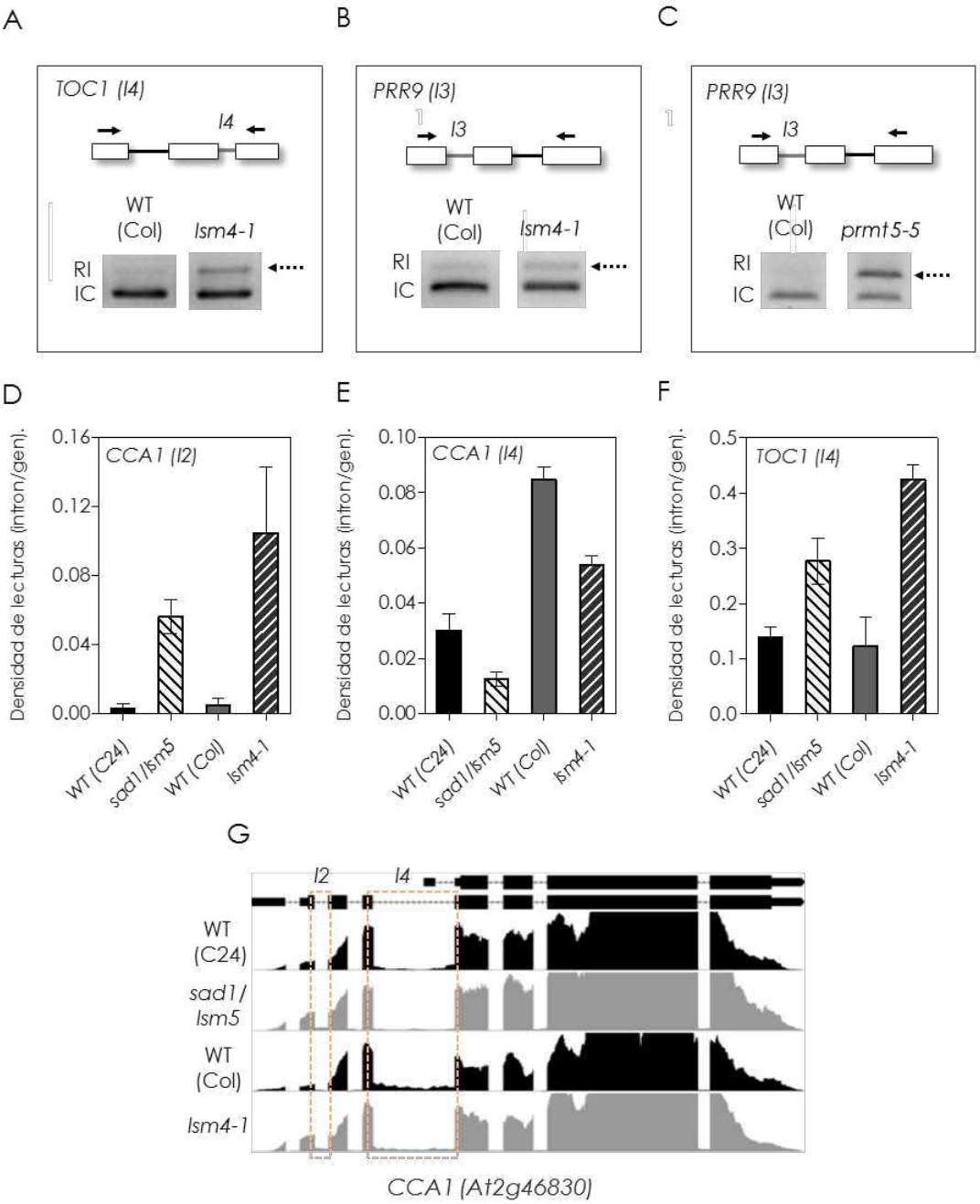


Fig. 28. Análisis de eventos de *splicing* de genes centrales del reloj en las mutantes *lsm4-1* y *sad1/lsm5*. Datos de *RNA-seq* y RT-PCR semi cuantitativa mostrando cambios en eventos alternativos de *splicing* de genes del reloj. (A-C) Patrones de *splicing* alternativo evaluados por RT-PCR para el evento de retención del intrón 4 de TOC1 (A) y retención del intrón 3 de PRR9 en *lsm4-1* (B) o *prmt5-1* (C). La retención del intrón (RI) de interés está marcada con una flecha punteada, IC: Isoforma canónica. (D-F) Datos *RNA-seq* de eventos de *splicing* expresados como densidad de lecturas intrón/ densidad de lecturas gen para los eventos de, retención del intrón 2 de *CCA1* (D), retención del intrón 4 de *CCA1* (E) y retención del intrón 4 de *TOC1* (F), en las mutantes *sad1/lsm5 y lsm4-1*. (G) Visualización del gen *CCA1* utilizando el programa IGB para ambas mutantes y sus respectivas accesiones salvajes. Los recuadros de líneas punteadas marcan los eventos de *splicing* alternativo para los intrones 2 y 4. En todos los casos, las muestras de ARN fueron obtenidas de plantas crecidas bajo condiciones de luz y temperatura constantes.

Conclusiones

Estudios previos han mostrado para los genes *SmB* en humanos y *LSM5* en plantas, un mayor efecto sobre el *splicing* alternativo que sobre el constitutivo. Pero esto podría deberse a que en ninguno de los dos casos la expresión del ARNm fue suprimida completamente (*Saltzman et al. 2011*; *Cui et al. 2014*). Es por eso que nos propusimos evaluar, no sólo el efecto que tiene la mutante *sad1/lsm5* sobre el *splicing* alternativo, sino también el efecto de la mutante *lsm4-1* que no posee ARNm funcional.

Para ello realizamos una secuenciación masiva de ARN (RNA-seq) sobre plantas que desde su germinación hasta la cosecha estuvieron bajo condiciones de luz y temperatura constantes sin exposición previa a ciclos de luz o temperatura. Bajo estas condiciones los ritmos circadianos están fuertemente atenuados y las diferencias en expresión son poco probables debido al fenotipo de período largo de las mutantes el cual podría generar diferencias en la fase de los transcriptos regulados por el reloj.

Un primer análisis a nivel global de expresión reveló mayores efectos para la mutante *lsm4-1* que para *sad1/lsm5*. Esto es consecuente con el fenotipo fuerte de la mutante *lsm4-1*. El aumento y disminución de la expresión observados para los genes *FT* y *MAF5* son consistentes con el fenotipo de floración temprana (Fig16A) que se observó para la mutante *sad1/lsm5*. Por otro lado el aumento y disminución de la expresión observados para los genes *RRC1* y *LAF3* son consistentes con la hiposensibilidad que se observó en la mutante *sad1/lsm5* para la inhibición de la elongación del hipocotilo (Fig. 16B). Por último el aumento y disminución observado para los genes de *DREB19* y *ABA4*, son consistentes con las alteraciones en las respuestas a estrés abióticos presentes en ambas mutantes (*Xiong et al. 2001*; *Zhang et al. 2009*).

