



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**“Efectos de la luz y la temperatura sobre el *splicing*
alternativo de genes del reloj de las plantas:
mecanismos e impacto funcional”**

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

Constanza Helena Assaf

Director de tesis: Dr. Marcelo J. Yanovsky

Consejero de Estudios: Dr. Pablo Cerdán

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir/ IIBBA-CONICET

Buenos Aires, 2025

ÍNDICE

Agradecimientos

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
El Reloj circadiano	6
Propiedades del Reloj Circadiano.....	6
Modelo conceptual del Reloj	8
Bases moleculares de los ritmos	10
Circuitos transcripcionales de retroalimentación.....	10
Mecanismos de regulación post-transcripcional.....	13
Procesamiento del pre-ARNm: el <i>splicing</i>	14
Integración de los <i>inputs</i> externos al Reloj	17
Percepción de la luz.....	17
Percepción de la temperatura.....	19
Interacción entre <i>splicing</i> alternativo, reloj y señales externas.....	23
Objetivo	27
Hipótesis	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Material vegetal y condiciones de crecimiento estándar	29
Genotipado de mutantes	29
Condiciones de crecimiento y protocolo para la secuenciación de alto rendimiento.....	30
Procesamiento de las lecturas de la secuenciación de ARN	31
Análisis de <i>splicing</i> diferencial	31
Análisis de expresión génica diferencial	32
Análisis de categorías funcionales enriquecidas (<i>Gene Ontology, GO</i>).....	32
Validación de eventos de <i>splicing</i> alternativo	33

RT-PCR.....	33
Secuenciación de amplicones (<i>Amplicon Sequencing</i>).....	34
Generación de líneas transgénicas.....	34
Líneas transgénicas RVE8.....	34
Líneas transgénicas LNK1.....	36
Análisis de la expresión por qRT-PCR.....	36
Medición de los niveles de expresión de líneas transgénicas.....	36
Análisis de los patrones de expresión de genes regulados por RVE8 en frío.....	37
Ensayos de movimiento de hojas.....	38
Ensayos de elongación de hipocotilos.....	38
Ensayos de tiempo a floración.....	39
Análisis de inmunotransferencia.....	39
Análisis de los patrones de acumulación de las isoformas de RVE8 en frío.....	40
Modelado de la isoforma alternativa de RVE8.....	40
Ensayo de doble híbrido.....	41
Fluorescencia de GFP y localización subcelular.....	41
CAPÍTULO I: Papel de los fitocromos en el SA de Arabidopsis.....	43
Introducción.....	44
Resultados.....	48
Impacto del tratamiento con luz R sobre el SA en las mutantes <i>phyQ</i>	48
Los fitocromos son necesarios para el <i>splicing</i> de un subconjunto de genes.....	51
Los fitocromos regulan la expresión de factores de <i>splicing</i>	51
Análisis de ontología génica de DEGs y DSGs regulados por luz.....	54
Conclusiones.....	56
CAPÍTULO II: SA de genes del reloj circadiano asociado a cambios ambientales.....	57
Introducción.....	58
Resultados.....	62

Identificación de eventos de <i>splicing</i> alternativo asociados a temperatura	62
Validación de eventos SA asociados a cambios ambientales.....	64
Análisis de las isoformas de SA de RVE8	67
Caracterización fisiológica de líneas sobreexpresantes de RVE8-FL y RVE8-AS	69
Patrones de acumulación de las isoformas RVE8 frente a bajas temperaturas.....	75
Efectos de la temperatura sobre la expresión relativa de <i>RVE8</i> y genes río abajo.....	77
Modelado de las isoformas de <i>splicing</i> alternativo de RVE8 y LNK1	82
Análisis de las interacciones entre isoformas de RVE8 y LNK1	87
Análisis de expresión y localización subcelular de RVE8-FL y RVE8-AS bajo estrés por frío	88
Conclusiones	91
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	93
Los fitocromos en la regulación del <i>splicing</i> alternativo controlado por luz.....	94
SA de genes activadores del reloj en respuesta a la temperatura: ¿regulación de la expresión o diversificación del proteoma?.....	96
BIBLIOGRAFÍA.....	106
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	120

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo (UNT), donde dí mis primeros pasos en la biología, por darme las herramientas para empezar mi camino en esta carrera y permitirme conocer amigos que me acompañan hasta hoy.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) por abrirme las puertas y permitirme cursar mi doctorado aprendiendo de docentes e investigadores que transmiten sus conocimientos con dedicación y excelencia.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la financiación de mi beca doctoral.

A la Fundación Instituto Leloir, de la cual fue un orgullo formar parte. Por darme un sentido de pertenencia y por los enormes aportes de sus investigadores a la sociedad.

A mi director, Marcelo, por la oportunidad de trabajar en el laboratorio y darme la libertad y los recursos para poner en práctica las ideas y preguntas que surgieron en el proceso. Gracias por la confianza y los conocimientos transmitidos.

A mi co-director, Santiago, por ser mi mentor en la ciencia y regalarme generosamente su tiempo y conocimientos ilimitados. Una de las personas cuyo trabajo e intelecto admiro, y fue de gran motivación para llevar adelante mi proyecto. Este doctorado no hubiera sido lo mismo sin su ayuda y valiosos aportes.

A todos los integrantes (y ex-integrantes) del labo: Sole, por guiarme pacientemente cuando recién empezaba el doc. Majo y Steve, por hacer del labo un lugar más ameno y responder siempre a todas mis preguntas. Juli, por darme su punto de vista sincero y estar a disposición. Dani, por toda la ayuda brindada en estos años. Abri, por las charlas, la compañía y el aguante. Super generosa y atenta siempre. Marian, por su buena onda, su ayuda desinteresada y los chistes de pasillo. Gran compañero y vecino de labo que voy a extrañar.

A mi egregor querido: Jean, Anto, Lu y Emi, por compartir los momentos más lindos (y polémicos) de este doctorado. Entre risas, mates piscina y charlas interminables, hicieron que esta etapa sea inolvidable. Gracias por prestarme su oído, por su comprensión infinita y por levantarme el animo cuando lo necesitaba. Sin querer me lleve amigas increíbles. No se imaginan cuanto las quiero.

A Dani y Bren, por los almuerzos y largas charlas en los pasillos de FIL. Dani, por esa sensibilidad y escucha atenta que forman parte de su esencia. Presente en todos los detalles y comunicando con amor y cuidado. Bren, por esa energía optimista que contagia, brindando siempre una sonrisa y un punto de vista interesante. Las admiro y quiero mucho.

Al mejor grupo que me dió el Lillo: Ale, Char, Clari, Pao, Luchi, Marian, Ara y Vale. Por estar en distintas etapas de mi vida y acompañar en cada una de ellas a su manera.

A Ale, por acompañarme todos estos años y creer en mi. Por las tantas experiencias vividas, abrazos y charlas profundas. Por poner todo su corazón en cada cosa que hace y ser un ejemplo de persona y amigo. Te quiero me queda chico.

A Char, por su sencillez, calidez y valores humanos inquebrantables. Por ser esa persona con la que puedo contar incondicionalmente y hablar de lo que sea. Poder transitar este camino juntas hace que todo sea más liviano y feliz.

A Clari, gran amiga, científica y persona. Por inspirarme con su valentía y curiosidad.

A Lucia, mi vecina y amiga, por estar presente en todas y aportando siempre desde el amor y la empatía. Compañera de TOCs y otras verduras. Te quiero muchísimo.

A Lea, amigo del alma, por transitar conmigo todos estos años en Buenos Aires. Por las charlas eternas y la conexión única que siempre me brindó. Por tener el poder de hacer que un problema se vuelva insignificante a través de la palabra y el humor. Te adoro infinitamente.

A Ita, por su apoyo incondicional en todo tipo de situaciones. Por las chipeadas de los domingos, que tanto extraño, y sus ocurrencias que cambian un día normal por uno divertido y diferente.

A mis amigas posadeñas: Luli, Meli y Belu, por estar siempre al pie del cañón desde pequeñas. A Luli, por su amor y apoyo constantes, por esa forma tan especial de ser y su risa contagiosa. Meli, por su alegría, entrega y generosidad que motivan. Bele, la psico del grupo, por llevar siempre calma y escuchar atentamente. Las adoro.

A mi hermano Alf, mi cable a tierra. Por ayudarme en cada situación que se presenta, aconsejarme y acompañar a su manera. Su apoyo es sumamente importante para mi. Te quiero muchísimo.

A mi hermano Pablo, por ser tan presente y comprometido en todo sentido. Por su sencillez, generosidad y, sobretodo, por traer al mundo al sobrino más hermoso.

A mi prima, Ana, por ser mi ejemplo a seguir y mi hermana incondicional desde chiquitas. Por inspirarme con su fortaleza y creatividad. Por enseñarme a escuchar, a ser más empática y descubrir otros mundos. Por desafiarme a vivir nuevas experiencias y aprender cosas nuevas. Lejos o cerca, siempre juntas.

A mi tía Pelusa, por ser la mejor madre y tía del planeta. Por el amor, la entrega y el tiempo que nos dedica. Por su espíritu aventurero y su fuerza inspiradora.

A mis papas, Maryam y Miguel, por todo lo que hicieron y hacen por mi. Gracias por darme los recursos, la seguridad y la libertad para poder cumplir mis metas y por inculcarme la curiosidad por entender el mundo que me rodea. Soy afortunada de tenerlos y siento mucho orgullo y admiración por ambos como personas, profesionales y padres. Esta tesis se las dedico a ellos.

“Es más útil pensar que saber, y más aún, observar”

Johann Wolfgang von Goethe

“Efectos de la luz y la temperatura sobre el *splicing* alternativo de genes del reloj de las plantas: mecanismos e impacto funcional”

RESUMEN

Muchos procesos moleculares y fisiológicos en las plantas ocurren en momentos específicos del día. Estos ritmos diarios son generados por el reloj circadiano, un mecanismo endógeno que utiliza la duración del día y la temperatura para sincronizar el tiempo interno de distintos eventos fisiológicos y de desarrollo con los cambios en el ambiente. En *Arabidopsis*, el reloj está compuesto por múltiples circuitos de retroalimentación transcripcionales. Entre ellos se destaca uno, en donde el factor de transcripción REVEILLE 8 (RVE8) interactúa con los co-activadores transcripcionales NIGHT LIGHT INDUCIBLE AND CLOCK REGULATED 1 (LNK1) y LNK2 para promover la expresión de genes vespertinos del reloj y otros genes clave, como los que codifican factores de tolerancia al frío. Existe fuerte evidencia de una regulación adicional mediada por mecanismos co- y post-transcripcionales en el control circadiano. En particular, la mayoría de los genes centrales del reloj de las plantas sufren *splicing* alternativo (SA), mecanismo por el cual un gen puede dar lugar a varios transcriptos. Este ajuste del transcriptoma es particularmente prevalente en respuesta a estrés y cambios ambientales.

En este trabajo, se validaron y caracterizaron eventos de SA dependientes de la luz y la temperatura en los genes *RVE8* y *LNK1* del reloj circadiano. Utilizando secuenciación masiva de RNA de alto rendimiento (RNA-seq), evaluamos el efecto de un pulso de luz roja en la mitad de la noche en plantas *wild type* (WT) y mutantes quintuples de fitocromos (*phyQ*). Encontramos que el SA de 483 genes se vió afectado por el tratamiento, siendo menor el efecto de los fitocromos que el efecto de la luz, lo cual resalta la importancia de mecanismos independientes de fitocromos en el control del SA mediado por luz. Además, observamos que genes del reloj, tales como *RVE8* y *LNK1* mostraban cambios en sus patrones de SA en respuesta al tratamiento lumínico, sugiriendo que la regulación del SA por luz podría jugar un papel en el entrenamiento del reloj.

Paralelamente, se ha demostrado mediante Secuenciación de Nueva Generación (NGS) que, en plantas WT, las bajas temperaturas promueven la acumulación de ciertas variantes de SA de *RVE8* y *LNK1*, que dan origen a proteínas truncadas. Con el fin de ampliar la comprensión de la relevancia biológica de las isoformas de SA de dichos genes,

generamos líneas transgénicas expresando las distintas variantes de *splicing* en un fondo mutante. Se encontró que tanto la isoforma canónica (FL) como la isoforma alternativa (AS) de RVE8, rescatan parcialmente el fenotipo de una triple mutante *rve* en distintas funciones asociadas al reloj. A su vez, se observó una respuesta diferencial en el control de la fotomorfogénesis entre las líneas sobreexpresantes de RVE8-FL y RVE8-AS bajo diferentes condiciones ambientales. Un análisis de los patrones de acumulación de ambas versiones de RVE8, reveló que la isoforma alternativa exhibe un retraso en el pico de expresión, y, en condiciones de estrés por frío, se acumula y mantiene sus niveles constantes a lo largo del día. Al observar la localización subcelular de ambas proteínas, detectamos una tendencia de RVE8-FL a acumularse en el núcleo tras la exposición a bajas temperaturas. Además, los genes diana de RVE8 mostraron una mayor inducción de la expresión en las primeras horas de exposición al frío en las líneas expresando RVE8-FL bajo su propio promotor. Finalmente, por medio del modelado predictivo de las isoformas de SA de RVE8 y LNK1, demostramos que los dominios C y N-terminal de ambas proteínas, respectivamente, se encuentran estructuralmente afectados. Aun así, mediante un análisis de doble híbrido se evidenció que la isoforma alternativa de RVE8 conserva la capacidad de interacción. Estos resultados sugieren que el *splicing* alternativo de genes centrales del reloj daría lugar a proteínas con funciones parcialmente distintas a sus contrapartes canónicas, las cuales podrían tener un rol en mediar un ajuste fino de las respuestas biológicas a cambios ambientales.

Palabras clave: Arabidopsis, reloj circadiano, *splicing* alternativo, RVE8, LNK1, luz, temperatura, isoformas

“Effects of light and temperature on alternative splicing of plant clock genes: mechanisms and functional impact”

ABSTRACT

Many molecular and physiological processes in plants occur at specific times of day. These daily rhythms are generated by the circadian clock, an endogenous timekeeper that uses day length and temperature to synchronize the internal timing of several physiological and developmental events with changes in the environment. In *Arabidopsis*, the clock is composed of multiple transcriptional feedback loops, in which the circadian MYB transcription factor REVEILLE 8 (RVE8) interacts with the transcriptional co-activators NIGHT LIGHT INDUCIBLE AND CLOCK REGULATED 1 (LNK1) and LNK2 to promote the expression of evening-phased clock genes and cold tolerance factors. There is strong evidence of additional regulation by co- and post-transcriptional mechanisms in circadian control. Particularly, most plant core clock genes undergo alternative splicing (AS), a mechanism by which a single gene can give rise to several transcripts. This transcriptome adjustment is particularly prevalent in response to stress and environmental changes.

In this work, light and temperature-dependent AS events of *RVE8* and *LNK1* clock genes were validated and characterized. Using high-throughput RNA sequencing (RNA-seq), we evaluated the effect of a red light pulse given in the middle of the night in wild type (WT) and phytochrome quintuple mutant (*phyQ*) plants. We found that the treatment affected AS events corresponding to 483 genes, the effect of phytochromes being much smaller than the effect of light. These results highlight the importance of phytochrome-independent mechanisms in light-mediated AS control. Furthermore, we observed that core-clock genes such as *RVE8* and *LNK1* showed changes in their AS patterns in response to the light treatment, suggesting that light regulation of AS might play a role in clock entrainment.

It has also been shown through Next Generation Sequencing (NGS) that, in WT plants, low temperatures promote the accumulation of alternatively spliced variants of *RVE8* and *LNK1*, which encode truncated proteins. In order to broaden the understanding of the biological relevance of the AS isoforms of these genes, we generated transgenic lines carrying different splicing variants in a mutant background. We found that both canonical (FL) and alternative (AS) RVE8 isoforms, partially rescue *rve* triple mutant phenotype in different clock associated responses. In addition, a differential behavior was observed in

the control of photomorphogenic responses between the lines overexpressing RVE8-FL y RVE8-AS under several environmental conditions. Accumulation patterns analysis of both versions of RVE8, revealed that the alternative isoform exhibits a delayed expression peak and, under cold stress conditions, accumulates and maintains constant levels throughout the day, losing rhythmicity. Upon examining the subcellular localization of both proteins, we observed a tendency for RVE8-FL to accumulate in the nucleus after exposure to low temperatures. Additionally, the target genes of RVE8 showed higher levels of expression in the first few hours of cold treatment, in the lines expressing RVE8-FL under its native promoter. Finally, through predictive modeling of the AS isoforms of RVE8 and LNK1, we showed that the C and N-terminal domains of both proteins, respectively, are structurally altered. Nevertheless, a yeast two-hybrid analysis confirmed that the alternative isoform of RVE8 its still able to interact. These results suggest that alternative *splicing* of core clock genes may give rise to protein isoforms with partially distinct functions compared to their canonical counterparts, which could play a role in fine-tuning biological responses to environmental changes.