Analizando particularmente eventos de *splicing* que se vieron afectados de manera similar en las mutantes *sad1/lsm5* y *lsm4*, se observaron cambios en 24 eventos alternativos anotados y 212 eventos de retención de intrones no anotados. Esto resultó en una superposición 7 veces mayor de lo esperado por azar en cada situación respecto del total de eventos encontradas, lo cual es

consistente con el hecho que ambas proteínas, LSM4 y LSM5, actúan formando parte de un mismo complejo.

Por otro lado, el análisis comparativo de retención de intrones anotados como alternativos, en relación a la retención de intrones no anotados como alternativos (posiblemente intrones constitutivos), reveló efectos mayores sobre eventos anotados que sobre eventos no anotados. Esto nos indica que los genes *LSM* contribuyen preferencialmente, aunque no exclusivamente, a la regulación del *splicing* alternativo.

Particularmente, en el estudio de eventos *splicing* de genes del reloj central se observó que los eventos de retención del intrón 2 de *CCA1* y retención del intrón 4 de *TOC1* se encontraban aumentados en ambas mutantes. Estos eventos se observaron tanto en plantas mutantes *sad1/lsm5* cultivadas en fotoperiodo de día largo y cosechadas en el momento de pico de expresión de cada gen, como en muestras tomadas cada 4 h durante un ciclo de 24 h y luego agrupadas para el análisis. También se observaron estos eventos en plantas cultivadas siempre bajo luz y temperatura constante. Esto indica que los eventos de *splicing* observados no son simplemente el resultado de los cambios en la fase de expresión de ARNm de los diferentes genes centrales por el cambio en período de la mutante *sad1/lsm5*.

Es más, para la mutante *lsm4-1* se observó una disminución del intrón 4 de *CCA1*, evento que se encuentra presente en plantas salvajes del ecotipo Col. Esto nos muestra que mutantes para *lsm* no sólo generan incrementos en la retención de intrones generales, resultante de una menor eficiencia en el proceso de *splicing*, sino que preferentemente impactan en la modulación de eventos de *splicing* alternativo. Además, para varios genes del reloj circadiano se observaron retención de intrones particulares y no a lo largo de todo el gen.

Entonces se puede concluir que los genes *LSM4 y LSM5* tienen un efecto específico, más que global, sobre la regulación del *splicing* de genes centrales del oscilador central de plantas.

El capítulo IV fue retirado a pedido del autor

At author's request chapter IV has been withdrawn

Discusión y conclusiones generales

Discusión y conclusiones generales

Durante mucho tiempo se consideró que la regulación transcripcional era el mecanismo central en el mantenimiento de los ritmos circadianos. Sin embargo, en los últimos años han surgido varios trabajos que muestran que mecanismos post-transcripcionales son necesarios para el correcto funcionamiento del reloj circadiano en diversos organismos (*Cheng et al. 1998*; *Staiger et al. 2003*; *Colot et al. 2005*; *Diernfellner et al. 2005*; *Sanchez et al. 2010*).

Basados en estos trabajos decidimos investigar en mayor profundidad los mecanismos post-transcripcionales que regulan la función del reloj circadiano, en particular el *splicing* alternativo.

Esta tesis comenzó con una búsqueda *in silico* de componentes del spliceosoma que tuvieran regulada la expresión de su ARNm por el reloj circadiano. Esto quiere decir que su expresión oscilara durante el transcurso de 24 horas en condiciones de luz y temperatura constante, luego de un entrenamiento lumínico. Esta búsqueda devolvió una lista de 83 genes candidatos para estudiar la conexión entre los ritmos circadianos y el *splicing*.

El análisis de los ritmos circadianos de mutantes para 13 de los genes candidatos reveló que, de todas mutantes analizadas, sólo la mutación en el gen *LSM5*, *sad1/lsm5* afectaba la función del reloj circadiano. *LSM5* codifica para una proteína de la familia LSM, la cual es parte de dos complejos heptaméricos distintos localizados en el núcleo y en el citoplasma. El complejo nuclear se compone de las proteínas LSM2 a LSM8 y es requerido para la estabilización del U6 snARN y el correcto *splicing* del pre-ARN. El complejo citoplasmático consiste de las proteínas LSM1 a LSM7 y es requerido para la formación de PBs, *decapping* del ARNm y correcto decaimiento del ARNm en el citoplasma (*Nicol et al. 2009*; *Perea-Resa et al. 2012*; *Golisz et al. 2013*).

La mutación *sad1/lsm5* genera un cambio de aminoácido conservado en el gen *LSM5* y afecta varías vías controladas por el reloj a nivel fisiológico y molecular, como el movimiento de hojas, el tiempo de floración, la elongación del hipocotilo y la expresión de genes centrales del reloj. En particular, el retraso en la expresión de los genes *PRR* es consistente con el alargamiento del período

circadiano observado, aunque es incierto cuál de estos cambios sería el principal responsable del fenotipo circadiano.

También encontramos que la mutación en el gen LSM4, cuyo ARNm no se encuentra regulado por el reloj, afectaba el control temporal de la expresión del gen central del reloj *CCA1* y un gen de vía de salida del reloj. Además de *LSM5*, el ARNm para los genes *LSM1a*, *LSM1b* y *LSM3b* de plantas también estaban controlados por el reloj.

Por otro lado, los ARNm para los genes *LSM3*, *LSM4* y *LSM7* de ratón mostraba regulación circadiana y la disminución en la expresión de los genes *LSM3*, *LSM5* y *LSM7* en células humanas generaba cambios en el período de expresión del gen central del reloj de mamíferos, *BMAL1*.

Hay creciente evidencias que sugiere que componentes centrales de los complejos de múltiples subunidades que participan en la transcripción, o en el procesamiento de ARN, desempeñan roles regulatorios en lugar de roles pasivos en el control de la expresión génica. De hecho, los componentes centrales del complejo de reconocimiento del promotor, que hasta el momento se consideraba con un rol pasivo, se ha demostrado que regulan programas transcripcional célula-específicos durante el desarrollo (*Goodrich and Tjian 2010*). Del mismo modo, la disminución de la expresión de *SmB*, un componente central de U1- U5 snRNPs, en las células humanas, o mutaciones en el gen *U1C* de la especie *Danio rerio (zebra fish)*, que codifica un componente de U1snRNP, resultan en mayores alteraciones sobre *splicing* alternativo que sobre el *splicing* constitutivo (*Park et al. 2004*; *Rösel et al. 2011*; *Saltzman et al. 2011*). En plantas, la mutación en *LSM5* también reveló alteraciones sólo en subconjuntos de eventos de *splicing* (*Cui et al. 2014*)

Estos hallazgos sugieren que los cambios en los niveles y/o actividades de las proteínas spliceosomales centrales podrían estar asociados con la regulación de vías de señalización específicas. De hecho, las mutantes *sad1/lsm5* y *lsm4-1* en *Arabidopsis thaliana* tienen reducida la tolerancia a estrés abiótico, un fenotipo que es consistente con las alteraciones en la expresión y *splicing* alternativo de genes relacionados con el estrés (*Zhang et al. 2011*; *Cui et al. 2014*). Sin embargo, si las señales relacionadas con el estrés abiótico controlan

la expresión y/o actividad de las proteínas de LSM en las plantas no se conoce aún.

Aunque se ha demostrado que los componentes centrales del spliceosoma, *SmB* en humanos y *LSM5* en plantas, generaban efectos limitados sobre *splicing* constitutivo y los mayores efectos observados eran sobre el *splicing* alternativo, la falta de efectos fuertes en *splicing* constitutivo podría deberse a la incompleta reducción de la expresión de ARNm de *SmB* en células humanas o la naturaleza débil de la mutación *sad1/lsm5* en arabidopsis (*Saltzman et al. 2011*; *Cui et al. 2014*).

Mediante la caracterización del procesamiento de ARNm de una mutante nula por inserción de T-DNA como es *lsm4-1*, la cual carece de ARNm funcional para *LSM4,* se observó que el *splicing* de solo el 5% de todos los intrones evaluados mediante *RNA-seq* estaban significativamente afectados en la mutante, a pesar de ser un gen de copia única en *Arabidopsis thaliana* (*Perez-Santangelo et al. 2014*). Dado que LSM4 es metilada por PRMT5, mutaciones en genes *LSM* podrían también alterar el reloj afectando el *splicing* de *PRR9*, como ocurría con la mutante para PRMT5 (*Sanchez et al. 2010*). Sin embargo, el *splicing* del intrón 3 de *PRR9* que estaba fuertemente reducido en mutantes *prmt5-5* y estaba asociado al fenotipo circadiano de la mutante, era normalmente removido en *sad1/lsm5* y *lsm4-1* sugiriendo que este no es el camino por el cual los genes *LSM* controlan el período circadiano.

A pesar de que identificamos alteraciones en el *splicing* alternativo de otros genes del reloj, como el aumento de la retención del intrón 4 del gen *TOC1* y del intrón 2 del gen *CCA1*, estos defectos deberían retrasar en lugar de alargar el período circadiano, lo que sugiere que ellos no son el defecto responsable del fenotipo circadiano de las mutantes *lsm*. Los genes *LSM* podrían afectar entonces al período circadiano mediante la regulación de *splicing* alternativo de genes centrales del reloj todavía no identificados.

Por otro lado, el alargamiento en el período de los genes del reloj *CCA1* y *CCR2* observados para la mutante doble *lsm1a/1b* pertenecientes sólo al complejo LSM1-7 involucrado en el decaimiento de ARNm, nos da indicio de que parte de los defectos sobre los ritmos circadianos de las mutantes *lsm4-1 y*

sad1/lsm5 podría estar dado por su rol en el decaimiento de ARNm. Es más, mutaciones en el gen *DCP5* involucrado en *decapping* y mutaciones en la enzima *XRN4* responsable de la degradación de ARNm 5'-3' también generaban alargamiento en el período de expresión de genes del reloj circadiano.

La regulación del decaimiento de ARNm de genes del reloj debe ser clave, dada la importancia de la exactitud del momento de expresión de estos genes. El control del momento de expresión no puede estar dado solamente por el prendido o apagado de la transcripción regulada a través del promotor, sino que debe haber un eficiente control de la degradación de ARNm de genes del reloj, para que el pico sea lo más preciso posible.

Se mostró en *Drosophila melanogaster* la relevancia de la región 3' no traducible (del inglés, U*nTranslated Region;* 3'UTR) en el comportamiento circadiano del gen *PER,* mediante el cambio del 3' UTR del gen *PER* por el 3' UTR del gen TUBULINA, un gen de expresión ubicua. Este cambio generaba alteraciones en el perfil de expresión de ARNm de PER (*Chen et al. 1998*). En ratón, analizaron la región 3' UTR del gen *PER* (*mPER*), colocándolo río abajo del reportero luciferasa. Esto resultó en una disminución dramática de la estabilidad del ARNm de la luciferasa. Y una mutación estabilizante en el 3'UTR de *mPER* generaba alteraciones en los perfiles de oscilación del ARNm de la luciferasa (*Kwak et al. 2006*). Estos trabajos demostraron que el decaimiento de ARNm mediado por el 3' UTR juega un rol clave en las oscilaciones circadianas del ARNm de gen *PER* tanto en moscas como en ratones.

Dado estos antecedentes, podría pensarse que el control de los perfiles de expresión de genes del reloj en *Arabidopsis thaliana* también podría estar mediado por las regiones UTR. Un trabajo reciente que buscaba identificar ARNm inestables mediante la utilización de microarreglos, mostró que los genes controlados por el reloj circadiano eran particularmente inestables, es decir sus ARNm decaían rápidamente (*Gutierrez et al. 2002*). Esto da un indicio de que es necesario que los genes controlados por el reloj circadiano sean inestables para poder ser degradados rápidamente y así poder tener perfiles de expresión robustos, con picos y valles bien definidos.

En conclusión, los resultados descriptos en esta tesis demuestran que varios genes *LSM* desempeñan un rol regulatorio en los ritmos circadianos, mediante el control del *splicing* alternativo y del decaimiento de ARNm de genes del reloj y de vías de salida, contribuyendo a la sincronización de los ritmos biológicos a los cambios ambientales.

REFERENCIAS

Achsel T, Brahms H, Kastner B, Bachi A, Wilm M, Lührmann R. *1999*. **A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro.** EMBO J. 18:5789–802.

Alabadí D, Oyama T, Yanovsky MJ, Harmon FG, Más P, Kay SA. *2001*. **Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock.** Science 293:880–3.

Anders S, Reyes A, Huber W. *2012*. **Detecting differential usage of exons from RNA-seq data.** Genome Res. 22:2008–2017.

Anderson J, Parker R. *1998*. **The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex**. EMBO J. 17:1497–1506.

Andrews JL, Zhang X, McCarthy JJ, McDearmon EL, Hornberger TA, Russell B, Campbell KS, Arbogast S, Reid MB, Walker JR, et al. *2010*. **CLOCK and BMAL1 regulate MyoD and are necessary for maintenance of skeletal muscle phenotype and function.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107:19090–5.

Barak S, Tobin EM, Green RM, Andronis C, Sugano S. *2000*. **All in good time: the Arabidopsis circadian clock**. Trends Plant Sci. 5:517–522.

Barta A, Kalyna M, Reddy ASN. *2010*. **Implementing a rational and consistent nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins) in plants.** Plant Cell 22:2926–9.

Barta A, Marquez Y, Brown JWS. *2012*. **Challenges in Plant Alternative Splicing**.

Baulcombe D. *2004*. **RNA silencing in plants.** Nature 431:356–363.

Belostotsky DA, Sieburth LE. *2009*. **Kill the messenger: mRNA decay and plant development**. Curr. Opin. Plant Biol. 12:96–102.

Benjamini Y, Hochberg Y. *1995*. **Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing**. J. R. Stat. Soc. Ser. B 57:289 – 300.

Boeck R, Lapeyre B, Brown CE, Sachs AB. *1998*. **Capped mRNA Degradation Intermediates Accumulate in the Yeast spb8-2 Mutant**. Mol. Cell. Biol. 18:5062–5072.

Bologna NG, Voinnet O. *2014*. **The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in *Arabidopsis***. Annu. Rev. Plant Biol. 65:473–503.