Keywords: Arabidopsis, circadian clock, alternative splicing, RVE8, LNK1, light, temperature, isoforms

INTRODUCCIÓN

El Reloj circadiano

La rotación de la tierra alrededor de su propio eje y su inclinación respecto al sol, provocan cambios ambientales en la luz y la temperatura que definen de manera predecible el ciclo de 24 horas del día-noche y las estaciones. A lo largo de la evolución, los organismos se han adaptado para coordinar su ciclo de vida respondiendo y anticipándose a estas fluctuaciones ambientales. En las plantas, al ser organismos sésiles, la sincronización temporal de la fisiología con el medio ambiente es esencial para un crecimiento y desarrollo exitosos. Es por ello, que han desarrollado un mecanismo interno de medición del tiempo, o "reloj biológico", que mide con precisión el paso del tiempo e integra las señales externas generando ritmos con una periodicidad de ~24 horas. En términos generales, el reloj biológico puede considerarse como un complejo sistema que traduce las señales ambientales en información temporal para coordinar rítmicamente el metabolismo y la fisiología (1).

Propiedades del Reloj Circadiano

Los relojes biológicos son ubicuos en la naturaleza y se encuentran en varios niveles de organización y complejidad. De hecho, se han evidenciado en la mayoría de los organismos que han sido estudiados, desde bacterias fotosintéticas, insectos y hongos, hasta mamíferos y plantas (1, 2). Existen algunas propiedades fundamentales de la función del reloj que son comunes a todos los organismos. En primer lugar, el reloj biológico genera ritmos auto-sostenidos que se sincronizan o entrenan con las fluctuaciones diarias de luz y temperatura en el ambiente. En ausencia de señales ambientales, el reloj es capaz de mantener estas oscilaciones, durante un periodo denominado "de libre funcionamiento o curso" que representa el tiempo requerido para completar un ciclo. Este periodo tiene una extensión aproximada pero no exacta de 24 h. De ahí el uso del término latino "circadiano" (circa [aproximadamente] y dies [día]). En este sentido, aunque las oscilaciones persistan en ausencia de transiciones ambientales, el reloj no funciona aislado del medio ambiente. Otra propiedad de la función circadiana es su capacidad para mantener un período constante en un rango de temperaturas fisiológicas, lo que se conoce como "compensación térmica". Este proceso podría actuar como un sistema de amortiguación contra cambios en el metabolismo celular (2).

Los ritmos circadianos a menudo toman la forma de ondas sinusoidales que pueden ser descritas por términos matemáticos como período, fase y amplitud (Fig. 1). El período se define como el tiempo para completar un ciclo. La fase es la hora del día donde se produce el pico de un ritmo dado y a menudo se define en tiempo zeitgeber (ZT). Un zeitgeber (dador de tiempo en alemán) se refiere a cualquier estímulo que imparte información de tiempo al reloj. El inicio de la luz, por ejemplo, es un zeitgeber poderoso, y el amanecer se define como ZT0 (3). La amplitud del ritmo se define como la mitad de la distancia entre el valor máximo y el valor mínimo del mismo. Cuando las señales ambientales externas o zeitgebers entrenan el sistema de medición endógeno a un período de 24 h, este se corresponde precisamente con el período exógeno de la rotación de la tierra. En cambio, en condiciones de libre curso, un periodo distinto a 24h del reloj endógeno se revela (Fig. 1) (4).

La habilidad de un estímulo de "reiniciar" el reloj es función de la hora del día (fase) en el que se administra el estímulo. Mientras que un pulso de luz dado antes del amanecer adelantará la fase del reloj, el mismo pulso de luz dado después del anochecer retrasará la fase. Por otro lado, si el pulso es administrado al mediodía, no tendrá ningún efecto. De esto es evidente que el reloj regula su propia sensibilidad a los estímulos ambientales (3).

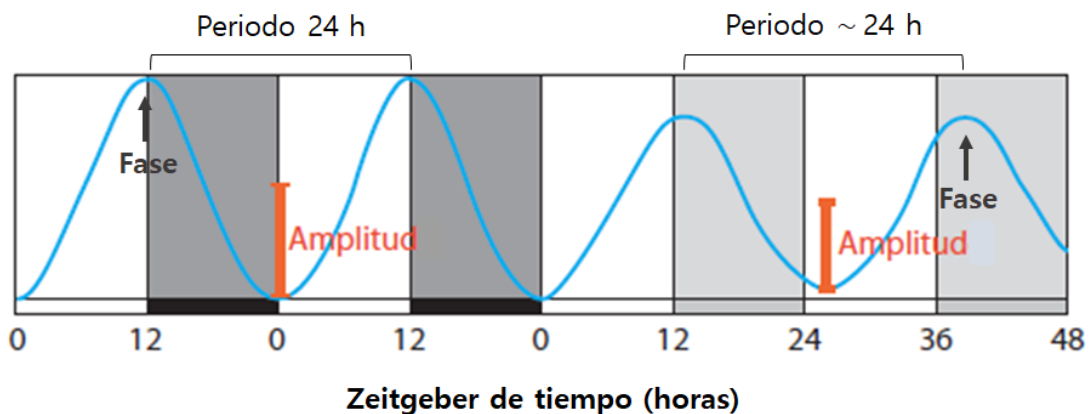


Fig. 1 Modelo de output del reloj representado en ciclos de luz/oscuridad (condiciones de entrenamiento) y luz constante (condiciones de libre curso). El período, definido como el tiempo para completar un ciclo, es exactamente 24 horas en ciclos de luz/oscuridad debido al entrenamiento del reloj por luz. Sin embargo, en condiciones ambientales constantes, el período de libre funcionamiento diferente a 24 h se revela. Se observan también diferencias en la amplitud, definida como la mitad de la distancia entre el valor máximo y el valor mínimo, y un corrimiento de la fase que representa la hora del día en que se da el valor máximo de la respuesta. Adaptado de Harmer, 2009 (4).

La importancia de la regulación rítmica de muchas actividades celulares, fisiológicas y de desarrollo esenciales dentro del ciclo de vida del organismo, radica en que permiten

separar procesos metabólicos incompatibles y coordinar eventos celulares para que ocurran en un momento biológicamente beneficioso del día o del año. Por ejemplo, la replicación del ADN que ocurre por la noche minimiza las posibles mutaciones del material genético debido a la exposición a luz ultravioleta (2). De esta manera, las actividades rítmicas cronometradas con precisión parecen conferir una ventaja adaptativa en comparación con las actividades que ocurren al azar.

Modelo conceptual del Reloj

Clásicamente, el sistema circadiano se ha dividido en tres componentes principales: las vías de entrada o *inputs* del reloj, involucradas en la percepción y transmisión de señales ambientales para sincronizar el reloj; el oscilador central o marcapasos que genera y mantiene el ritmo; y las vías de salida o *outputs* del reloj que conectan el oscilador con la fisiología y el metabolismo. Sin embargo, este es un modelo conceptual simplificado del reloj. Varias líneas de evidencia revelan la existencia de un sistema circadiano mucho más complejo, con *outputs* que modulan el ritmo del oscilador e *inputs* que están estrictamente controlados por el reloj (Fig. 2). Por lo tanto, es más apropiado considerar el sistema circadiano como una red compleja interconectada, donde los componentes del oscilador central pueden actuar tanto dentro como fuera del mismo. Además, la diferencia en los períodos de libre curso en varios *outputs* del reloj sugiere la existencia de múltiples osciladores que podrían compartir componentes y mecanismos comunes en distintos tipos celulares (5). Una visión realista de la red de señalización del reloj incluiría osciladores diferencialmente entrenados, superpuestos e interconectados que finalmente definirían el período, la fase y la amplitud de la ritmicidad total observada.

Múltiples facetas del desarrollo de las plantas están bajo el control del reloj circadiano. De hecho, una de las ventajas de estudiar la regulación circadiana en las plantas es la gran variedad de procesos fisiológicos que han evidenciado tener ritmos. Estos incluyen las transiciones del desarrollo, el metabolismo, las respuestas al estrés biótico y la protección contra estresores abióticos como el calor extremo y las bajas temperaturas (6).

Genes asociados a la bioquímica y fisiología de la fotosíntesis, como aquellos que codifican las proteínas asociadas a los complejos colectores de luz (Lhcb o CAB) y la enzima nitrato reductasa (NIA2), muestran un patrón circadiano. La expresión temporal de tales genes sugiere un papel fundamental del reloj en la coordinación del metabolismo para optimizar el rendimiento fotosintético. Adicionalmente, se ha demostrado que las

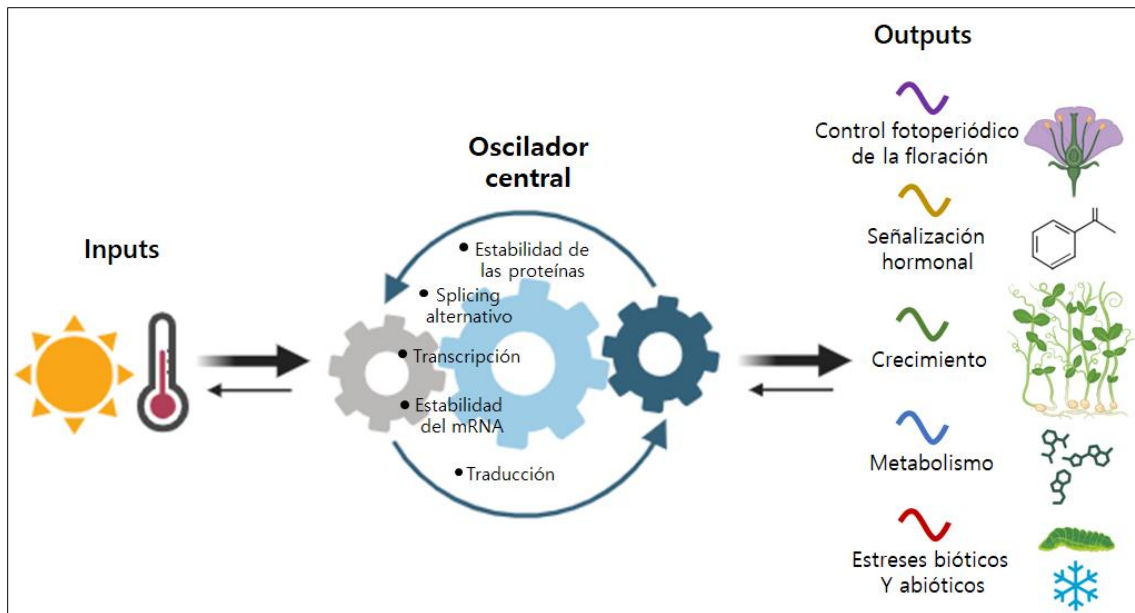


Fig. 2 Las señales ambientales son integradas por el oscilador central para coordinar múltiples procesos fisiológicos. Señales externas como la luz y la temperatura (inputs) entrenan el reloj (representado por una onda negra), incidiendo en diferentes procesos moleculares en el núcleo del oscilador. El reloj, a su vez, coordina los outputs (ondas de colores). Se requiere una función de reloj adecuada para la orquestación de múltiples vías fisiológicas, incluida la floración fotoperiódica, la señalización hormonal, el crecimiento, el metabolismo y respuestas al estrés biótico y abiótico. Aunque el sistema circadiano se ha considerado tradicionalmente como una vía lineal, cada vez hay más pruebas que respaldan la idea de que se trata de una red muy compleja. La función del oscilador no está regulada unidireccionalmente por estímulos externos, sino que también modula su propia sensibilidad a ellos. Además, múltiples vías de salida llevan a cabo la regulación por retroalimentación de la función del reloj, como es el caso de las hormonas y los metabolitos. También existe una amplia intercomunicación entre los outputs (no representadas), que además pueden verse directamente influenciadas por condiciones externas. La integración de estas interconexiones complejas da lugar a una red robusta pero flexible que juega un papel esencial en la coordinación de la fisiología vegetal en entornos naturales. Adaptado de Nohales & Kay, 2016 (7).

concentraciones citosólicas de calcio libre oscilan con un ritmo circadiano. Considerando la importancia del calcio como mensajero secundario y cofactor para muchas enzimas, esto podría ser un medio por el cual el reloj regula una variedad de procesos celulares. En *Kalanchoe fedtschenkoi*, la quinasa que fosforila fosfoenol-piruvato carboxilasa exhibe actividad circadiana, sugiriendo que las modificaciones post-traduccionales de ciertas proteínas también podrían ser reguladas por el reloj. En un nivel más alto de organización, procesos vitales como el movimiento de los cloroplastos, la apertura de estomas, la elongación del hipocotilo, los movimientos de cotiledones y hojas y el tiempo de floración muestran ritmos circadianos y/o son regulados de alguna forma por el reloj biológico (8).

Bases moleculares de los ritmos

Circuitos transcripcionales de retroalimentación

Distintos enfoques genéticos y moleculares han identificado inequívocamente mecanismos reguladores conservados subyacentes a la función del reloj en mamíferos, insectos, hongos y plantas. En todos estos grupos, la sincronización de los ritmos se basa en circuitos de retroalimentación transcripcional y traduccional en el núcleo del oscilador, con componentes positivos y negativos que controlan su propia expresión regulando a su vez la de los demás componentes de la red (2). No obstante, aunque los mecanismos sean similares, los componentes moleculares que realizan estas funciones en plantas no presentan homología con los descriptos para otros organismos (1).

La comprensión actual del oscilador circadiano en las plantas se basa en estudios genéticos y bioquímicos de finales de los 90s, que proporcionaron la descripción del primer circuito transcripcional (9). Desde entonces, el modelo inicial del oscilador central compuesto por unos pocos elementos expresados por la mañana y por la noche que regulan recíprocamente su transcripción, así como la de muchos otros genes, se ha convertido en un circuito sustancialmente más complejo e interconectado. En las últimas décadas, se han identificado nuevos componentes de reloj y descrito numerosos circuitos de retroalimentación vinculados entre sí, evidenciando el alto nivel de complejidad en la red circadiana. Además, el conocimiento de mecanismos moleculares adicionales que dan forma al sistema circadiano de la planta más allá de la regulación transcripcional se encuentra en constante expansión (7).

En la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, el reloj circadiano se compone de múltiples circuitos de retroalimentación transcripcional-traduccional interconectados (TTFL) (Fig. 3). Los primeros componentes identificados corresponden a dos factores de transcripción de tipo Myb, LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) y CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1), que alcanzan su pico de expresión al amanecer (10). Estas dos proteínas forman heterodímeros (11) y reprimen la expresión de genes de fase vespertina (12), uniéndose a un motivo *cis*-regulatorio en su promotor llamado "evening element" (EE) (13). Además, también se autorregulan entre sí reprimiendo una la expresión de la otra (14,15). Por la mañana, el gen *TIMING OF CAB EXPRESSION 1* (*TOC1*, también conocido como *PRR1*), que alcanza su pico de expresión al anochecer, es reprimido por CCA1 y LHY (16), al igual

que otros miembros de la familia *PSEUDO-RESPONSE REGULATORS* (*PRR5*, *PRR7* and *PRR9*) (17,18). Las proteínas PRR, se expresan secuencialmente a lo largo del día y reprimen a su vez la transcripción de *CCA1* y *LHY*, contribuyendo a limitar su expresión a una pequeña ventana de tiempo luego del amanecer (18). Este mecanismo de represión en fases temporales comienza al mediodía con *PRR9*, continua con *PRR7* y *PRR5* por la tarde y concluye finalmente con *TOC1* por la noche. Adicionalmente, estas proteínas reprimen su transcripción entre sí (19,20). Por la noche, tres proteínas del reloj vespertinas se asocian en un complejo denominado “evening complex” (EC) (21,22). Este comprende a *LUX ARRHYTMO* (*LUX*), un factor de transcripción GARP tipo Myb, y *EARLY FLOWERYNG 3* (*ELF3*) y *ELF4*, dos proteínas específicas de plantas no relacionadas. El EC funciona como represor transcripcional y es reclutado a los promotores de *PRR9*, *PRR7*, *GIGANTEA* (*GI*), y a su propio promotor *LUX* (23–25). La represión mediada por EC de *PRR9* y *PRR7* puede promover indirectamente la expresión de *CCA1* al final de la noche. A su vez, los componentes del EC son reprimidos por *CCA1* y *LHY* por la mañana (17,26) y por *TOC1* al anochecer (19).

A pesar de la prevalencia de interacciones represivas dentro de la red circadiana, en los últimos años se han descubierto varios componentes activadores. De hecho, se ha demostrado que el balance entre los niveles de expresión de factores tipo Myb activadores y represores es más importante en la regulación del período circadiano que la presencia o ausencia de cualquier factor específico (27).

Los REVEILLE (*RVE*) son una familia de factores de transcripción homólogos a *CCA1/LHY*, formada por 8 miembros, de los cuales unos pocos interactúan con proteínas de la familia NIGHT LIGHT INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED (*LNK*) para co-regular positivamente la expresión de ciertos genes (28–32). Particularmente, *RVE8* (también conocido como *LHY-CCA1-LIKE 5* o *LCL5*), exhibe una expresión matutina, pero es más activo por la tarde. A última hora de la mañana, *RVE8* forma un complejo transcripcional con las proteínas *LNK1* y *LNK2* que actúa promoviendo directamente la expresión de los genes de fase nocturna *TOC1*, *PRR5*, *ELF4* y *LUX*, mediante el reclutamiento de la maquinaria transcripcional basal a sus promotores (30,33). La activación de los componentes del EC, que reprimen a los genes *PRR*, contribuye indirectamente a la liberación de la represión de *CCA1* y *LHY* al final de la noche para reiniciar el ciclo (21). A su vez, la expresión de *RVE8* es inhibida por la unión de *PRR5*, *PRR7* y *PRR9* a su promotor, mientras que los genes *LNK* son reprimidos por todas las proteínas PRR, incluida *TOC1* (20,28,29,34,35).

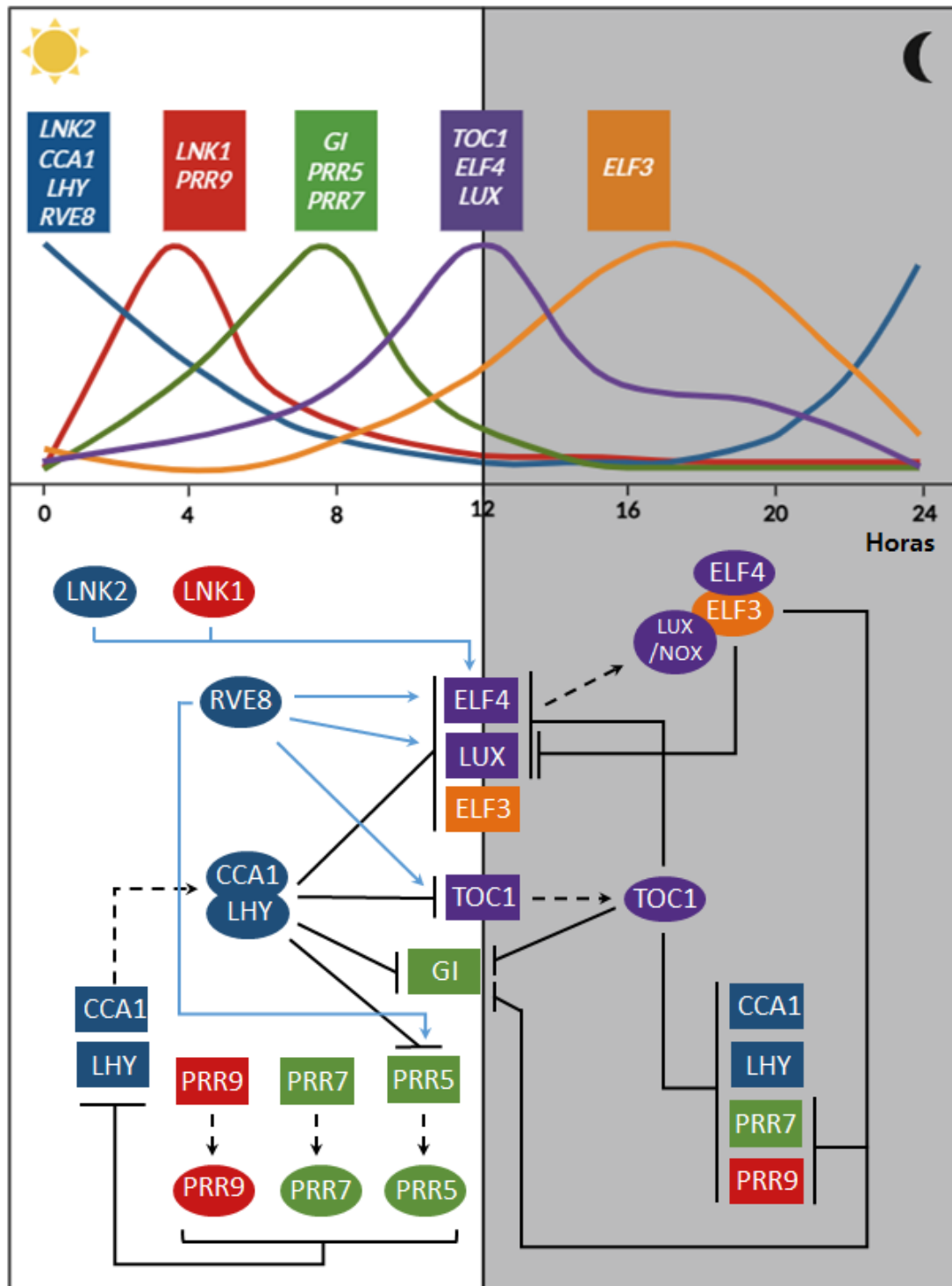


Fig. 3 Red regulatoria del reloj de *Arabidopsis thaliana*. La parte superior de la figura ilustra la expresión normalizada diaria de genes clave de reloj, obtenida de datos publicados de microarrays de series temporales o "time-course" (disponibles en <http://diurnal.mocklerlab.org/>). Genes con perfiles de expresión similares se muestran en el mismo color. El recuadro sombreado indica el período de la noche. La parte inferior de la figura muestra la regulación transcripcional dentro del reloj de *A. thaliana*, las flechas azules indican la activación mientras que las barras perpendiculares indican represión. Las proteínas se representan como elipses y los genes como rectángulos, con líneas discontinuas indicando traducción. Adaptado de Huang & Nusinow, 2016 (36).

Curiosamente, la activación de la expresión génica mediada por RVE8 requiere el EE, como es el caso de la represión génica mediada por CCA1 y LHY, aunque con un resultado antagónico (37). Del mismo modo, los homólogos más cercanos de RVE8 (RVE4 y RVE6) se unen al motivo EE y es probable que sean funcionalmente redundantes (28,32,37).

Las proteínas LNK poseen motivos conservados que contienen arginina/asparagina llamados R1/R2 ubicados en el extremo C-terminal con los que interactúan con otros factores de transcripción (30,38). Además de estas regiones, no tienen otros dominios proteicos funcionales conocidos. RVE8 y otros miembros de la familia RVE, pueden interactuar directamente con las proteínas LNK gracias a la presencia de un dominio LHY-/CCA1-LIKE (LCL), ubicado presumiblemente en el extremo C-terminal (33).

Además de su función como co-activadores junto con RVE4 y RVE8, se sabe que LNK1 y LNK2 actúan como co-represores de otros targets. Por ejemplo, el gen estructural de la antocianina *UDP-GLUCOSE:FLAVONOID 3-O-GLUCOSYLTRANSFERASE (UF3GT)*, el cual también es regulado por RVE8 (31); y el gen de biosíntesis de fenilpropanoide *C4H*, junto con el factor de transcripción MYB3 (38). El mecanismo que subyace la función co-represiva de las proteínas LNK y cómo estas cambian entre un papel activador y uno represivo se desconoce. Además de regular los ritmos circadianos, se ha sugerido que las proteínas LNK funcionan como integradores de señales de luz y temperatura con la función circadiana, ya que su expresión es inducida por la luz y regulada por el EC de forma dependiente de la temperatura (23,29).

Mecanismos de regulación post-transcripcional

Las proteínas del reloj expresadas rítmicamente producto de los circuitos de regulación transcripcionales antes descritos, regulan a su vez la expresión de una gran fracción del transcriptoma. Se ha demostrado, por medio de *enhancer trapping* in vivo basado en un reportero de luciferasa, que un tercio del genoma de *Arabidopsis* está bajo el control transcripcional del reloj (39). Como resultado, una gran proporción de transcritos ciclan con un ritmo de 24 h para expresarse en el momento óptimo del día.

Más allá de la regulación a nivel transcripcional, los ritmos circadianos están sujetos a muchas otras capas de regulación, incluida la epigenética, post-transcripcional y post-traducciona (40). En las plantas, se han descrito varios pasos regulatorios post-transcripcionales que modulan la expresión circadiana, tanto de los componentes del reloj

como de los genes ríto abajo que controlan. Estos incluyen el procesamiento de pre-ARNs mensajeros (ARNm), el recambio y estabilidad del ARN, y la regulación de la traducción (41,42). Análisis transcriptómicos utilizando tecnologías de secuenciación masiva y herramientas bioinformáticas han revelado que el reloj ejerce un control sobre estos procesos post-transcripcionales, los que, de manera recíproca, regulan el reloj. Tal es el caso del *splicing* alternativo del ARNm (43), mecanismo que será detallado a continuación.

Cabe destacar que la modificación post-traduccional de las proteínas del reloj y las interacciones proteína-proteína también juegan un papel crucial en el control de los ritmos (2,41).

Procesamiento del pre-ARNm: el *splicing*

Una vez que se inicia la transcripción, los ARNm precursores (pre-ARNm) sufren varios procesos para llegar a su estado final de ARNm maduro. Las moléculas de pre-ARNm se componen de una serie continua de segmentos, conocidos como exones e intrones. La remoción de intrones acompañada por el ensamblaje de los exones restantes en orden consecutivo constituye un mecanismo clave de regulación conocido como "splicing". Este proceso se lleva a cabo mediante el spliceosoma, un complejo de alto peso molecular que consiste en cinco pequeñas ribonucleoproteínas nucleares (snRNP) y más de 200 proteínas específicas adicionales (44). Los snRNPs contienen pequeños ARNs nucleares ricos en uridina (U1, U2, U4, U5 y U6) y están formados por proteínas Sm (U1 a U5) o proteínas relacionadas tipo Sm (LSM) (U6). Dos tipos de spliceosomas coexisten en la mayoría de los eucariotas: el spliceosoma dependiente de U2, que cataliza la eliminación de intrones de tipo U2, y el spliceosoma dependiente de U12 menos abundante, que está presente solo en un pequeño subconjunto de eucariotas y remueve una clase particular de intrones de tipo U12 (45).

Tanto la conformación como la composición del spliceosoma son altamente dinámicas, lo cual proporciona a la maquinaria de *splicing* precisión y al mismo tiempo flexibilidad. En la mayoría de los genes, la remoción de intrones de un mismo pre-ARNm no siempre sigue la ruta pre-establecida de eliminación de los intrones y consiguiente unión de los exones flanqueantes, designada como *splicing* constitutivo (46). En su lugar, a través del uso variable de sitios de *splicing*, las secuencias exónicas pueden perderse o las secuencias intrónicas pueden permanecer en el ARNm, cambiando así la composición del

mismo y afectando el marco de lectura abierto (*open reading frame*, ORF) de las proteínas que codifican. Esta variación en los patrones de *splicing* del pre-ARNm se designa como "splicing alternativo" (SA) (46,47). A través de este proceso, pueden surgir diferentes ARNm a partir de la transcripción del mismo gen, y en última instancia, ampliar el repertorio de productos proteicos que se pueden codificar del mismo (48).

La información que contribuye a definir los límites de un intrón consiste en unas pocas regiones regulatorias del ARNm. Estas corresponden a secuencias cortas y conservadas en el sitio de *splicing donor* o 5' (5' *ss*), *acceptor* o 3' *ss* y el sitio de ramificación (*branch site*, BS). El BS generalmente se encuentra 18-40 nucleótidos aguas arriba del 3' *ss*, y en los eucariotas le sigue un tracto de polipirimidina (PPT) (Fig. 4a). Otros elementos *cis* adicionales del pre-ARNm incluyen *enhancers* o promotores del *splicing* exónicos e intrónicos (ESEs e ISEs) y silenciadores (ESSs e ISSs). Estas son secuencias típicamente cortas y diversas que modulan tanto el *splicing* constitutivo como el alternativo mediante la unión de proteínas reguladoras que activan o reprimen el ensamblaje del spliceosoma en un sitio de *splicing* adyacente (45,47,49).

Existen diversos tipos de SA según los sitios de corte y empalme que se utilizan en la maduración del pre-ARNm (Fig. 4b). Durante la exclusión de exón (*exon skipping*, ES), ciertos exones son removidos junto con los intrones flanqueantes. Otro tipo de SA se da mediante el uso de *ss* 5' y *ss* 3' alternativos, donde porciones variables de los intrones se pueden eliminar y porciones variables de los exones pueden permanecer en el ARNm. Por último, los intrones pueden permanecer en el ARNm en un evento conocido como retención de intrón (*intron retention*, IR). Recientemente, se demostró que la mayoría de los intrones de *A. thaliana* se someten a *splicing* co-transcripcional (CTS). Este ocurre de manera más eficiente para los intrones de los genes que codifican proteínas, y menos eficiente para intrones con sitios SA (50). Además, se reportó que el CTS es independiente de la longitud del gen, pero se correlaciona con el nivel de expresión, paisaje de la cromatina y número total de intrones y exones del gen en cuestión (51). Estas variaciones en los patrones de *splicing* conllevan importantes consecuencias para las isoformas de ARNm resultantes, ya que las proteínas codificadas pueden estar compuestas por diferentes dominios y por lo tanto poseer distintas funciones (48). A nivel de los transcriptos, la variación en la secuencia de las isoformas de *splicing* alternativo puede llevar a diferencias en la localización subcelular, estabilidad, traducción, o regulación por microARNs (miARNs) (47). Finalmente, las isoformas alternativas de *splicing* pueden

identificarse como "aberrantes" y ser enviadas a las vías de degradación del ARN. Por ejemplo, en una IR, el intrón puede contener un codón de terminación que finalice el ORF de forma prematura. Asimismo, si se elimina una secuencia cuya longitud no es múltiplo de tres, el marco de lectura cambia y también podría incluir un codón de terminación prematura (*premature termination codon*, PTC).