Bouveret E, Rigaut G, Shevchenko A, Wilm M, Séraphin B. *2000*. **A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation.** EMBO J. 19:1661–71.

Buhr E, Takahashi J. *2013*. **Molecular components of the mammalian circadian clock**. Circadian clocks 15:271–277.

Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS, Bradfield CA. *2000*. **Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals.** Cell 103:1009–17.

Bünning EÜ die E. *1932*. **der Tagesperiodizität bei den Phaseolus Blättern.** jahrbücher für wissenschaftliche Bot.:411–418.

Camasses A, Bragado-Nilsson E. *1998*. **Interactions within the yeast Sm core complex: from proteins to amino acids**. Mol. Cell. Biol. 18:1956–1966.

De Candolle AP. *1832*. **Physiologie végétale**.

Chekanova J, Gregory B, Reverdatto S. *2007*. **Genome-wide high-resolution mapping of exosome substrates reveals hidden features in the Arabidopsis transcriptome**. Cell 131:1340–1353.

Chen Y, Hunter-Ensor M, Schotland P, Sehgal A. *1998*. **Alterations of per RNA in noncoding regions affect periodicity of circadian behavioral rhythms.** J. Biol. Rhythms 13:364–79.

Cheng Y, Gvakharia B, Hardin PE. *1998*. **Two alternatively spliced transcripts from the Drosophila period gene rescue rhythms having different molecular and behavioral characteristics.** Mol. Cell. Biol. 18:6505–6514.

Clough SJ, Bent AF. *1998*. **Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana**. Plant J. 16:735–743.

Coller J, Parker R. *2005*. **General translational repression by activators of mRNA decapping.** Cell 122:875–86.

Coller JM, Tucker M, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Parker R. *2001*. **The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes.** RNA 7:1717–27.

Colot H V, Loros JJ, Dunlap JC. *2005*. **Temperature-modulated alternative splicing and promoter use in the Circadian clock gene frequency.** Mol. Biol. Cell 16:5563–5571.

Covington MF, Harmer SL. *2007*. **The circadian clock regulates auxin signaling and responses in Arabidopsis.** PLoS Biol. 5:e222.

Covington MFM, Maloof JNJ, Straume M, Kay SA, Harmer SL. *2008*. **Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development**. Genome Biol. 9:R130.

Cui P, Zhang S, Ding F, Ali S, Xiong L. *2014*. **Dynamic regulation of genome-wide pre-mRNA splicing and stress tolerance by the Sm-like protein LSm5 in Arabidopsis**. Genome Biol 15:R1.

Decker C, Parker R. *1993*. **A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation.** Genes Dev. 7:1632–1643.

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

Deyholos M, Cavaness G, Hall B. *2003*. **VARICOSE, a WD-domain protein, is required for leaf blade development**. Development 130:6577–6588;

Diernfellner ACR, Schafmeier T, Merrow MW, Brunner M. *2005*. **Molecular mechanism of temperature sensing by the circadian clock of Neurospora crassa.** Genes Dev. 19:1968–1973.

Duhamel Du Monceau HL. *1759*. **La Physique des Arbres**.

Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS. *2006*. **Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics.** Plant J. 45:616–29.

Edwards KD, Anderson PE, Hall A, Salathia NS, Locke JC, Lynn JR, Straume M, Smith JQ, Millar AJ. *2006*. **FLOWERING LOCUS C mediates natural variation in the high-temperature response of the Arabidopsis circadian clock.** Plant Cell 18:639–650.

Farinas B, Mas P. *2011*. **Functional implication of the MYB transcription factor RVE8/LCL5 in the circadian control of histone acetylation.** Plant J. 66:318–29.

Farré EM, Harmer SL, Harmon FG, Yanovsky MJ, Kay SA. *2005*. **Overlapping and distinct roles of PRR7 and PRR9 in the Arabidopsis circadian clock.** Curr. Biol. 15:47–54.

Filichkin S a., Priest HD, Givan S a., Shen R, Bryant DW, Fox SE, Wong WK, Mockler TC. *2010*. **Genome-wide mapping of alternative splicing in Arabidopsis thaliana**. Genome Res. 20:45–58.

Filichkin S, Priest HD, Megraw M, Mockler TC. *2015*. **Alternative splicing in plants: directing traffic at the crossroads of adaptation and environmental stress**. Curr. Opin. Plant Biol. 24:125–135.

Filichkin SA, Cumbie JS, Dharmawardhana P, Jaiswal P, Chang JH, Palusa SG, Reddy ASN, Megraw M, Mockler TC. *2014*. **Environmental Stresses Modulate Abundance and Timing of Alternatively Spliced Circadian Transcripts in Arabidopsis.** Mol. Plant 8:207–27.

Gazzani S, Lawrenson T, Woodward C. *2004*. **A link between mRNA turnover and RNA interference in Arabidopsis**. Science (80-.). 306:1046–1048.

Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ. *1998*. **Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism.** Science 280:1564–9.

Gendron JM, Pruneda-Paz JL, Doherty CJ, Gross AM, Kang SE, Kay SA. *2012*. **Arabidopsis circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109:3167–72.

Goeres DDC, Norman J Van, Van Norman JM, Zhang W, Fauver NA, Spencer M Lou, Sieburth LE. *2007*. **Components of the Arabidopsis mRNA decapping complex are required for early seedling development.** Plant Cell 19:1549–64.

Golisz A, Sikorski PJ, Kruszka K, Kufel J. *2013*. **Arabidopsis thaliana LSM proteins function in mRNA splicing and degradation.** Nucleic Acids Res. 41:6232–49.

Gong W, He K, Covington M, Dinesh-Kumar SP, Snyder M, Harmer SL, Zhu Y-X, Deng XW. *2008*. **The development of protein microarrays and their applications in DNA-protein and protein-protein interaction analyses of Arabidopsis transcription factors.** Mol. Plant 1:27–41.

Goodrich JA, Tjian R. *2010*. **Unexpected roles for core promoter recognition factors in cell-type-specific transcription and gene regulation.** Nat. Rev. Genet. 11:549–558.

Graveley BR. *2001*. **Alternative splicing: Increasing diversity in the proteomic world**. Trends Genet. 17:100–107.

Gutierrez RA, Ewing RM, Cherry JM, Green PJ. *2002*. **Identification of unstable transcripts in Arabidopsis by cDNA microarray analysis: rapid decay is associated with a group of touch- and specific clock-controlled genes.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99:11513–8.

Gy I, Gasciolli V, Lauressergues D. *2007*. **Arabidopsis FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors**. Plant Cell 19:3451–3461.

Harmer S. *2009*. **The circadian system in higher plants**. Annu. Rev. Plant Biol. 60:357–377.

Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps J a, Kay SA. *2000*. **Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock.** Science 290:2110–2113.

Harmer SL, Kay SA. *2005*. **Positive and negative factors confer phase-specific circadian regulation of transcription in Arabidopsis.** Plant Cell 17:1926–40.

He W, Parker R. *2000*. **Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing**. Curr Opin Cell Biol 12:346–350.

He W, Parker R. *2001*. **The yeast cytoplasmic Lsm1/Pat1p complex protects mRNA 3' termini from partial degradation**. Genetics 158:1445–1455.