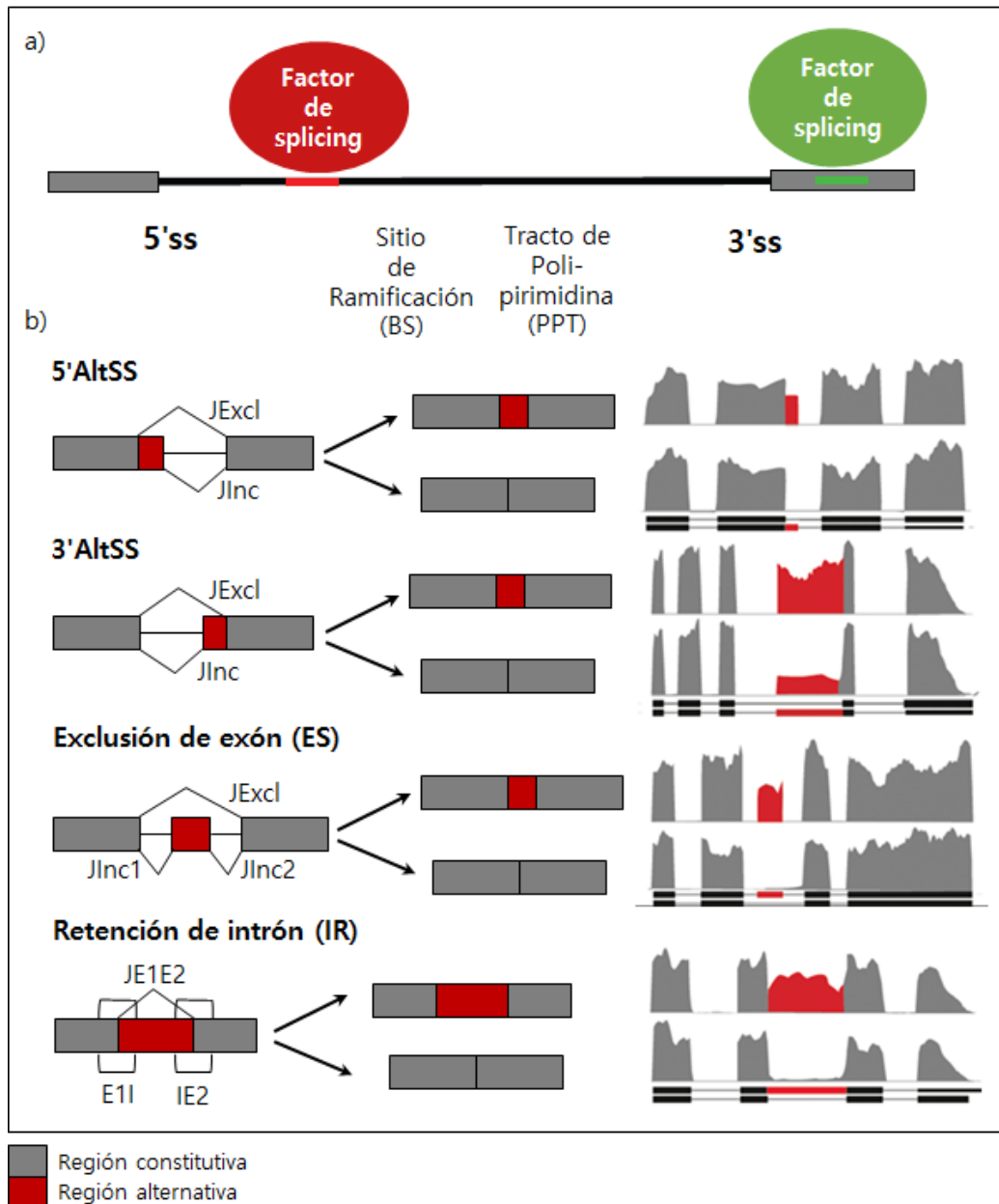


Fig. 4 Esquema de la estructura exón-intrón y tipos de *splicing* alternativo (SA). a) Los exones están representados como barras grises; el intrón se muestra como una línea negra. Se indican, el sitio de *splicing* 5' (5'ss) al comienzo del intrón, seguido del sitio de ramificación (BS) y el tracto de polipirimidina (PPT), y por último el sitio de *splicing* 3' (3'ss). La barra roja indica un sitio de unión para un factor de *splicing* que actúa en *trans* ubicado en el intrón. Este puede ser un *enhancer* o silenciador intrónico. La barra verde indica un sitio de unión para un factor de *splicing* que actúa en *trans* ubicado en el exón. Este puede ser un *enhancer* o silenciador exónico. b) Esquema de los cuatro tipos principales de eventos SA y su visualización en datos de RNAseq. Las regiones constitutivas están representadas en

gris y las regiones alternativas en rojo. Se muestran los productos finales que incluyen o no regiones alternativas. Los modelos génicos parciales se indican debajo de los gráficos de cobertura de RNA-seq. Adaptado de Mancini et al., 2015 (52).

Los PTC son reconocidos por un mecanismo de control de la degradación del ARNm denominado *Nonsense-mediated decay* (NMD), el cual elimina rápidamente los transcritos que contienen PTC del transcriptoma celular (53,54). Así, a través de la vinculación con NMD, el SA puede afectar cuantitativamente los niveles de distintos ARNm y regular la expresión génica.

Integración de los *inputs* externos al Reloj

El reloj circadiano se ajusta continuamente por señales ambientales en un proceso conocido como sincronización o "entrenamiento". Esto ocurre para que los diversos *outputs* que el mismo controla estén temporalmente sincronizados de forma apropiada, incluso cuando las condiciones de temperatura y duración del día cambian con las estaciones. Por esta razón, existen múltiples mecanismos para detectar e integrar las señales externas en los circuitos de retroalimentación del reloj.

Percepción de la luz

Al ser organismos autótrofos, la luz es uno de los factores ambientales más importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Para sensar los estímulos lumínicos del entorno circundante con precisión y optimizar la absorción de luz, las plantas han desarrollado diversos fotorreceptores y sistemas de señalización complejos que regulan la expresión genética y los procesos biológicos en la célula (55). Aunque es claro que la percepción de las señales lumínicas que modulan al reloj circadiano en las plantas se realiza fundamentalmente a través de fitocromos, criptocromos y proteínas de la familia ZEITLUPE (ZTL), todavía no hay una comprensión completa sobre cómo estos fotorreceptores transducen las señales de luz para impactar el sistema circadiano.

Uno de los principales mecanismos a través del cual las plantas perciben y responden a los cambios en la disponibilidad de luz roja es la vía de señalización por fitocromos (56). Los fitocromos son fotorreceptores reversibles de luz roja y roja lejana, fundamentales en el control de múltiples procesos fisiológicos tales como la germinación, la desetiología, el síndrome del escape al sombreado, el entrenamiento del reloj y la floración. *Arabidopsis* posee cinco fitocromos (phyA, phyB, phyC, phyD, phyE), de los cuales, el

fitocromo A (phyA) y el fitocromo B (phyB) han sido mejor estudiados, al igual que sus efectos en el crecimiento y desarrollo de las plantas (57). Cuando absorbe luz roja, phyB se fotoconvierte de una forma inactiva (Pr) a una forma activa (Pfr) (58). Mientras que Pr es citoplasmático, Pfr reside principalmente en el núcleo celular. Dentro del núcleo, Pfr interactúa físicamente con PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS (PIF), CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) y SUPPRESSOR OF PHYA-105 (SPA), iniciando así las vías de respuesta a la luz. Los PIF son factores de transcripción tipo *basic hélixloop-helix* que poseen funciones generales en el control del crecimiento. Durante el día, Pfr marca a los PIF para su degradación, dando como resultado la elongación celular en horas de la noche (59).

Existe numerosa evidencia que vincula directamente la luz con la red regulatoria circadiana. Por ejemplo, se ha demostrado que las proteínas PIF participan en la regulación transcripcional de genes del reloj matutinos como *LHY* y *CCA1* (60). Además, componentes clave del reloj como la proteína del EC, ELF3, y las proteínas PRR, limitan la función y expresión de estos importantes factores lumínicos de regulación del crecimiento. ELF3 se une a PIF4, independientemente de los otros componentes del EC, para reprimir su función, integrando de este modo la red circadiana con la regulación del control de la elongación del hipocotilo mediada por luz (61). Similarmente, se ha evidenciado que TOC1 y otras proteínas PRR se unen directamente a PIF3 y PIF4 para inhibir su capacidad de activar la transcripción de genes (34,62,63). Ergo, la asociación de las proteínas PRR con las proteínas PIF en los elementos *G-box* de los promotores de genes diana, limita su función de transactivación en las horas previas al amanecer. Otro ejemplo de interacción entre fitocromos y componentes del reloj involucra la regulación transcripcional y post-traducciona l de las proteínas ELF3 y ELF4 mediada por luz. Tres activadores transcripcionales de la vía de señalización de phyA, FAR RED ELONGATED HYPOCOTYL3 (FHY3), FAR-RED IMPAIRED RESPONSE 1 (FAR1) y ELONGATED HYPOCOTYL5 (HY5), se unen a regiones regulatorias dentro del promotor de *ELF4* para activar su expresión a medida que transcurre el día (64,65). Por otro lado, aunque la fotorregulación de la expresión de *ELF3* se desconoce, ciertos mecanismos de regulación post-traducciona l han sido revelados. Por ejemplo, la sobreexpresión de phyB, estabiliza la proteína ELF3, mientras que una E3 ubiquitina ligasa regulada por luz, COP1, marca a *ELF3* y regula negativamente su abundancia (36,66,67). Además, una proteína B-box que

regula la fotomorfogénesis, BBX19, interactúa físicamente con COP1 y ELF3 para promover la degradación de *ELF3* (68).

Un elemento clave de las vías de señalización lumínica, único debido a su doble rol como componente del reloj de las plantas y como fotorreceptor de luz azul, es la proteína ZEITLUPE (ZTL). La expresión rítmica de la proteína ZTL de tipo F-box, es necesaria para mantener un período circadiano normal mediante el control de la degradación de *TOC1* dependiente del proteosoma. ZTL interactúa directamente con GIGANTEA (GI), una proteína de gran tamaño específica de plantas, a través del dominio amino-terminal LIGHT, OXYGEN OR VOLTAGE (LOV), conformando un complejo fuertemente estabilizado por luz azul. Debido a que la regulación transcripcional de *GI* está controlada por el reloj, el consecuente ciclado de la misma, confiere un ritmo post-traducciona a la proteína ZTL. Este mecanismo de mantenimiento de oscilaciones robustas de ZTL resulta en la gran amplitud de los ritmos de *TOC1*, necesarios para el funcionamiento adecuado del reloj. (69–71). Otros receptores de luz azul son los criptocromos (*cry1* y *cry2*) (72). Particularmente, *cry2* posee un rol en la regulación de la expresión circadiana de los genes de tiempo de floración, a través de su rol antagonista con la proteína COP1 en la estabilización de GI. El complejo proteico compuesto por ELF3 y COP1, que actúa aguas abajo de *cry2*, marca a GI durante la noche para su degradación. *Cry2*, al inhibir la actividad de COP1, ayuda a estabilizar los niveles de GI, superponiendo su función con la de ZTL y sus homólogos (67).

Por último, el complejo RVE8-LNK1/2 también parece desempeñar un rol en la integración de las vías de señalización de luz al reloj, aunque el mecanismo molecular subyacente se desconoce. Posiblemente, el entrenamiento del reloj se basa, al menos en parte, en la inducción de la expresión de las proteínas LNK por fitocromos en conjunto con la expresión matutina de *CCA1* y *LHY* (14,29,73).

Percepción de la temperatura

La temperatura es otra señal externa integrada a la red del reloj que impacta en su funcionamiento de diferentes maneras. Por un lado, es capaz de entrenar los ritmos circadianos con fluctuaciones muy pequeñas de temperatura dentro del ciclo cálido/frío diario (74,75). Por otro, el sistema circadiano posee la propiedad de mantener estable la duración del período en un amplio rango de temperaturas, proceso conocido como compensación de la temperatura o compensación térmica (74,76).

Dados los múltiples vínculos establecidos entre componentes de las vías de fitocromos y las proteínas del reloj, la influencia de la temperatura sobre la función de los fitocromos podría ser un punto de integración de esta señal al reloj. Investigaciones recientes han revelado que ciertos fotorreceptores de las plantas también pueden funcionar como receptores de temperatura (77,78). Un ejemplo de ello es PhyB, cuya tasa de reversión de la forma Pfr (activa) a la forma Pr (inactiva) aumenta a altas temperaturas (79,80). También se ha reportado a PIF4 como un regulador clave de la termomorfogénesis en plantas. Frente a altas temperaturas, sus niveles se estabilizan y promueve alteraciones en el desarrollo y la morfología de las plantas (81). Debido a que la degradación de *PIF4* es promovida por Pfr, la tasa incrementada de reversión de Pfr a Pr frente a altas temperaturas puede explicar la acumulación post-transcripcional inducida por calor de *PIF4* (63,82).

La actividad transcripcional de ciertos componentes del reloj también se ve afectada por los cambios en la temperatura. A altas temperaturas, la asociación de ELF3 con sus promotores diana se reduce a través de un mecanismo desconocido (83–85). Por lo tanto, la represión de los genes regulados por el EC, tales como *PRR7*, *PRR9*, *GI*, *LUX*, y *PIF4* se ve liberada, llevando a niveles elevados de estos transcritos en noches cálidas.

Las vías de integración de las bajas temperaturas a la red circadiana involucran a los reguladores transcripcionales C-REPEAT BINDING FACTOR/ DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 1 (CBF/DREB1), cuya expresión es altamente inducida por frío. Bajo estas condiciones, se ha demostrado que CBF1/DREB1b se une directamente al promotor de *LUX*, promoviendo una expresión rítmica de gran amplitud (86). Curiosamente, phyB y PIF reprimen la expresión de *CBF1* (87,88), sugiriendo un solapamiento entre distintas vías de sensado de la temperatura. Finalmente, la expresión de *CBF1* está regulada por una serie de componentes del reloj incluyendo las proteínas PRR, el EC y CCA1/LHY (89).

Además de su función como activadores de la transcripción de otros genes circadianos bajo condiciones de temperatura normales, las proteínas RVE y LNK tienen un importante papel en la regulación de la termotolerancia, tanto a altas como bajas temperaturas (Fig. 5) (90,91). Recientemente se ha reportado que, luego de la exposición a temperaturas por encima del rango fisiológico conocido como choque térmico o "heat-shock" (HS), RVE4 y RVE8 activan la expresión de genes independientes de las vías de HSFs (factores de

transcripción altamente conservados que modulan la expresión génica en respuesta al estrés por calor en eucariotas) (92). Estos genes corresponden a los factores de transcripción *ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR 53 (ERF53)* y *ERF54*, cuya expresión es modulada a través de la unión al EE en su región promotora para aumentar la tolerancia de la planta a las temperaturas elevadas (90). Adicionalmente, RVE4/8 también parecen promover la tolerancia a las bajas temperaturas a través de la activación de los genes *CBF/DREB1*, particularmente *DREB1a/CBF3*. Tanto RVE4/RVE8, como sus homólogos CCA1/LHY, regulan la expresión no solo de los *DREB1s*, sino también de muchos otros genes inducibles por frío cuya expresión también está regulada por el reloj (91,93).

A nivel de proteínas, RVE4/RVE8 se localizan predominantemente en el citosol en condiciones normales de crecimiento pero se acumulan fuertemente en el núcleo, de manera reversible, en respuesta al estrés por frío o por calor (93). Allí activan diferentes genes diana según el tipo de estrés del que se trate, lo cual indica que la translocación de estas proteínas al núcleo es importante para la expresión de genes inducibles por frío/calor, sin embargo, se requieren otros factores para la inducción de cada vía específica. Recientemente, se ha identificado una interacción novedosa entre RVE8-LNK1/2 y las proteínas relacionadas con vías de señalización de la temperatura, COLD REGULATED GENE 27 (COR27) y COR28 (93,94). En conjunto, estas proteínas formarían un complejo nocturno que representaría un nuevo mecanismo para la modulación de las vías de regulación circadianas, a través del control de la acumulación de RVE8, y para las vías de regulación de la temperatura, por medio de la interacción RVE8-CORs en respuesta al frío (94).

Hasta hace poco, la asociación correspondiente entre la temperatura y las proteínas LNK no era del todo clara. Se sugería un papel de estas últimas en las respuestas a la temperatura debido a la inducción de la expresión de *LNK1* mediada por el EC en noches cálidas (23). Sin embargo, un nuevo estudio llevado a cabo por el grupo de Yamaguchi-Shinozaki (95) reveló que las proteínas LNK funcionan como co-activadores de las proteínas RVE no solo en la expresión de genes controlados por el reloj en condiciones de temperatura normal, sino también en la regulación de la expresión génica frente al estrés por frío y calor (Fig. 5). Según esta investigación, entre las cuatro proteínas LNK de *Arabidopsis*, LNK3/LNK4 participan en la regulación de la expresión de genes en condiciones de estrés por frío, mostrando una inducción más fuerte que los otros dos LNK bajo estas condiciones (Fig. 5b).

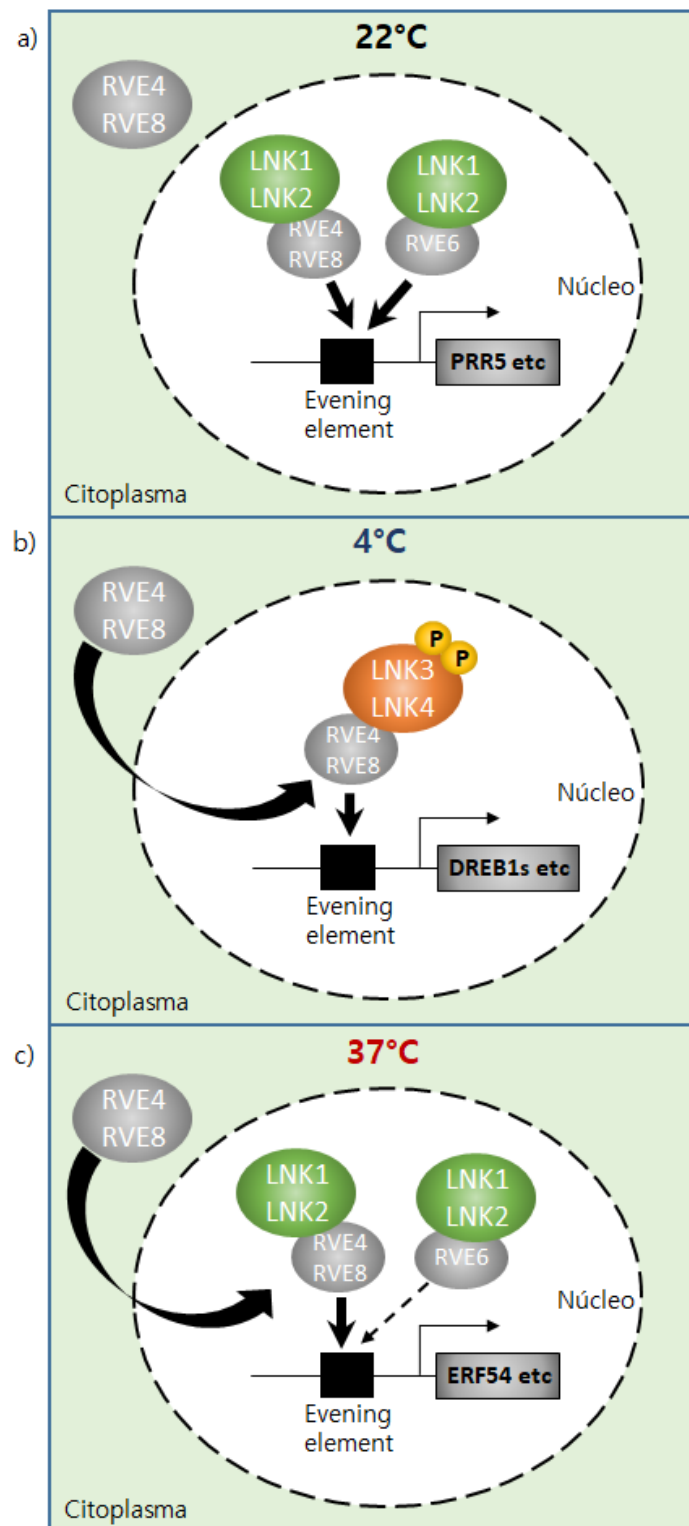


Fig. 5 Modelo esquemático que ilustra la regulación transcripcional mediada por proteínas RVE y LNK en condiciones normales de crecimiento, estrés por frío y estrés por calor. a) En condiciones normales de crecimiento (22°C), RVE4, RVE8 y RVE6 activan la expresión de genes nocturnos junto con LNK1 y LNK2. b) En condiciones de estrés por frío (4°C), RVE4 y RVE8 se acumulan en el núcleo y aumenta la fosforilación de LNK3 y LNK4. Esto activa la expresión de varios genes inducibles por el frío, incluidos los *DREB1s*. c) En condiciones de estrés por calor, RVE4 y RVE8 se acumulan en el núcleo y promueven la expresión de genes inducibles por calor como *ERF53* y *ERF54* junto con LNK1 y LNK2. Adaptado de Kidokoro et al., 2023 (95).

LNK1/LNK2, por otro lado, regularían la expresión de genes en respuesta al estrés por calor, ya que la inducción de *ERF53* y *ERF54* se ve afectada en las mutantes *Ink12* y *InkQ* frente a altas temperaturas (Fig. 5c). Además, LNK3 y LNK4 se fosforilan específicamente frente al estrés por frío, lo que sugiere que desempeñan funciones en la inducción de genes específicos en esas condiciones.

Interacción entre *splicing* alternativo, reloj y señales externas

El SA constituye un mecanismo post-transcripcional de considerable importancia para las plantas, afectando los pre-RNA mensajeros de más del 60% de los genes que contienen intrones en *Arabidopsis* (41,57). El vínculo entre SA y la regulación del reloj circadiano se ha establecido, en parte, debido a la observación de que los mutantes defectuosos en una variedad de componentes de la maquinaria de *splicing* muestran alteraciones en su comportamiento circadiano (96). La primera evidencia se describió mediante una mutación en el gen que codifica una proteína regulada por el reloj, PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE5 (PRMT5), que alarga el período circadiano de forma significativa, debido al *splicing* defectuoso de *PRR9* (97,98). PRMT5 es una metil transferasa de argininas simétrica que modifica una serie de componentes clave de la maquinaria de *splicing* (99). Entre ellas, se incluyen algunas proteínas SM-LIKE (LSM), que forman parte del complejo spliceosomal de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas U6. Varios transcritos de LSM oscilan y la función reducida de varias de estas proteínas alargan el período circadiano en *Arabidopsis*, posiblemente debido a la expresión alterada y SA de genes importantes del reloj como *CCA1*, *PRR9* y *TOC1* en *lsm5* y *TOC1* en *lsm4* (100). Adicionalmente, la pérdida de función de SPLICEOSOMAL TIMEKEEPER LOCUS1 (STIPL1), que codifica un componente del complejo que controla el desensamblaje del spliceosoma, da como resultado el *splicing* reducido de muchos intrones. En particular, causa la retención del intrón 3 del transcritos de *PRR9*, dando lugar a una proteína no funcional. El fenotipo mutante de *stipl1* confiere un período circadiano alargado, lo cual es consistente con el fenotipo de pérdida de función de la mutante *prp9* (101).

Además del control que ejercen estos y otros factores de *splicing* (FS) sobre el SA de transcritos del reloj, ellos mismos son regulados por cambios en los agentes ambientales externos, como la luz y la temperatura, vía SA y SA/NMD (41,102). En particular, un conjunto de proteínas ricas en Ser/Arg (SR), reguladoras clave del SA, sufren SA en respuesta a temperaturas extremas (103–105) y alta intensidad de luz (105,106). Muchos

de estos transcriptos alternativos contienen PTCs en sus secuencias y son potenciales candidatos a ser degradados por las vías de NMD, mientras que otros pueden producir variantes proteicas con diferentes combinaciones de dominios que probablemente afecten su función en el *splicing* del pre-ARNm de los genes que regulan. Por ejemplo, la isoforma de SA At-SR30 que contiene el ORF intacto aumenta a temperaturas elevadas y alta intensidad de luz, mientras que, la isoforma aberrante que contiene PTC en su secuencia disminuye a altas temperaturas. Esto sugiere que el SA es un medio para regular dinámicamente los niveles de proteína funcional en respuesta a cambios ambientales y estreses (102,105), y, da cuenta de la fuerte asociación entre SA, reloj y adaptación ambiental.

Entre los transcriptos que forman parte del oscilador central de *Arabidopsis*, se han analizado sistemáticamente eventos de SA asociados a cambios en la temperatura para genes tales como *CCA1*, *LHY*, *RVE8*, *PRRs*, *TOC1*, *ELF3*, *ZTL* y *CHE* (41,107–109). También se han detectado eventos de SA asociados a altas temperaturas en los transcriptos de *LUX*, *TIME FOR COFFEE* (TIC) y *LOV KELCH PROTEIN2* (LKP2), aunque su importancia biológica se desconoce (109).

La exposición de las plantas a bajas temperaturas provoca el SA de varios genes de reloj. Bajo estas condiciones, la frecuencia de eventos de retención de intrones en los transcriptos de *LHY*, *TOC1* y *PRR7* aumenta, lo cual resulta en la traducción de isoformas no funcionales de estas proteínas (107,110) (Fig. 6b). *CCA1* y *LHY* se pueden distinguir por sus notables respuestas a los cambios en la temperatura, siendo *LHY* más importante para la función del reloj a altas temperaturas, y *CCA1* a bajas temperaturas (111). Esto puede explicarse parcialmente a través del SA asociado a la temperatura (107). Las altas temperaturas aumentan el evento retención del intrón 4 de *CCA1* (*CCA1-IR4*), produciendo un transcripto alternativo que contiene un PTC. Se ha predicho que la traducción de esta isoforma de ARNm parte de un AUG alternativo en el exón 5, produciendo una proteína truncada, *CCA1-β*, la cual pierde el dominio MYB de unión al ADN, pero mantiene los dominios necesarios para la dimerización. De esta manera, *CCA1-β* forma heterodímeros no funcionales con *CCA1* funcional e inhibe su actividad. A bajas temperaturas, en cambio, el SA de *CCA1* es suprimido, con lo cual aumentan los niveles de la isoforma activa y esto permite que *CCA1* promueva la tolerancia al frío (112). Adicionalmente, las temperaturas frías aumentan la frecuencia de dos eventos de SA en *LHY*, la retención de un intrón en el 5'UTR y la inclusión de un exón adicional, 5a, dentro

de la región codificante (107,113) (Fig. 6a). La inclusión de dicho exón introduce un PTC, lo cual podría implicar la reducción de los niveles de LHY funcional a bajas temperaturas. Las consecuencias funcionales de este evento se desconocen, pero podría resultar en una traducción alterada del ARNm. Curiosamente, la retención del intrón 5'UTR es en sí misma una consecuencia del SA asociado a la temperatura de los transcritos que codifican diversos factores de *splicing*, incluyendo la proteína POLYPYRIMIDINE TRACT-BINDING PROTEIN1 (PTB1), PTB2, U2 ASSOCIATED FACTOR 65A (U2AF65A) y SUPPRESSOR OF ABI3-5 (SUA), que contribuyen al *splicing* del pre-ARNm de LHY. Por lo tanto, una cascada de eventos de SA es responsable de la regulación de los niveles de LHY funcional a bajas temperaturas (107,113).

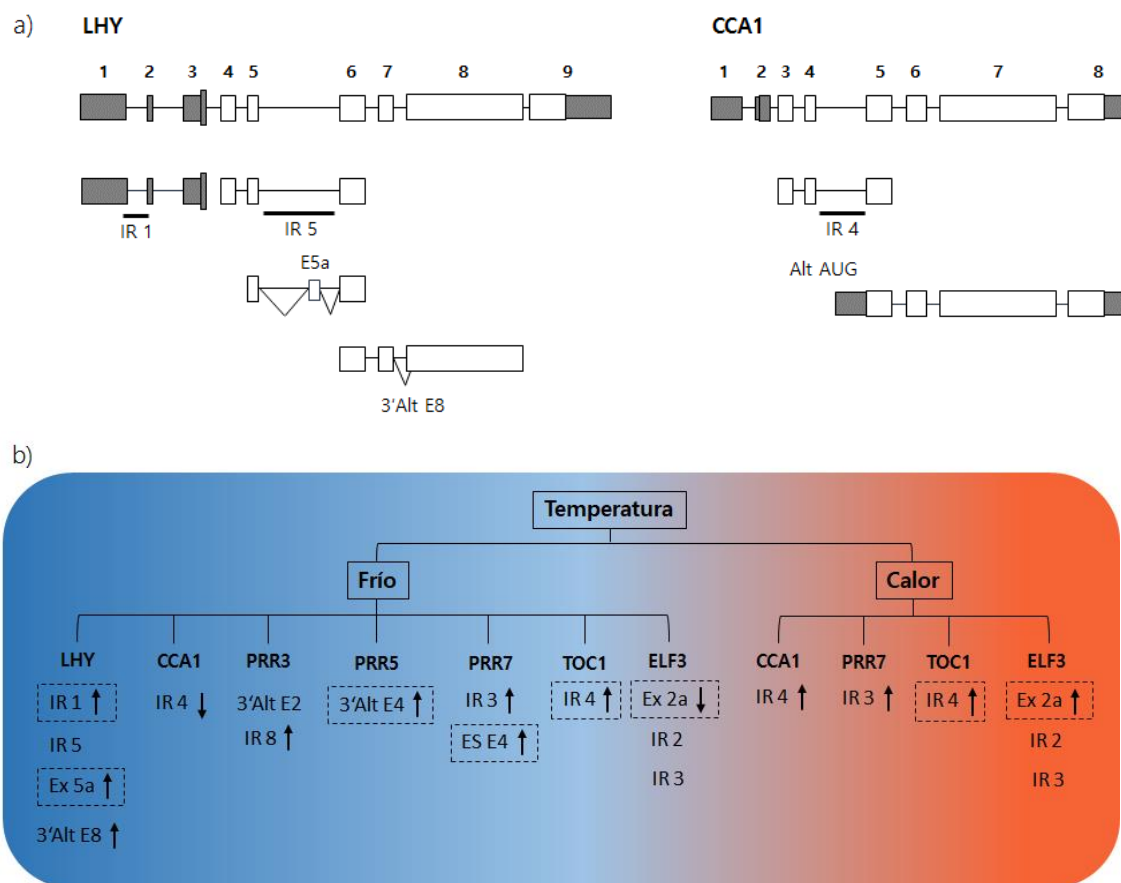


Fig. 6 Eventos de *splicing* alternativo (SA) regulados por temperatura en genes centrales de reloj de *Arabidopsis*. a) Estructura genómica de los genes *LHY* y *CCA1*. Las cajas blancas representan exones codificantes y las cajas sombreadas representan 5' y 3' UTRs. Los eventos alternativos reportados se muestran debajo de cada estructura genética. Las líneas diagonales ilustran los eventos de *splicing*. IR: retención intron; ES: exclusión de exón; 3'Alt Ex: inicio alternativo de exones. b) Ejemplos de eventos reportados de SA vinculados a la temperatura en genes del reloj. Los transcritos alternativos se dividen en regulados por frío o regulados por calor. Las flechas representan la regulación aumentada o disminuida de los eventos bajo cada condición. Los cuadros discontinuos indican eventos de SA que resultan en la introducción de un PTC y, en consecuencia, NMD. Adaptado de Mateos et al., 2018 (41).

Se han descrito diversos componentes del aparato de *splicing* que afectan la función del reloj de forma dependiente de la temperatura. Un claro ejemplo es la mutación del gen *SKIP*, que codifica el componente spliceosomal SNW/SKI-INTERACTING PROTEIN. Este confiere un período circadiano alargado asociado a la temperatura. Es decir, el período se alarga a temperaturas bajas, pero no a altas temperaturas. *SKIP* afecta y se asocia con el SA de muchos transcritos, en particular los de *PRR7* y *PRR9* (114). De forma inversa, la mutación de *GEMIN2*, que codifica un factor snRNP de ensamblaje spliceosomal, resulta en un evento de retención de intrón del transcripto de *TOC1* que reduce la acumulación de esta proteína del reloj. En consecuencia, se produce un acortamiento del período que es más evidente a temperaturas más altas (110). Además, la mutación de *SICKLE* (*SIC*), una proteína nuclear cuya función no se comprende del todo, pero se ve implicada en el SA, da como resultado el SA dependiente de la temperatura de *LHY*, *CCA1*, *PRR7* y otros transcritos, y confiere un período prolongado y una alteración en la compensación de la temperatura (115).

La regulación de los niveles de ARNm por SA ocurre también en componentes de vías de salida del reloj central. Uno de los ejemplos mejor estudiados es el circuito de autorregulación de los genes *GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN* (*GRP*) controlados por el reloj, *GRP7* (también llamado *COLD AND CIRCADIAN REGULATED2*, *CCR2*) y *GRP8*. Estos dan lugar a proteínas de unión al ARN ricas en glicinas, con un pico de expresión al final del día. La acumulación de las proteínas GRP permite la unión a sus propios transcritos para promover un evento de SA, que resulta en la retención de un intrón conteniendo un codón de terminación prematuro, lo cual desencadena la degradación de los transcritos a través de las vías de NMD (116,117). Este es uno de los primeros ejemplos de circuitos de retroalimentación basados en regulación post-transcripcional en el sistema circadiano que además vincula las vías de *splicing* alternativo con el NMD. A su vez, *GRP7* y *GRP8* regulan la estabilidad y el SA de otros transcritos que ciclan (118,119).

Objetivo

El objetivo general de este proyecto es contribuir al estudio de cómo las plantas ajustan su crecimiento y desarrollo frente a cambios diarios y estacionales en su entorno evaluando en qué medida la luz y la temperatura controlan los niveles y/o la función de genes centrales del reloj a través de su efecto sobre el proceso del *splicing* alternativo.

Los objetivos específicos apuntan a la identificación de genes del oscilador central cuyo *splicing* alternativo es regulado por tratamientos lumínicos y/o térmicos que sincronizan el reloj, y al análisis de la contribución de los fotorreceptores involucrados en dicha regulación. Además, se evaluará la función biológica de las distintas isoformas cuya abundancia relativa se vea afectada frente a los tratamientos.