Hermann H, Fabrizio P, Raker V. *1995*. **snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions.** EMBO J. 14:2076–2088.

Hogg R, McGrail JC, O'Keefe RT. *2010*. **The function of the NineTeen Complex (NTC) in regulating spliceosome conformations and fidelity during pre-mRNA splicing.** Biochem. Soc. Trans. 38:1110–5.

Hsu PY, Devisetty UK, Harmer SL. *2013*. **Accurate timekeeping is controlled by a cycling activator in Arabidopsis.** Elife 2:e00473.

Hsu PY, Harmer SL. *2014*. **Wheels within wheels: The plant circadian system**. Trends Plant Sci. 19:240–249.

Huang W, Pérez-García P, Pokhilko A, Millar AJ, Antoshechkin I, Riechmann JL, Mas P. *2012*. **Mapping the core of the Arabidopsis circadian clock defines the network structure of the oscillator.** Science 336:75–9.

Hughes M, DiTacchio L, Hayes K. *2009*. **Harmonics of circadian gene transcription in mammals**. PLoS Genet.

Ihaka R, Gentleman R. *1996*. **R: a language for data analysis and graphics**. J. Comput. Graph. Stat. 5:299–314.

Ingelfinger D, Arndt-Jovin D, Lührmann R, Achsel T. *2002*. **The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci**. RNA 8:1489–1501.

Isken O, Maquat LE. *2008*. **The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation.** Nat. Rev. Genet. 9:699–712.

Iwasaki S, Takeda A, Motose H, Watanabe Y. *2007*. **Characterization of Arabidopsis decapping proteins AtDCP1 and AtDCP2, which are essential for post-embryonic development.** FEBS Lett. 581:2455–2459.

James AB a. B, Syed NH, Bordage S, Marshall J, Nimmo GAG a., Jenkins GIGI, Herzyk P, Brown JWS, Nimmo HGHG. *2012*. **Alternative splicing mediates responses of the Arabidopsis circadian clock to temperature changes.** Plant Cell 24:961–81.

Jones MA, Williams BA, McNicol J, Simpson CG, Brown JWS, Harmer SL. *2012*. **Mutation of Arabidopsis spliceosomal timekeeper locus1 causes circadian clock defects.** Plant Cell 24:4066–82.

Kalyna M, Simpson CG, Syed NH, Lewandowska D, Marquez Y, Kusenda B, Marshall J, Fuller J, Cardle L, McNicol J, et al. *2012*. **Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate expression of important regulatory genes in Arabidopsis.** Nucleic Acids Res. 40:2454–69.

Kambach C, Walke S, Young R. *1999*. **Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs**. Cell.

Kastenmayer J, Green P. *2000*. **Novel features of the XRN-family in Arabidopsis: evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm**. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97:13985–13990.

Katari MS, Nowicki SD, Aceituno FF, Nero D, Kelfer J, Thompson LP, Cabello JM, Davidson RS, Goldberg AP, Shasha DE, et al. *2010*. **VirtualPlant: a software platform to support systems biology research.** Plant Physiol. 152:500–515.

King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, et al. *1997*. **Positional cloning of the mouse circadian clock gene.** Cell 89:641–53.

Koncz C, deJong F, Villacorta N, Szakonyi D, Koncz Z. *2012*. **The Spliceosome-Activating Complex: Molecular Mechanisms Underlying the Function of a Pleiotropic Regulator**. Front. Plant Sci. 3.

Koornneef M. *1991*. **Isolation of higher plant developmental mutants.** Symp. Soc. Exp. Biol. 45:1–19.

Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM. *1999*. **mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop.** Cell 98:193–205.

Kuno N, Møller SG, Shinomura T, Xu X, Chua N-H, Furuya M. *2003*. **The novel MYB protein EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE1 is a component of a slave circadian oscillator in Arabidopsis.** Plant Cell 15:2476–88.

Kwak E, Kim T-D, Kim K-T. *2006*. **Essential role of 3'-untranslated region-mediated mRNA decay in circadian oscillations of mouse Period3 mRNA.** J. Biol. Chem. 281:19100–6.

Lamesch P, Berardini TZT, Li D, Swarbreck D, Wilks C, Sasidharan R, Muller R, Dreher K, Alexander DL, Garcia-Hernandez M, et al. *2012*. **The Arabidopsis Information Resource (TAIR): Improved gene annotation and new tools**. Nucleic Acids Res. 40:1202–1210.

Locke JCW, Millar AJ, Turner MS. *2005*. **Modelling genetic networks with noisy and varied experimental data: the circadian clock in Arabidopsis thaliana.** J. Theor. Biol. 234:383–93.

Lowrey PL, Takahashi JS. *2011*. **Genetics of circadian rhythms in mammalian model organisms**. Adv. Genet. 74:175–230.

de Mairan J. *1729*. **Observation botanique**. Hist. l'Academie R. des Sci.:35–36.

Maldonado-Bonilla LD. *2014*. **Composition and function of P bodies in Arabidopsis thaliana.** Front. Plant Sci. 5:201.

Marquez Y, Brown JWS, Simpson C, Barta A, Kalyna M. *2012*. **Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis**. Genome Res. 22:1184–1195.

Mayes AE, Verdone L, Legrain P, Beggs JD, Salgado-Garrido J, Bragado-Nilsson E, Kandels-Lewis S, Séraphin B, Matera AG, Wang Z. *1999*. **Characterization of Sm-like proteins in yeast and their association with U6 snRNA**. EMBO J. 18:4321–4331.

McClung CR. *2006*. **Plant circadian rhythms.** Plant Cell 18:792–803.

McClung CR. *2014*. **Wheels within wheels: new transcriptional feedback loops in the Arabidopsis circadian clock.** F1000Prime Rep. 6:2.

Michael TP, Mockler TC, Breton G, McEntee C, Byer A, Trout JD, Hazen SP, Shen R, Priest HD, Sullivan CM, et al. *2008*. **Network Discovery Pipeline Elucidates Conserved Time-of-Day–Specific cis-Regulatory Modules**. PLoS Genet. 4:e14.

Millar A, Carre I, Strayer C, Chua N, Kay S. *1995*. **Circadian clock mutants in Arabidopsis identified by luciferase imaging**. Science (80-.). 267:1161–1163.

Miller BH, McDearmon EL, Panda S, Hayes KR, Zhang J, Andrews JL, Antoch MP, Walker JR, Esser KA, Hogenesch JB, et al. *2007*. **Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104:3342–7.

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

Murray MG, Thompson WF. *1980*. **Rapid isolation of high molecular weight plant DNA.** Nucleic Acids Res. 8:4321–5.

Nicol JW, Helt GA, Blanchard SG, Raja A, Loraine AE. *2009*. **The Integrated Genome Browser: Free software for distribution and exploration of genome-scale datasets**. Bioinformatics 25:2730–2731.

Nilsen TW, Graveley BR. *2010*. **Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing.** Nature 463:457–63.

Nolte C, Staiger D. *2015*. **RNA around the clock - regulation at the RNA level in biological timing.** Front. Plant Sci. 6:311.