Hipótesis

En este trabajo se propone al *splicing* alternativo asociado a cambios ambientales como uno de los mecanismos moleculares implicados en el control y operación del sistema circadiano. Como primera hipótesis se plantea que la luz regula el *splicing* alternativo de un subgrupo de genes centrales del reloj de las plantas, y que esta regulación está mediada, al menos en parte, por fotorreceptores como los fitocromos. La segunda hipótesis es que, dado que el transcriptoma de las plantas se ajusta de forma constante en respuesta a las condiciones ambientales y/o estrés, y teniendo en cuenta la creciente evidencia sobre componentes del reloj circadiano que sufren *splicing* alternativo frente a señales externas variables, las distintas isoformas generadas a partir este proceso podrían tener un rol regulatorio fundamental. Posiblemente, afectando la funcionalidad de las proteínas resultantes para controlar los niveles de transcritos y/o proteínas, o bien, para promover la sincronización lumínica o compensación térmica del reloj.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de crecimiento estándar

Todos los experimentos fueron llevados a cabo con el ecotipo Columbia (Col-0) de *Arabidopsis thaliana*. Para la primera parte de este estudio se utilizó la quintuple mutante de fitocromos, *phyQ*, previamente descrita (120,121). La misma fue obtenida a partir de la cruce de las líneas mutantes *phyA-211* (122); *phyB-9* (123); *phyC-2* (124); *phyD-201* (Salk_027956) y *phyE-201* (Salk_040131) (120,125).

Para la sección de SA asociado a cambios ambientales, se empleó la triple mutante *rve4-1;6-1;8-1* CCR2::LUC (*rve4-1*/Salk_137617; *rve6-1*/Salk_069978 y *rve8-1*/Salk_053482), caracterizada en estudios anteriores (28,37), y la cuádruple mutante *lnkQ* (126). Esta última fue obtenida en nuestro laboratorio mediante la cruce de mutantes dobles *lnk12* (*lnk1-1*/Salk_024353 y *lnk2-1*/GK_484F07) (29) y simples, *lnk3-1* (Salk_085551C) y *lnk4-1* (GK_846C06). El fondo genético en todos los casos corresponde a la accesión Columbia-0 (Col-0) de *Arabidopsis*. Las semillas de mutantes individuales fueron obtenidas de la colección de mutantes por inserción de T-DNA del Arabidopsis Biological Research Center (ABRC). La verificación de mutantes múltiples fue realizada mediante el análisis por PCR del ADN genómico.

Dependiendo del experimento, las plantas se cultivaron en sustrato inerte conteniendo una mezcla de perlita, vermiculita y turba (1:1:2), a 22°C en condiciones de día largo (LD, ciclos de 16h de luz y 8h de oscuridad con 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca), día corto (SD, ciclos de 8h de luz y 16h de oscuridad con 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca), 12:12 (12h luz/12h oscuridad con 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca) o luz continua (LL, con 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca).

Genotipado de mutantes

Para verificar que las poblaciones de semillas mutantes poseían la inserción de T-DNA en ambos alelos del locus 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 (127). Para el diseño de los 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 para cada alelo mutante amplifica el alelo WT, mientras que otro set amplifica el alelo que contiene

la inserción de T-DNA. Los primers que hibridan en la inserción de T-DNA se emplean en todas las mutantes. Las secuencias detalladas se encuentran en la Tabla suplementaria S1. 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).

Condiciones de crecimiento y protocolo para la secuenciación de alto rendimiento

Para el experimento de tratamiento nocturno, semillas de WT y *phyQ*, esterilizadas con vapores de cloro, se suspendieron en 100 µM de GA₄+7 (Duchefa Biochemie), se estratificaron durante 3 días a 4 °C y se dispusieron sobre placas con medio Murashige y Skoog (MS) y agar vegetal al 0,8 % (Duchefa Biochemie). Posteriormente, las plantas germinaron y se mantuvieron en ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad a 22°C (50 µmol m⁻² s⁻¹ de luz blanca proporcionada por tubos fluorescentes). Luego de 10 días, la mitad fue expuesta a un pulso de luz R de 2 h a mitad de la noche (ZT18) y el resto se mantuvo en oscuridad como control (dark). El pulso de luz R se administró con diodos emisores de luz (LED Kingbright Super Bright, L934-SRC, λ= 660 ± 20 nm). El experimento se realizó por triplicado y, en todos los casos, las muestras de los grupos tratados con luz y de control en oscuridad se cosecharon simultáneamente y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. El RNA total fue extraído empleando el Kit Spectrum Plant Total RNA (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) siguiendo los protocolos del fabricante. Se determinó la concentración y calidad del ARN obtenido con NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) y mediante corrida en gel de agarosa.

La generación de las bibliotecas de ADNc y posterior secuenciación fueron realizadas por Novogene (EE. UU.). De manera breve, el ARN mensajero se purificó a partir del ARN total utilizando microesferas magnéticas unidas a oligonucleótidos poli-T. Tras la fragmentación, se sintetizó el ADNc de primera cadena utilizando hexámeros aleatorios, seguido de la síntesis del ADNc de segunda cadena. A continuación, se ligaron los adaptadores y los fragmentos se seleccionaron por tamaño y se amplificaron. Las muestras se secuenciaron en la plataforma Illumina NovaSeq 6000, lo que proporcionó lecturas pareadas de 150 pb. En promedio, se obtuvieron 61 millones de lecturas pareadas de 150 nt para cada muestra.

Para el experimento de expresión temporal o *Time Course* (TC) a temperatura variable, plantas WT (Col-0) se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 12 h de luz/ 12 h de oscuridad a 22°C. El undécimo día, las plántulas se expusieron por grupos en cámaras incubadoras (Ingelab) a 12°C, 17°C y 27°C en luz continua (LL). Se mantuvo un grupo control a 22°C en LL. La primera muestra se cosecho una hora luego de iniciado el tratamiento térmico (ZT1) y a partir de este punto se colectaron muestras cada 4 horas durante 48 horas. Se obtuvo un total de 12 muestras o puntos. El experimento se realizó por triplicado y, las muestras de los grupos tratados a distintas temperaturas y control se cosecharon simultáneamente en cada punto y se congelaron en nitrógeno líquido. El RNA total fue extraído mediante el uso de TRIzol (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. La generación de las bibliotecas de ADNc fue llevada a cabo como se detalló previamente. Las muestras fueron secuenciadas por el método de paired-end, compatible con la plataforma Illumina HiSeq 1500.

Procesamiento de las lecturas de la secuenciación de ARN

Las lecturas de secuencia fueron mapeadas al genoma de *Arabidopsis thaliana* TAIR10 (128) utilizando STAR 2.7.0 (129) con los siguientes parámetros: *twopassMode* Basic, *outFilterMultimapNmax* 2, *outFilterType* BySJout, *outSJfilterReads* Unique, *sjdbOverhang* 149, *alignSJoverhangMin* 6, *alignSJDBoverhangMin* 3, *alignIntronMin* 20 y *alignIntronMax* 5000. El porcentaje promedio de lecturas mapeadas de forma única fue del 86,75 %. A partir de los archivos de alineación (archivos bam) generados y empleando scripts de R (130), se obtuvieron las tablas de cuentas (counts) que permiten analizar expresión diferencial y procesamiento alternativo de pre-ARNm, en base al transcriptoma del repositorio TAIR10. La visualización de los archivos bam fusionados (combinación de archivos bam de réplicas biológicas individuales en uno solo) para cada condición y la generación de Sashimi plots se realizó con el software IGV 2.6.2 (Integrative Genomics Viewer) (131).

Análisis de *splicing* diferencial

Los eventos de *splicing* diferencial (DSEs) se evaluaron utilizando el paquete ASpli versión 2.10.0 en R 4.1.1 (132). El transcriptoma fue particionado en regiones sub-génicas llamadas "bin" (133), las cuales se clasificaron en 3 tipos: exon-bin, intron-bin o *splicing* alternativo(AS)-bin. Además, los AS-bins se subdividieron 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). Primero, se filtraron los genes con menos de 50 lecturas de mapeo y densidades de lectura inferiores a 0,05. Además, se descartaron los bins con menos de 25 lecturas de mapeo. Los genes se consideraron diferencialmente expresados entre dos condiciones si $|\log_2(\text{FC})| > \log_2(3)$ con un FDR asociado $< 0,01$. Para el análisis de *splicing*, se calculó el PSI (porcentaje de inclusión) o el PIR (porcentaje de IR). Se consideró que un bin sufrió *splicing* alternativo si la cobertura del bin fue $|\log_2(\text{FC})| > \log_2(3)$ con un FDR asociado $< 0,05$ o $\Delta\text{PSI}/\text{PIR} > 0,1$ con un FDR asociado $< 0,05$. Se realizó un análisis de componentes principales en lecturas normalizadas mediante la mediana de *ratios* DESeq20 (134).

Análisis de expresión génica diferencial

También se realizó un análisis de expresión génica diferencial utilizando ASpli, con los mismos filtros de expresión empleados para el análisis de *splicing* alternativo. Se efectuaron comparaciones simples entre las siguientes condiciones experimentales: WT dark vs. WT R, *phyQ* dark vs. *phyQ* R, WT dark vs. *phyQ* dark, y WT R vs. *phyQ* R. Además, se utilizó la fórmula de ASpli para estimar, mediante un modelo lineal generalizado, el efecto del genotipo, el tratamiento lumínico y la interacción entre ambos. Los genes con un FDR $< 0,01$ y $|\log_2(\text{FC})| > \log_2(1)$ se consideraron diferencialmente expresados. Para los gráficos de expresión, los *counts* brutos se normalizaron con DESeq2 (134). Para cada condición, se analizaron tres réplicas biológicas.

Análisis de categorías funcionales enriquecidas (*Gene Ontology*, GO)

La asignación de términos GO para los conjuntos de datos de genes de expresión diferencial (DEGs) y genes de *splicing* diferencial (DSGs) se obtuvo utilizando los paquetes Bioconductor topGO versión 2.44.0 y org.At.tair.db versión 3.13.0. Se realizó una prueba de enriquecimiento para la categoría de proceso biológico. Los valores de p se obtuvieron mediante la prueba exacta de Fisher. El factor de enriquecimiento (EF) se estimó como el cociente entre la proporción de genes asociados con una categoría de GO particular, presente en el conjunto de datos analizado, en relación con la proporción del número de genes de esta categoría en todo el genoma que paso los filtros de expresión.

Validación de eventos de *splicing* alternativo

RT-PCR

Para la validación de eventos de SA regulados por luz y/o por fitocromos, se sembraron tres réplicas biológicas de plantas de *Arabidopsis* (Col-0) y mutantes *phyQ* en placas de agar MS 0,8%. Se estratificaron en oscuridad y frío durante 3 días previo a su crecimiento durante 10 días en condiciones de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. En el día once, las plántulas se sometieron a un pulso de luz de 2 h en ZT18 o se mantuvieron en oscuridad. El ARN total se extrajo con el kit Spectrum Plant Total RNA (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), siguiendo los protocolos del fabricante. Para estimar la concentración y la calidad de las muestras, se utilizó un NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y electroforesis en gel de agarosa. Un microgramo de ARN se trató con ADNasa libre de ARNasa RQ1 (Promega, Madison, WI, EE. UU.) y se retrotranscribió con la transcriptasa inversa Super Script III (SSIII RT) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y oligo-dT, según las instrucciones del fabricante. La amplificación del ADNc se realizó durante 30 ciclos para medir la abundancia relativa de las isoformas en la fase lineal de amplificación, utilizando 1,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Los primers utilizados para la amplificación se detallan en la Tabla suplementaria S1. Los productos de RT-PCR se sometieron a electroforesis en agarosa al 2 o 3 % (p/v) y se detectaron mediante SYBR Green I (Invitrogen).

Para la validación de los eventos de *splicing* de RVE8/LNK1, plántulas de *Arabidopsis* (Col-0), previamente estratificadas durante 3 días en oscuridad y frío, fueron crecidas en placas de agar MS 0,8% bajo ciclos de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad a 22°C por 10 días. Luego, la mitad de las plántulas fue expuesta a 12°C y el resto permaneció en condiciones normales. El tejido vegetal se cosechó en el momento del día en que se reporta el pico de expresión de los genes analizados (ZT3-ZT6) (135). El ARN total se extrajo con TRIzol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones provistas por los fabricantes. El ARN purificado se sometió a un tratamiento con DNAsa, empleando la enzima RQ1 (Promega). A partir de 1 µg de ese ARN se sintetizó ADNc utilizando la enzima MMLV (Invitrogen). La amplificación del ADNc se realizó durante 30 ciclos, utilizando 1,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen). Se emplearon primers específicos flanqueando las regiones de interés (Tabla suplementaria S1.) Al producto se le agregó SYBR Green en una dilución 1:10000 y se sembró en gel de

agarosa 2%. Luego de la corrida electroforética se detectaron las bandas correspondientes por trans-iluminación con luz UV.

Secuenciación de amplicones (*Amplicon Sequencing*)

Para la validación del evento 3'alt de RVE8 por *amplicon sequencing*, se cultivaron plantas de *Arabidopsis* (Col-0) en un fotoperiodo de 12/12 por 10 días. Luego, la mitad de las plántulas fue expuesta a un pulso de 2 horas de luz blanca en la mitad de la noche (ZT18) y el resto continuó en oscuridad. Se extrajo el ARN de 2 réplicas biológicas independientes por condición y se retrotranscribió según lo detallado previamente. El ADNc fue amplificado durante 30 ciclos. Los productos de PCR se purificaron con Wizard miniprep DNA purification system (Promega) y se estimó la calidad y concentración de las muestras mediante NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) y electroforesis en gel de agarosa. Finalmente, los amplicones se enviaron a Novogene (EE. UU.) para su secuenciación mediante la plataforma Illumina NovaSeq 6000, que devolvió lecturas pareadas de 100 pb. Se obtuvieron 5424 lecturas para las muestras tratadas y 7825 lecturas pareadas de 100 pb para las muestras control. Las mismas fueron mapeadas al genoma de *Arabidopsis thaliana* TAIR10, utilizando STAR 2.7.0 (129) con los parámetros preestablecidos. A partir de los archivos bam generados y empleando scripts de R (130), se obtuvieron las tablas de *counts* que permitieron evaluar los cambios en el *splicing* alternativo con el tratamiento. El análisis y la generación de Sashimi plots se realizó con el software IGV 2.6.2 (131). Estos gráficos combinan la representación de lecturas alineadas con arcos que indican la cantidad de lecturas que soporta cada unión de exón-intrón. Se calculó el PSI (porcentaje de inclusión) utilizando la fórmula $PSI = J_i / (J_i + J_e) \times 100$, donde J_i corresponde a "juntura de inclusión" y J_e a "juntura de exclusión".

Generación de líneas transgénicas

Líneas transgénicas RVE8

Los clonados se realizaron utilizando la tecnología Gateway (Invitrogen), basada en el sistema de recombinación sitio-específica del fago λ , que 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. Para generar los vectores binarios de sobreexpresión CaMV35S::RVE8-FL:GFP/CaMV35S::RVE8-AS:GFP, se amplificó por PCR el ADNc de RVE8 y su isoforma AS, ambas de ~0,9 Kb, con la enzima polimerasa

de alta fidelidad Q5 (NEB), utilizando primers específicos en cada caso (Tabla suplementaria S1). Los sitios de recombinación específicos necesarios para emplear la tecnología Gateway se incorporaron en los mismos primers. Luego se incubó el fragmento con el vector de clonado pDONR/201 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 DH5 α de *Escherichia coli*. Los clones positivos fueron seleccionados en placas con medio LB y el antibiótico kanamicina (50 μ g/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 pEarlyGate103 (136) en presencia de la enzima LR Clonase II (Invitrogen). El plásmido resultante fue clonado en bacterias DH5 α . Los clones positivos fueron seleccionados en placas con medio LB y el antibiótico kanamicina (50 μ g/ml), confirmados por colony PCR. De forma similar, las construcciones bajo el control del promotor endógeno pRVE8::RVE8-FL:GFP/pRVE8::RVE8-AS:GFP, se generaron amplificando por PCR el ADNc de RVE8-FL y RVE8-AS, y ~0,7 Kb de ADN genómico de la región no codificante río arriba del sitio de comienzo de la transcripción. Luego los fragmentos obtenidos se clonaron en pDONR/201 y pDONR/P4-P1r, respectivamente, seguido de recombinación con enzima LR y el vector de expresión pK7m34GW. Los clones positivos fueron seleccionados en placas con medio LB y el antibiótico espectinomicina (100 μ g/ml). Todos los constructos se secuenciaron para confirmar su identidad y que no se hayan introducido mutaciones. Los vectores binarios fueron purificados e introducidos por electroporación en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*. Luego, se transformaron plantas mutantes *rve468* siguiendo el método de "floral dip" (137). Las plantas transformadas fueron seleccionadas en medio MS conteniendo 15 μ g/ml del herbicida PPT (*phosphinothricin* o glufosinato de amonio), en el caso de las sobreexpresantes y 50 μ g/ml del antibiótico kanamicina para las líneas de expresión endógena. Se obtuvieron alrededor de 10 líneas transgénicas independientes (T1) de cada construcción. Para algunas de ellas se obtuvieron semillas homocigotas de la tercera generación (T3). Tres líneas sobreexpresantes de cada isoforma se utilizaron para evaluar la complementación de la mutante *rve468*. Para los experimentos de inmunotransferencia se utilizó una línea endógena homocigota de cada isoforma.