Nusinow DA, Helfer A, Hamilton EE, King JJ, Imaizumi T, Schultz TF, Farré EM, Kay SA. *2011*. **The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth.** Nature 475:398–402.

Oliveros JC. *2007*. **VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams.** BioinfoGP of CNB-CSIC.

Olmedo G, Guo H, Gregory BD, Nourizadeh SD, Aguilar-Henonin L, Li H, An F, Guzman P, Ecker JR. *2006*. **ETHYLENE-INSENSITIVE5 encodes a 5'-->3' exoribonuclease**

required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103:13286–93.

Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, Hogenesch JB. *2002*. **Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock**. Cell 109:307–320.

Park JW, Parisky K, Celotto AM, Reenan RA, Graveley BR. *2004*. **Identification of alternative splicing regulators by RNA interference in Drosophila.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:15974–15979.

Perea-Resa C, Hernández-Verdeja T, López-Cobollo R, del Mar Castellano M, Salinas J. *2012*. **LSM proteins provide accurate splicing and decay of selected transcripts to ensure normal Arabidopsis development.** Plant Cell 24:4930–4947.

Perez-Santangelo S, Mancini E, Francey LJ, Schlaen RG, Chernomoretz A, Hogenesch JB, Yanovsky MJ. *2014*. **Role for LSM genes in the regulation of circadian rhythms**. Proc. Natl. Acad. Sci. 111:15166–15171.

Pittendrigh CS. *1960*. **Circadian rhythms and the circadian organization of living systems.** Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 25:159–184.

Pizarro A, Hayer K, Lahens NF, Hogenesch JB. *2013*. **CircaDB: a database of mammalian circadian gene expression profiles.** Nucleic Acids Res. 41:D1009–13.

Pokhilko A, Fernández AP, Edwards KD, Southern MM, Halliday KJ, Millar AJ. *2012*. **The clock gene circuit in Arabidopsis includes a repressilator with additional feedback loops.** Mol. Syst. Biol. 8:574.

Potuschak T, Vansiri A, Binder BM, Lechner E, Vierstra RD, Genschik P. *2006*. **The exoribonuclease XRN4 is a component of the ethylene response pathway in Arabidopsis.** Plant Cell 18:3047–57.

Price TS, Baggs JE, Curtis AM, Fitzgerald GA, Hogenesch JB. *2008*. **WAVECLOCK: Wavelet analysis of circadian oscillation**. Bioinformatics 24:2794–2795.

Rawat R, Schwartz J, Jones MA, Sairanen I, Cheng Y, Andersson CR, Zhao Y, Ljung K, Harmer SL. *2009*. **REVEILLE1, a Myb-like transcription factor, integrates the circadian clock and auxin pathways.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106:16883–8.

Rawat R, Takahashi N, Hsu PY, Jones MA, Schwartz J, Salemi MR, Phinney BS, Harmer SL. *2011*. **REVEILLE8 and PSEUDO-REPONSE REGULATOR5 form a negative feedback loop within the Arabidopsis circadian clock.** PLoS Genet. 7:e1001350.

Reddy ASN, Marquez Y, Kalyna M, Barta A. *2013*. **Complexity of the alternative splicing landscape in plants.** Plant Cell 25:3657–83.

Reeves WH, Narain S, Satoh M. *2003*. **Henry Kunkel, Stephanie Smith, clinical immunology, and split genes.** Lupus 12:213–217.

Richter C. *1922*. **A behavioristic study of the activity of the rat.** Comp. Psychol. Monogr. 1:56.

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. *2010*. **edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data.** Bioinformatics 26:139–40.

Roenneberg T, Merrow M. *2005*. **Circadian clocks [mdash] the fall and rise of physiology**. Nat Rev Mol Cell Biol 6:965–971.

Romanowski A, Yanovsky MJ. *2015*. **Circadian rhythms and post-transcriptional regulation in higher plants.** Front. Plant Sci. 6:437.

Rösel TD, Hung L-H, Medenbach J, Donde K, Starke S, Benes V, Rätsch G, Bindereif A. *2011*. **RNA-Seq analysis in mutant zebrafish reveals role of U1C protein in alternative splicing regulation.** EMBO J. 30:1965–1976.

Rudic RD, McNamara P, Curtis A-M, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB, Fitzgerald GA. *2004*. **BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis.** PLoS Biol. 2:e377.

Rymarquis L a, Souret FF, Green PJ. *2011*. **Evidence that XRN4, an Arabidopsis homolog of exoribonuclease XRN1, preferentially impacts transcripts with certain sequences or in particular functional categories.** RNA 17:501–511.

Salgado-Garrido J, Bragado-Nilsson E, Kandels-Lewis S, Séraphin B. *1999*. **Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin**. EMBO J. 18:3451–3462.

Salomonis N, Schlieve CR, Pereira L, Wahlquist C, Colas A, Zambon AC, Vranizan K, Spindler MJ, Pico AR, Cline MS, et al. *2010*. **Alternative splicing regulates mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107:10514–9.

Saltzman AL, Pan Q, Blencowe BJ. *2011*. **Regulation of alternative splicing by the core spliceosomal machinery**. Genes Dev. 25:373–384.

Sanchez SE, Petrillo E, Beckwith EJ, Zhang X, Rugnone ML, Hernando CE, Cuevas JC, Godoy Herz MA, Depetris-Chauvin A, Simpson CG, et al. *2010*. **A methyl transferase links the circadian clock to the regulation of alternative splicing.** Nature 468:112–6.

Schmittgen T, Livak K. *2008*. **Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method**. Nat. Protoc. 3:1101 – 1108.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. *2012*. **NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis**. Nat. Methods 9:671–675.

Schöning JC, Streitner C, Meyer IM, Gao Y, Staiger D. *2008*. **Reciprocal regulation of glycine-rich RNA-binding proteins via an interlocked feedback loop coupling alternative splicing to nonsense-mediated decay in Arabidopsis.** Nucleic Acids Res. 36:6977–87.

Seo PJ, Park M-J, Lim M-H, Kim S-G, Lee M, Baldwin IT, Park C-M. *2012*. **A self-regulatory circuit of CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1 underlies the circadian clock regulation of temperature responses in Arabidopsis.** Plant Cell 24:2427–42.

Séraphin B. *1995*. **Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs.** EMBO J. 14:2089–2098.

Sheth U, Parker R. *2003*. **Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies.** Science 300:805–8.

Somers DE. *1999*. **The Physiology and Molecular Bases of the Plant Circadian Clock**. PLANT Physiol. 121:9–20.

Souret FF, Kastenmayer JP, Green PJ. *2004*. **AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets.** Mol. Cell 15:173–83.

Staiger D, Zecca L, Wieczorek Kirk DA, Apel K, 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.

Stevens S, Abelson J. *1999*. **Purification of the yeast U4/U6· U5 small nuclear ribonucleoprotein particle and identification of its proteins**. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96:7226–7231.

Tharun S. *2009*. **Roles of eukaryotic Lsm proteins in the regulation of mRNA function**. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 272:149–189.

Tharun S, He W, Mayes a E, Lennertz P, Beggs JD, Parker R. *2000*. **Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay.** Nature 404:515–518.