Líneas transgénicas LNK1

Los vectores para la expresión de las isoformas de LNK1 bajo el control del propio promotor, pLNK1::LNK1-FL:HA/pLNK1::LNK1-AS:HA, se generaron según el procedimiento descrito. Se amplificó por PCR el ADNc de LNK1 y su isoforma AS, ambas de ~1,8 Kb, utilizando la enzima polimerasa de alta fidelidad Q5 (NEB). Además, se amplificó un fragmento genómico de ~1,7 Kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de LNK1, a partir de ADN genómico. Los productos resultantes se clonaron en pDONR/201 y pDONR/P4-P1r, respectivamente, seguido de recombinación con enzima LR y el vector de expresión pK7m34GW. Los clones positivos en bacteria fueron seleccionados en placas con medio LB y el antibiótico espectinomicina (100 µg/ml). Todos los constructos se secuenciaron para confirmar su identidad y que no se hayan introducido mutaciones. Los vectores binarios fueron purificados e introducidos por electroporación en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*. Luego, se transformaron plantas mutantes *lnkQ* siguiendo el método de "floral dip" (137). Las plantas transformadas fueron seleccionadas en medio MS conteniendo 50 µg/ml de kanamicina. Se obtuvieron alrededor de 10 líneas transgénicas independientes (T1) de cada construcción. Para algunas de ellas se obtuvieron semillas homocigotas de la tercera generación (T3). Se seleccionaron dos líneas expresando cada isoforma para evaluar la complementación de la mutante *lnkQ* (Figura suplementaria S8). Todos los primers utilizados se detallan en la tabla suplementaria S1.

Análisis de la expresión por qRT-PCR

Medición de los niveles de expresión de líneas transgénicas

Las semillas de las líneas transgénicas generadas y Col-0 se sembraron en medio MS, se estratificaron por 3 días en oscuridad y frío, y crecieron a 22°C en condiciones de LD. Al cabo de 10 días plántulas completas se cosecharon en el momento del día de máxima expresión de *RVE8* (ZT4-ZT6) (135). Se extrajo ARN total utilizando reactivo TRIzol (Invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Un microgramo de ARN fue tratado con RQ1 RNase-Free DNase (Promega) y sujeto a una retrotranscripción por Super Script II Reverse Transcriptase (SSII RT) (Thermo Fisher Scientific) y oligo-dT, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Los ADNc resultantes fueron luego amplificados utilizando Fast Start Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche) en un ciclador Mx3000P

Real Time PCR System (Agilent Technologies). El transcripto del gen *IPP2* (At3G02780) 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 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (138). Estos experimentos se realizaron por duplicado, con un $n=3$ para cada genotipo. Los primers utilizados se enumeran en la Tabla suplementaria S1. Para el análisis estadístico de los datos de expresión se utilizó un ANOVA de un factor seguido de pruebas de Bonferroni.

Análisis de los patrones de expresión de genes regulados por RVE8 en frío

Para el análisis temporal de la expresión de genes diana de RVE8, semillas de plantas WT, mutantes *rve468* y las líneas de expresión endógena de RVE8 se sembraron en placas con MS 0,8% agar, se estratificaron por 3 días en oscuridad y frío, y crecieron en condiciones de 12 h de luz/12 h de oscuridad a 22°C por 10 días. Luego, la mitad de las plántulas fue transferida a una incubadora a 8°C en LL por 25 horas, mientras que el resto permaneció a 22°C en LL. Las muestras fueron cosechadas a partir del ZT0, cada 3 horas hasta el anochecer subjetivo y se colectó un punto adicional a las 25 horas de tratamiento. Las muestras del grupo tratado y el control se cosecharon simultáneamente en cada punto y se congelaron en nitrógeno líquido. Se realizó la extracción del ARN total del tejido vegetal correspondiente a los 3 puntos temporales iniciales del experimento (ZT0-ZT6), seguido de la retro-transcripción, según el protocolo preestablecido. Los ADNc resultantes fueron luego amplificados utilizando Fast Start Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche) en un ciclador Mx3000P Real Time PCR System (Agilent Technologies). El transcripto del gen *IPP2* (At3G02780) se utilizó como referencia. La cuantificación de la expresión de genes en las líneas transgénicas en ambas condiciones se realizó mediante el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (138), relativizando en todos los casos a WT 22°C en cada punto temporal (control interno). Únicamente la expresión de genes en WT se normalizó a un punto o valor de referencia (por ej., ZT0), para observar el patrón circadiano. Estos experimentos se realizaron con 2 réplicas biológicas y 3 réplicas técnicas por genotipo en cada condición. Los primers utilizados se detallan en la Tabla suplementaria S1. Para el análisis estadístico de los datos de expresión se utilizó ANOVA de dos factores seguido de pruebas de Bonferroni.

Ensayos de movimiento de hojas

Para el análisis del movimiento de hojas, las plantas se mantuvieron en un fotoperíodo de día largo (16h luz, 8h oscuridad) hasta que el primer par de hojas estaba completamente desarrollado, a este período se lo conoce como entrenamiento. Luego se transfirieron a una cámara con luz blanca continua con una irradiancia de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 22°C , donde fueron fotografiadas cada 2 h por 6 días con cámaras digitales. En los ensayos realizados a bajas temperaturas, posterior al período de entrenamiento en LD a 22°C , se trasladaron las plántulas a una incubadora con luz blanca continua a 16°C para la medición. En cada fotografía se midió el ángulo formado por el primer par de hojas empleando el software ImageJ (139). Finalmente, se determinó el período de la oscilación del ángulo entre el primer par de hojas mediante un análisis de FFT-NLLS (Fast Fourier Transform–Nonlinear Least Squares) disponible en el software BioDare2, repositorio de data biológica circadiana. Estos experimentos se realizaron al menos 2 veces con un $n=5$ para cada genotipo. Para las comparaciones de líneas transgénicas entre sí y con respecto a los controles, se utilizó el análisis de ANOVA de una vía seguido de pruebas de Tukey de comparaciones múltiples.

Ensayos de elongación de hipocotilos

Para la medición de la inhibición de la elongación del hipocotilo se sembraron semillas de las líneas transgénicas sobreexpresantes de RVE8, WT y *rve468* sobre agar al 0,8% en agua. Las mismas fueron estratificadas en condiciones de oscuridad y frío por cuatro días y luego se les administró un pulso de dos horas de luz blanca para inducir la germinación. Finalmente fueron expuestas a ciclos de luz blanca en LD, SD, luz blanca continua ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o se mantuvieron en completa oscuridad. Luego de 4 días en los tratamientos correspondientes, se midió la longitud de los hipocotilos. Los efectos de la luz sobre la elongación del hipocotilo fueron evaluados relativizando el largo del hipocotilo en cada tratamiento lumínico al largo del hipocotilo de las plántulas del mismo genotipo en el tratamiento de oscuridad.

En los ensayos a temperatura variable, luego de la estratificación, las plántulas se mantuvieron por 4 días en LD ($1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o en oscuridad a 16°C y a 28°C . Los valores obtenidos de las mediciones se relativizaron al largo del hipocotilo de las plántulas del mismo genotipo en el tratamiento de oscuridad a 16°C o 28°C , según

corresponda. Estos experimentos se realizaron 6 veces por tratamiento, midiendo 10 plántulas por genotipo y por tratamiento en cada repetición. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de un factor, seguido de pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y Dunnett.

Ensayos de tiempo a floración

El tiempo a floración se determinó contando el número de hojas en la roseta de la planta ya inducida la floración, cuando el escapo floral tenía aproximadamente 1cm. El número de hojas de la roseta se estableció para cada planta como indicador de la duración de la fase vegetativa del desarrollo. De este modo, se estima el tiempo biológico que tarda en florecer independizándose de su velocidad de crecimiento (140). Estos experimentos se realizaron por triplicado con n=12 plantas por genotipo en cada ocasión. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de un factor seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Análisis de inmunotransferencia

Para el análisis de la acumulación de las isoformas de RVE8 y LNK1 por western blot, se crecieron plántulas de las líneas transgénicas generadas en MS 0,8% agar a 22°C, en condiciones de LD. Luego de 10 días, se colectaron 50 mg de tejido vegetal (peso fresco) para la extracción total de proteínas. El procesamiento se llevó a cabo moliendo las muestras en nitrógeno líquido, para su posterior homogeneización en cracking buffer 1,25x (0,12 M Tris- HCl, pH 6,8, SDS al 4,8 % [p/v], urea 7 M, Ditiotreitolo o DTT 20% [v/v] y bromophenol blue). Luego se desnaturalizaron a 70°C durante 10 minutos y se centrifugaron a temperatura ambiente (10 minutos a 10000 rpm). El sobrenadante resultante se sometió a separación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, según lo descrito previamente (141). Las muestras de proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (GE Healthcare) que luego se tiñó con solución de Ponceau S (0,1 % [p/v] de Ponceau S [Sigma-Aldrich] y 5 % [v/v] de ácido acético) para comprobar la carga de proteína de las muestras. La detección de las proteínas RVE8 fusionadas a GFP, se realizó utilizando el anticuerpo primario monoclonal anti-GFP (dilución 1:2000, Roche) y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón unido a HRP (dilución 1:5000, Sigma). Las proteínas LNK1 fusionadas con HA, en cambio, fueron detectadas con anticuerpo anti-HA (dilución 1:2000, Santa Cruz Biotechnology) y

anticuerpo secundario anti-IgG de conejo unido a HRP (dilución 1:5000, Sigma). Las señales se detectaron con el reactivo ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) y un sistema Image Quant LAS-4000 (GE Healthcare). Los experimentos se realizaron al menos dos veces y se muestran resultados representativos.

Análisis de los patrones de acumulación de las isoformas de RVE8 en frío

Para el análisis de los patrones de acumulación de las isoformas de RVE8 a bajas temperaturas, se cultivaron semillas de las líneas de expresión endógena de ambas isoformas en placas con MS 0,8% agar, bajo ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad a 22°C por 10 días. Luego, la mitad de las plántulas fue trasferida a 8°C por 25 h en luz blanca continua y el resto permaneció a 22°C (LL) como control. Se realizaron cosechas desde el ZT0 y cada 3 horas durante todo el día subjetivo. Finalmente se hizo una última cosecha a las 25 horas de tratamiento. Las muestras fueron procesadas para el análisis de inmunotransferencia como se describió en el apartado anterior. La proteína 2-Cys peroxirredoxina (Prx) fue utilizada como control de carga y se detectó con anticuerpo anti-Prx (dilución 1:5000) y anticuerpo secundario anti-IgG de conejo unido a HRP (dilución 1:5000). Las señales se detectaron con el reactivo ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) y un sistema Image Quant LAS-4000 (GE Healthcare). Se colectaron 2 réplicas por genotipo en cada punto para ambos tratamientos.

Modelado de la isoforma alternativa de RVE8

El modelo predictivo de la isoforma de RVE8 y LNK1 se realizó con el sistema de inteligencia artificial (IA) AlphaFold2 (142), el cual utiliza una red neuronal para la predicción estructural de alta precisión que aumenta con el uso de estructuras homologas. Se utilizó un Colab de AlphaFold2 que implementa MMseqs2, el cual se alimentó con las secuencias primarias de las isoformas de cada gen (Q8RWU3-2, RVE8 y A8MQN2-1, LNK1) obtenidas del repositorio central de datos sobre proteínas, Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). El sistema devolvió cinco modelos tridimensionales que se alinearon con el software Chimera para analizar la calidad de la predicción en cada caso (143). También se obtuvieron distintas métricas de confianza como el pLDDT (predicted local-distance difference test), el PAE (por Predicted Aligned error) y un gráfico de la cobertura del alineamiento. Las estructuras fueron diferenciadas por color según los valores de pLDDT (azul: pLDDT > 90; azul claro: 90 > pLDDT > 70; amarillo: 70 > pLDDT

> 50; naranja: pLDDT < 50) para detectar las regiones mejor predichas que correspondían a dominios globulares. Para visualizar las diferencias estructurales entre las isoformas proteicas, se utilizó el software UCSF Chimera (143). Se realizaron alineamientos por dominios de los modelos predictivos de las isoformas alternativas de RVE8 y LNK1 (AF-Q8RWU3-2 y AF-A8MQN2-2, respectivamente) con los modelos de sus proteínas canónicas (AF-Q8RWU3-F1 y AF-A8MQN2-1, respectivamente), disponibles en Uniprot (144). Los valores de desviación cuadrática media (RMSD) fueron calculados en cada caso.

Ensayo de doble híbrido

Para los ensayos de doble híbrido, se utilizó el sistema “Matchmaker Gold Yeast 2-Hybrid System” basado en GAL4 (Clontech, Mountain View, California). Todas las transformaciones se realizaron como se detalla en Manual de protocolos de levaduras “Yeast Protocols Handbook” (Clontech, Mountain View, California). Las proteínas *bait* o carnada, en este caso las isoformas de RVE8, se clonaron en el vector pGBKT7 que codifica el dominio de unión al ADN de GAL4. Luego, se introdujeron en la cepa Y2H Gold (Clontech, Mountain View, California) y las células transformadas se seleccionaron en medio SD/-Trp. Las proteínas *prey* o presa, que corresponden a las isoformas de LNK1, se clonaron en el vector pGADT7 que codifica el dominio de activación de GAL4, se introdujeron en la cepa Y187 (Clontech, Mountain View, California) y las células transformadas se seleccionaron en medio SD/-Trp. Las células diploides provenientes del apareamiento entre ambas cepas se seleccionaron en medio SD/-Leu/-Trp, se amplificaron en medio SD/-Leu/-Trp líquido y se sembraron en placas SD/-Leu/-Trp o SD/-Leu/-Trp/-His con distintas concentraciones del inhibidor 3-AT (3-Aminotriazol) para aumentar la especificidad del ensayo y reducir falsos positivos.

Fluorescencia de GFP y localización subcelular

Para observar la fluorescencia de GFP, se germinaron plántulas de las líneas CaMV35S::RVE8-FL/AS:GFP en placas con agar MS 0,8%, en condiciones de LD (16 h luz/8 h oscuridad) a 22°C durante 4-7 días. Para el experimento de estrés por frío, la mitad de las plántulas fueron transferidas a un cubo con hielo y agua, cuya temperatura oscilaba alrededor de 4 °C, por 5 horas. El resto permaneció a temperatura ambiente como control. Se utilizó un microscopio Pascal LSM710 (Zeiss) para la detección de fluorescencia. Tras la excitación con un láser de 488 nm, se detectó la emisión entre 505

nm y 530 nm. La intensidad de fluorescencia GFP en los núcleos celulares se cuantificó utilizando el software Fiji (ImageJ) (139). Para cada imagen, se seleccionaron manualmente las regiones de interés (ROIs), asegurando un ajuste preciso a la morfología nuclear. Posteriormente, se midió la intensidad media de los píxeles dentro de cada ROI y se promediaron los valores. Se restó la intensidad del fondo de cada imagen para corregir posibles variaciones en la fluorescencia.

CAPÍTULO I

Papel de los fitocromos en el SA de *Arabidopsis*

INTRODUCCIÓN

La luz es crucial para la supervivencia y el éxito de las plantas, no sólo porque es una herramienta muy útil para determinar el entorno en el que se encuentran creciendo sino también porque es su fuente de energía. Diferentes vías de señalización han evolucionado para detectar y traducir correctamente la información lumínica, la cual es utilizada por las plantas para ajustar su crecimiento y desarrollo a las condiciones ambientales predominantes (145). Las plántulas que aún no han emergido del suelo y, por ende, crecen en la oscuridad, tienen tallos alargados, cotiledones cerrados y etioplastos no fotosintéticos. Una vez que se exponen a la luz, sufren una serie de cambios fisiológicos que incluyen la inhibición del crecimiento del hipocotilo, expansión de los cotiledones y desarrollo de cloroplastos, todo lo cual contribuye al cambio de un crecimiento heterótrofo a uno autótrofo (145). Las plantas crecidas en luz, por su parte, detectan cambios en la relación de luz roja/roja lejana percibida, causados por la transmisión selectiva y/o reflexión de estas longitudes de onda en las hojas de plantas vecinas, y responden a esta señal con una serie de reacciones fisiológicas que minimizan las posibilidades de ser sombreadas (146). Finalmente, las plantas maduras perciben cambios en la duración del día y utilizan esta información para ajustar el momento de la transición floral a la estación más favorable del año (147).