Tharun S, Parker R. *2001*. **Targeting an mRNA for Decapping**. Mol. Cell 8:1075–1083.

Trapnell C, Pachter L, Salzberg SSL. *2009*. **TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq**. Bioinformatics 25:1105–1111.

Valadkhan S, Manley JL. *2001*. **Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs**. Nature 413:701–707.

Wahl MC, Will CL, Lührmann R. *2009*. **The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine.** Cell 136:701–18.

Wang B-B, Brendel V. *2004*. **The ASRG database: identification and survey of Arabidopsis thaliana genes involved in pre-mRNA splicing.** Genome Biol. 5:R102.

Wang X, Wu F, Xie Q, Wang H, Wang Y, Yue Y, Gahura O, Ma S, Liu L, Cao Y, et al. *2012*. **SKIP Is a Component of the Spliceosome Linking Alternative Splicing and the Circadian Clock in Arabidopsis**. Plant Cell 24:3278–3295.

Wang Y, Liu C. *2002*. **Precision and functional specificity in mRNA decay**. Proc. Natl. Acad. Sci.

Weber C, Nover L, Fauth M. *2008*. **Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules.** Plant J. 56:517–530.

Wever R. *1979*. **The Circadian System of Man**. Springer-Berlin Heidelb. New York.

Will CL, Lührmann R. *2011*. **Spliceosome structure and function.** Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3.

Wu C, Orozco C, Boyer J, Leglise M, Goodale J, Batalov S, Hodge CL, Haase J, Janes J, Huss JW, et al. *2009*. **BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources.** Genome Biol. 10:R130.

Xiong L, Gong Z, Rock CD, Subramanian S, Guo Y, Xu W, Galbraith D, Zhu J-KK. *2001*. **Modulation of Abscisic Acid Signal Transduction and Biosynthesis by an Sm-like Protein in Arabidopsis**. Dev. Cell 1:771–781.

Xu J, Chua N-H. *2009*. **Arabidopsis decapping 5 is required for mRNA decapping, P-body formation, and translational repression during postembryonic development.** Plant Cell 21:3270–9.

Xu J, Yang J-Y, Niu Q-W, Chua N-H. *2006*. **Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development.** Plant Cell 18:3386–3398.

Yoo S-H, Ko CH, Lowrey PL, Buhr ED, Song E, Chang S, Yoo OJ, Yamazaki S, Lee C, Takahashi JS. *2005*. **A noncanonical E-box enhancer drives mouse Period2 circadian oscillations in vivo.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102:2608–13.

Yu JH, Yang W-H, Gulick T, Bloch KD, Bloch DB. *2005*. **Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body.** RNA 11:1795–802.

Zhang EE, Liu AC, Hirota T, Miraglia LJ, Welch G, Pongsawakul PY, Liu X, Atwood A, Huss JW, Janes J, et al. *2009*. **A genome-wide RNAi screen for modifiers of the circadian clock in human cells.** Cell 139:199–210.

Zhang X, Chen Y, Wang Z-Y, Chen Z, Gu H, Qu L-J. *2007*. **Constitutive expression of CIR1 (RVE2) affects several circadian-regulated processes and seed germination in Arabidopsis.** Plant J. 51:512–25.

Zhang Z, Zhang S, Zhang Y, Wang X, Li D, Li Q, Yue M, Li Q, Zhang Y, Xu Y, et al. *2011*. **Arabidopsis Floral Initiator SKB1 Confers High Salt Tolerance by Regulating Transcription and Pre-mRNA Splicing through Altering Histone H4R3 and Small Nuclear Ribonucleoprotein LSM4 Methylation**. Plant Cell 23:396–411.

Zheng B, Larkin DW, Albrecht U, Sun ZS, Sage M, Eichele G, Lee CC, Bradley A. *1999*. **The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock.** Nature 400:169–73.

Zinn JGÜ. *1759*. **das Schlafen der Pflanzen**. Hambg. Mag.:40–50.

APENDICE

Tabla 1

Lista de factores y reguladores del *splicing* regulados por el reloj circadiano

A continuación se listan los 83 genes que surgieron de la comparación de, genes regulados por el reloj circadiano a nivel de mensajero con genes de factores y reguladores del splicing.

Código	Nombre	Clasificación	
AT4G20440	atSmB-b Small nuclear ribonucleoprotein	Proteínas Sm	snRNP
AT4G30220	atSmF; small nuclear ribonucleoprotein F RUFX	Proteínas Sm	
AT2G23930	atSmG-a, SNRNP-G Small nuclear ribonucleoprotein	Proteínas Sm	
AT1G19120	atLSM1a U6 snRNA-associated Sm-like protein	Proteínas LSM	
AT3G14080	atLSM1b U6 snRNA-associated Sm-like protein	Proteínas LSM	
AT1G76860	atLSM3b U6 snRNA-associated Sm-like protein	Proteínas LSM	
AT5G48870	atLSM5, SAD1 SUPERSENSITIVE TO ABA AND DROUGHT 1	Proteínas LSM	
AT5G17440	atLuc7b	U1 snRNP y proteínas relacionadas	
AT5G19350	RNA recognition motif-containing protein	U1 snRNP y proteínas relacionadas	
AT4G12600	atU4/U6-15.5b	U4/U6 snRNP	
AT2G41500	atSAP60 LACHESIS (LIS); EMB2776	U4/U6 snRNP	
AT1G28060	atSAP90-1 Pre-mRNA-splicing factor 3	U4/U6 snRNP	
AT4G03430	atU5-102KD, STABILIZED 1 (STA1); EMB2770	U4/U6 snRNP	
AT4G24270	PRP24, EMB140	U5 snRNP	
AT5G25060	atSR140-1 U2-associated protein SR140	17S U2 snRNP y proteínas asociadas	
AT2G02570	atSPF30 survival of motor neuron-related-splicing factor 30	17S U2 snRNP y proteínas asociadas	
AT3G23325	SF3b10b RDS3 complex subunit 10	17S U2 snRNP y proteínas asociadas	
AT2G18510	atSAP49a splicing factor 3B subunit 4, emb2444	17S U2 snRNP y proteínas asociadas	
AT5G64270	atSAP155 putative splicing factor	17S U2 snRNP y proteínas asociadas	
AT4G31770	DEBRANCHING ENZYME 1; ATDBR1 embryo lethal	Proteínas de desensamblado	Factores de *splicing*
AT1G31870	pre-mRNA-splicing factor CWC26	Complejo RES	
AT2G38770	atAquarius EMB2765	NTC centrales y asociadas	
AT2G16600	atCypE2a/ROC3	NTC centrales y asociadas	
AT2G21130	atCypE1a/CYP2 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP19-2	NTC centrales y asociadas	

AT3G12580	HSP70 heat shock protein 70-4	NTC centrales y asociadas	Factores de *splicing*
AT5G02500	HSC70-1	NTC centrales y asociadas	
AT1G80930	pre-mRNA-splicing factor CWC22	NTC centrales y asociadas	
AT4G21110	AtBud31 bud site selection protein 31	NTC centrales y asociadas	
AT3G51110	atCRN2 Half-A-TPR repeat-containing protein	NTC centrales y asociadas	
AT2G16860	pre-mRNA-splicing factor SYF2	NTC centrales y asociadas	
AT2G33340	MOS4-associated complex 3A (MAC3B), PRP19B	NTC centrales y asociadas	
AT5G53180	polypyrimidine tract-binding protein 2	Selección del sitio de Splicing	
AT1G27650	atU2AF35a/AUSa splicing factor U2af small subunit A	Selección del sitio de *Splicing*	
AT3G55460	atSCL30 SC35-like splicing factor 30	Proteínas SR y relacionadas	Reguladores del *Splicing*
AT1G09140	ATSR30	Proteínas SR y relacionadas	
AT3G49430	AtSR34a putative Pre-mRNA splicing factor SF2	Proteínas SR y relacionadas	
AT2G24590	atRSZp22a RNA recognition motif and CCHC-type zinc finger domain	Proteínas SR y relacionadas	
AT3G53500	RSZ32 RNA recognition motif and CCHC-type zinc finger domain	Proteínas SR y relacionadas	
AT4G25500	atRSp40/atRSP35	Proteínas SR y relacionadas	
AT5G22840	atSRPK2a protein kinase family protein	Proteínas Kinasa de SR	
AT3G53030	atSRPK2b SRPK4	Proteínas Kinasa de SR	
AT5G61030	atGRBP1e glycine-rich RNA-binding protein 3; GR-RBP3	Proteínas de union a RNA ricas en Glicinas	
AT4G13850	atGRBP1c GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN 2; GR-RBP2	Proteínas de union a RNA ricas en Glicinas	
AT2G21660	AtGRP7/atGRBP3a CCR2, GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN 7; GR-RBP7; GRP7	Proteínas de union a RNA ricas en Glicinas	
AT4G39260	AtGRP8/atGRBP3b ATGRP8; CCR1	Proteínas de union a RNA ricas en Glicinas	
AT2G33410	AtRNPA/B_2 RNA recognition motif-containing protein	Familia hnRNP	
AT5G47620	AtRNPA/B_5 RNA recognition motif-containing protein	Familia hnRNP	
AT3G15010	UBA2c RNA recognition motif-containing protein	Familia hnRNP	
AT5G04280	at-hnRNP-G1 RNA recognition motif-containing protein	Familia hnRNP	
AT5G58470	TBP-associated factor 15B	Familia hnRNP	
AT4G00830	hnRNP-R1 LIF2, TFL2 interacting RNA recognition motif-containing protein	Familia hnRNP	
AT4G03110	RBP-DR1; RNA-binding protein-defense related 1	Familia hnRNP	
AT1G49600	AtRBP47a RNA-binding protein 47A	Familia hnRNP	
AT4G17520	Ath2	Familia hnRNP	
AT5G47210	Ath3	Familia hnRNP	

AT1G49760	PAB8	Proteínas de union a ARNm	Reguladores del *Splicing*
AT2G23350	PAB4	Proteínas de union a ARNm	
AT1G30970	SUF4; suppressor of FRIGIDA4	Asociadas al complejo A	
AT4G31120	SKB1	Asociadas al complejo B	
AT4G09980	EMB1691, methyltransferase-like protein 1	Asociadas al complejo B	
AT3G25840	atPRP4K-1 serine/threonine-protein kinase PRP4	Reclutadas antes del complejo Bact	
AT3G09440	protein heat shock protein 70-3	Abundantes primero en el complejo C	
AT3G07790	protein DGCR14	Abundantes primero en el complejo C	
AT4G02720	hypothetical protein	Abundantes primero en el complejo C	
AT5G23080	TOUGH (TGH) G patch domain-containing protein 1	Abundantes primero en el complejo C	
AT1G18080	WD-40 REPEAT PROTEIN ATARCA	Abundantes primero en el complejo C	
AT3G18130	receptor for activated C kinase 1C	Abundantes primero en el complejo C	
AT5G22330	RIN1; RESISTANCE TO P. SYRINGAE INTERACTOR 1	Abundantes primero en el complejo C	
AT1G51380	atDDX48/eIF4A3-2 DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 34	EJC/mRNP	
AT3G58570	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 52	EJC/mRNP	
AT5G59950	atALY-1b RNA recognition motif-containing protein	Complejo TREX	
AT5G42920	THO5	Complejo TREX	
AT5G23880	CPSF100	Complejo de poliadenilación y clivaje	
AT1G61010	CPSF73-I	Complejo de poliadenilación y clivaje	
AT1G54440	RRP6-like protein 1	Exosoma	
AT5G10810	putative enhancer of rudimentary protein ER	Miscelaneos de complejos humanos	
AT1G48650	DEA(D/H)-box RNA helicase family protein	Miscelaneos de complejos humanos	
AT5G62190	PRH75; RNA HELICASE	Miscelaneos de complejos humanos	
AT3G57290	EIF3E	Miscelaneos de complejos humanos	
AT5G52470	FIB1 rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin 1	Especificos del penta snRNP de levaduras	
AT4G25630	FIB2, rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin 2	Especificos del penta snRNP de levaduras	
AT2G20560	DNAJ heat shock protein	Especificos del penta snRNP de levaduras	
AT4G28480	DNAJ heat shock protein	Especificos del penta snRNP de levaduras	

Tabla 2

La lista de los 13 genes seleccionados para pedir mutantes.

A continuación se listan los 13 genes relacionados al *splicing* que se encuentran regulados por el reloj circadiano de los cuales se pidieron mutantes insercionales al ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center)*.

Codigo	***Nombre***	***Clasificación***	
AT1G19120	*atLSM1a U6 snRNA-associated Sm-like protein*	*Proteínas LSM*	*SnRNP*
AT3G14080	*atLSM1b U6 snRNA-associated Sm-like protein*	*Proteínas LSM*	
AT5G48870	*atLSM5, SAD1 SUPERSENSITIVE TO ABA AND DROUGHT 1*	*Proteínas LSM*	
AT2G02570	*atSPF30 survival of motor neuron-related-splicing factor 30*	*17S U2 snRNP y proteínas asociadas*	
AT3G55460	*atSCL30 SC35-like splicing factor 30*	*Proteínas SR y relacionadas*	*Reguladores del Splicing*
AT1G09140	*ATSR30*	*Proteínas SR y relacionadas*	
AT3G49430	*AtSR34a putative Pre-mRNA splicing factor SF2*	*Proteínas SR y relacionadas*	
AT5G61030	*atGRBP1e glycine-rich RNA-binding protein 3; GR-RBP3*	*Proteínas de union a RNA ricas en Glicinas*	
AT2G21660	*AtGRP7/atGRBP3a CCR2, GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN 7; GR-RBP7; GRP7*	*Proteínas de union a RNA ricas en Glicinas*	
AT4G39260	*AtGRP8/atGRBP3b ATGRP8; CCR1*	*Proteínas de union a RNA ricas en Glicinas*	
AT3G15010	*UBA2c RNA recognition motif-containing protein*	*Familia hnRNP*	
AT1G49760	*PAB8*	*Proteínas de union a ARNm*	
AT2G23350	*PAB4*	*Proteínas de union a ARNm*	