Las plantas perciben la intensidad y calidad de la luz a través de un conjunto de moléculas conocidas como fotorreceptores, que convierten los fotones detectados en una señal bioquímica capaz de ser transducida por medio de múltiples eventos moleculares (148). En *Arabidopsis* existen al menos cinco familias de fotorreceptores: (1) fitocromos, (2) criptocromos, (3) la familia ZTL, (4) fototropinas y (5) UVR8 (UV Resistance Locus 8). Cada una de estas familias presenta un espectro de absorción de longitud de onda distinto, así como diferentes propiedades bioquímicas e interactores moleculares. Juntos, estos fotorreceptores permiten a las plantas determinar la irradiancia, composición espectral, dirección y duración de la luz (fotoperiodo) (148–150). En otras palabras, tener un esquema exhaustivo y oportuno de la luz ambiente.

Tras la activación lumínica, la mayoría de estos fotorreceptores controlan múltiples procesos fisiológicos mediante la regulación de la expresión génica a nivel transcripcional (151,152). En particular, los fitocromos, sensores de luz roja (R) y roja lejana (FR), son fundamentales en el control de procesos tales como la germinación, desetiología, escape

al sombreado, entrenamiento del reloj circadiano y floración (153). El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica cinco fitocromos (phyA-E), con phyA y phyB siendo más importantes y ampliamente caracterizados que phyC, phyD y phyE (153).

La luz roja induce un cambio estructural en las proteínas fitocromos, favoreciendo la transición desde la conformación Pr inactiva a la conformación Pfr activa. Pr es citoplasmática, mientras que Pfr reside principalmente en el núcleo celular. Durante el crecimiento etiolado, los fitocromos permanecen en su conformación Pr, mientras múltiples factores de transcripción en el núcleo inducen el programa de crecimiento etiolado. Cuando las plantas crecidas en oscuridad perciben luz roja, los fitocromos se convierten a su conformación Pfr, se translocan al núcleo e interactúan físicamente inhibiendo la acción de los factores promotores del crecimiento etiolado PIF, COP1 y SPA, iniciando así la respuesta luminosa (154). El mecanismo molecular detrás del síndrome del escape al sombreado, comparte cierto grado de similitud con el mecanismo de desetiología. La sombra, es decir, una relación baja de luz roja/rojo lejano, promueve la fotoconversión de Pfr a Pr. En consecuencia, la actividad de la COP1, SPA y la familia PIF es desinhibida y se produce la respuesta típica de escape al sombreado, que incluye el alargamiento de los tallos y pecíolos y un aumento de la dominancia apical (154). Además, los fitocromos, especialmente phyB, ayuda a integrar las señales lumínicas externas en el reloj circadiano. Se ha demostrado que phyB interactúa directamente con varios componentes del reloj de manera dependiente de la luz (66,155), y las mutantes nulas *phyA*, *phyB* y *phyA phyB* muestran períodos circadianos más largos que WT (156,157). Con respecto a la floración, phyA es necesario para detectar extensiones en el fotoperíodo, mientras que phyB y phyE regulan la floración fotoperiódica a 22°C y 16°C respectivamente, actuando aguas arriba de FLOWERING LOCUS T (FT) (158,159).

Además de la regulación transcripcional, existe creciente evidencia de que la luz controla otros aspectos de la red regulatoria de la expresión génica, como la estabilidad del ARNm, la traducción y el *splicing* alternativo (SA) (152,160). Una investigación reciente ha revelado un rol para el fotorreceptor de luz azul, cry2, en la modulación del SA. Cry2 regula la actividad de unión de la proteína de unión al ARN, CRYPTOCHROME INTERACTING SPLICING FACTOR 1 (CIS1), influyendo así en el *splicing* del pre-ARNm de FLM y, en consecuencia, en la transición floral (161). Los fitocromos, por su parte, también se ven involucrados en la regulación del SA. Por ejemplo, una breve exposición a la luz roja en plántulas etioladas regula los patrones de SA de cientos de genes, incluyendo los mismos

factores de *splicing*. Estos efectos están mediados, al menos en dicho estadio de desarrollo, por los fitocromos más abundantes, phyA y phyB (162).

Se ha reportado que phyB también interactúa directa e indirectamente con múltiples factores de *splicing*. SPLICING FACTOR FOR PHYTOCHROME SIGNALING (SFPS) se une a phyB, y ambas proteínas co-localizan en el núcleo (163). SFPS también interactúa con otros dos FS: REDUCED RED-LIGHT RESPONSES IN CRY1CRY2 BACKGROUND1 (RRC1) y SUPPRESSOR-OF-WHITE-APRICOT/SURP RNA-BINDING DOMAIN-CONTAINING PROTEIN1 (SWAP1) (164,165). SFPS, RRC1 y SWAP1 son necesarios para el correcto *splicing* regulado por luz de múltiples pre-ARNm de genes implicados en la fotomorfogénesis (163-166). Si bien RRC1 y phyB podrían co-localizar, la evidencia reciente sugiere que sus actividades podrían estar, en parte, desacopladas espacialmente. PhyB detecta la luz roja en el tejido epidérmico e inicia una cascada de señales que finalmente involucra a RRC1 en el tejido endodérmico, regulando los patrones de *splicing* de varios genes, incluyendo los genes reloj *PRR7*, *TOC1*, *JMJD30* y *ELF3* (167). Los mutantes con pérdida de función *sfps*, *rcc1* y *swap1* exhiben fenotipos similares a los observados en el mutante *phyB* durante la desetiología bajo luz roja. Por el contrario, las proteínas relacionadas con el *splicing*, PRE-mRNA-PROCESSING PROTEIN 40 (PRP40) y SWELLMAP 2 (SMP2) también han sido implicadas en la vía de señalización de la luz roja, pero tienen un papel supresor en la fotomorfogénesis (168,169). Específicamente, SMP2 interactúa físicamente con phyB y regula el *splicing* del gen del oscilador central *RVE8* (169). Como era de esperar, la doble mutante *phyA phyB* muestra fuertes alteraciones en el *splicing* durante la fotomorfogénesis (162).

Además de la regulación de los patrones de *splicing* mediada por fotorreceptores, se ha descrito otro mecanismo mediante el cual la luz controla el SA en las plantas. Una señal retrógrada del cloroplasto vinculada al estado redox de las plastoquinonas modula los patrones de *splicing* de los transcritos de FS como *RS31*, *U2AF65* y *SR30* (170). Esta señal retrógrada mejora la velocidad de elongación de ARN Pol II, favoreciendo la selección de sitios fuertes de *splicing*, mientras que la oscuridad ralentiza la elongación de la RNA Pol II, promoviendo el uso de sitios de *splicing* débiles (171). En las raíces, el SA está regulado por los azúcares generados durante la fotosíntesis de manera dependiente de la vía de TARGET OF RAPAMYCIN (TOR) (172).

En un estudio realizado en nuestro laboratorio, demostramos que el tratamiento con un pulso de luz blanca en la mitad de la noche, en plantas crecidas en ciclos de 12 h luz:12 h oscuridad, altera los patrones de *splicing* de cientos de genes (52). Sin embargo, aún se desconoce en qué medida cada una de las vías antes mencionadas contribuye a la regulación del SA en plantas crecidas en luz. Además, aunque el papel de los fitocromos en la red regulatoria del SA se ha estudiado en plántulas etioladas, su rol en el control del SA en plantas crecidas en luz aún no se ha analizado en detalle.

La mutante quíntuple de fitocromos (*phyABCDE*, en adelante *phyQ*) ha sido ampliamente caracterizada a nivel fisiológico y molecular (79,120,121,173). Las plantas mutantes *phyQ* son completamente insensibles a la luz roja para la inducción de respuestas fotomorfogénicas en plántulas etioladas, comportándose como plantas crecidas en oscuridad bajo esta condición (120,173). Además, son prácticamente ciegas frente a un pulso de luz roja de 2 h que desencadena la reprogramación transcripcional en plántulas etioladas de genotipo WT (173). Por el contrario, las mutantes *phyQ* desetiolan casi normalmente tras la exposición a luz azul, que activa otras familias de fotorreceptores (120,173). En esta oportunidad, buscamos cuantificar la contribución de los fitocromos a la regulación del SA en plantas de *Arabidopsis* crecidas en luz. Para investigar esto, comparamos los patrones de *splicing* entre plantas WT y mutantes *phyQ* en respuesta a un tratamiento puntual con luz roja en plántulas que fueron previamente desetioldadas en condiciones de luz blanca.

RESULTADOS

Impacto del tratamiento con luz R sobre el SA en las mutantes *phyQ*

Para identificar eventos de SA específicos regulados por la luz roja y/o fitocromos, llevamos a cabo un experimento de tratamiento nocturno exponiendo plántulas WT y mutantes *phyQ* a un pulso de luz roja de 2 h a la mitad de la noche (de ZT= 18 h a 20 h) (Fig. 7a). Posteriormente, realizamos una secuenciación de ARN de alto rendimiento sobre las muestras recolectadas. Un análisis de componentes principales reveló una alta similitud entre réplicas biológicas (Figura suplementaria S1). Notablemente, la primera coordenada principal (PC1) representó el 54% de la varianza, distinguiendo las muestras tratadas con luz roja de las muestras control, mientras que PC2 explicó el 24% de la varianza, distinguiendo las muestras WT de *phyQ*. Esta observación sugiere que, en este diseño experimental particular, el impacto del tratamiento lumínico en el transcriptoma fue más significativo que el de mutaciones en todos los miembros de la familia de fitocromos.

El análisis de SA utilizando ASpli identificó 633 eventos regulados por luz roja en plantas WT, correspondientes a 483 genes (Fig. 7b, c). Entre los 633 eventos diferenciales (*differentially spliced events*, DSEs), 193 también fueron diferenciales en la mutante *phyQ*. Además, se observaron 262 DSEs exclusivamente en las mutantes *phyQ* (Fig. 7b). Las listas de DSEs detalladas se encuentran en el material suplementario de (174). Tanto las plantas WT como *phyQ* exhibieron proporciones comparables de los diferentes tipos de eventos de SA que fueron regulados por luz roja, siendo IR el tipo de evento más frecuente (Fig. 7d).

Los DSEs que respondieron a luz roja tanto en WT como en *phyQ*, se clasificaron como “eventos regulados por luz independientes de fitocromos”. Curiosamente, se ha reportado que algunos de estos eventos, por ejemplo, aquellos asociados a los factores de *splicing* UF2A64, SR30 y KH29 son regulados por luz en diferentes condiciones de crecimiento (Fig. 8a-c). También se observaron alteraciones en los patrones de *splicing* frente al tratamiento con luz R en un componente activador del reloj circadiano, el factor de transcripción RVE8 (Fig. 8d). Este evento de *splicing* del pre-ARNm regulado por luz, fue previamente identificado bajo distintas condiciones experimentales y anotado como evento SA (52).

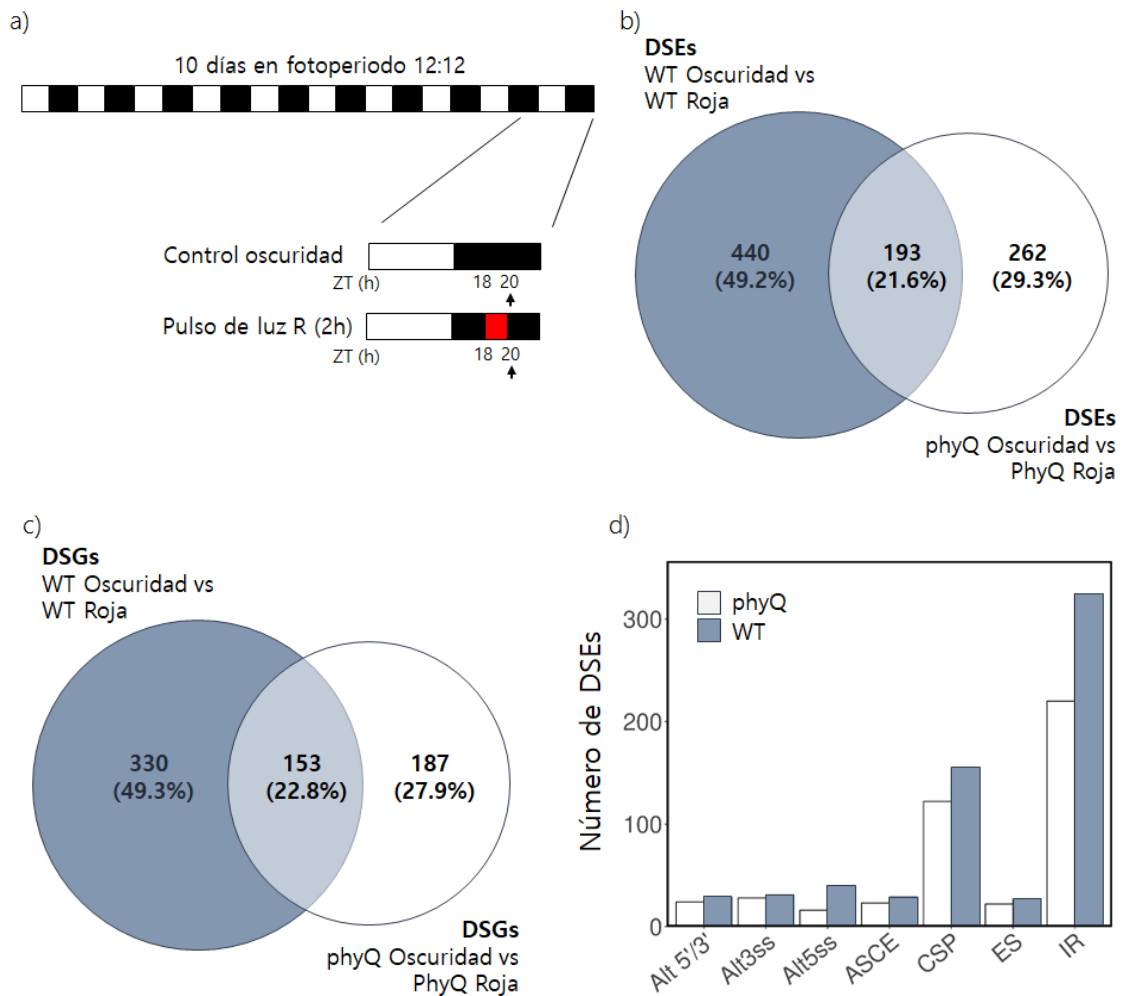


Fig. 7 Contribución de los fitocromos al patrón de *splicing* en *Arabidopsis*. a) Diseño experimental. Las plantas fueron crecidas bajo un fotoperiodo de 12 h luz:12 h oscuridad durante 10 días. Luego, una parte permaneció en la oscuridad y otra fue tratada con un pulso de luz R de 2 h en la mitad de la noche. Las flechas indican el momento de la recolección. b) Eventos con *splicing* diferencial (DSEs), y c) genes con *splicing* diferencial (DSGs) tras el tratamiento con luz R en plántulas WT y mutantes *phyQ*. d) Cantidad de cada tipo de evento de SA en los DSEs entre WT oscuridad vs. WT roja, y *phyQ* oscuridad vs. *phyQ* roja. Alt, sitio de *splicing* (5' y/o 3') alternativo; ES, exclusión de exón; IR, retención de intrón; ASCE, SA que afecta a un exón consenso; CSP, patrón de *splicing* complejo. Adaptado de Careno et al., 2023 (174).

El PSI para *UF2A64* y *SR30* disminuyó tras el tratamiento con luz R, mostrando una reducción en el uso de ss 3' alternativos, mientras que en *KH29*, el tercer exón alternativo mostró una mayor inclusión en el transcripto (Fig. 8e-g). Para el gen circadiano *RVE8*, los valores de PSI aumentaron en respuesta al pulso de luz R, con un mayor uso del ss 3' alternativo en el intrón 7 (Fig. 8h). En todos los casos, las isoformas alternativas introdujeron un codón de terminación prematuro que podría dar lugar a una proteína truncada o *non-sense*. Todos estos eventos de SA fueron validados por RT-PCR (Fig. 8i-p). Estos resultados indican que una gran proporción de los cambios inducidos por la luz

roja en el *splicing* ocurren independientemente de los fitocromos, respondiendo probablemente a señales derivadas del proceso de fotosíntesis.

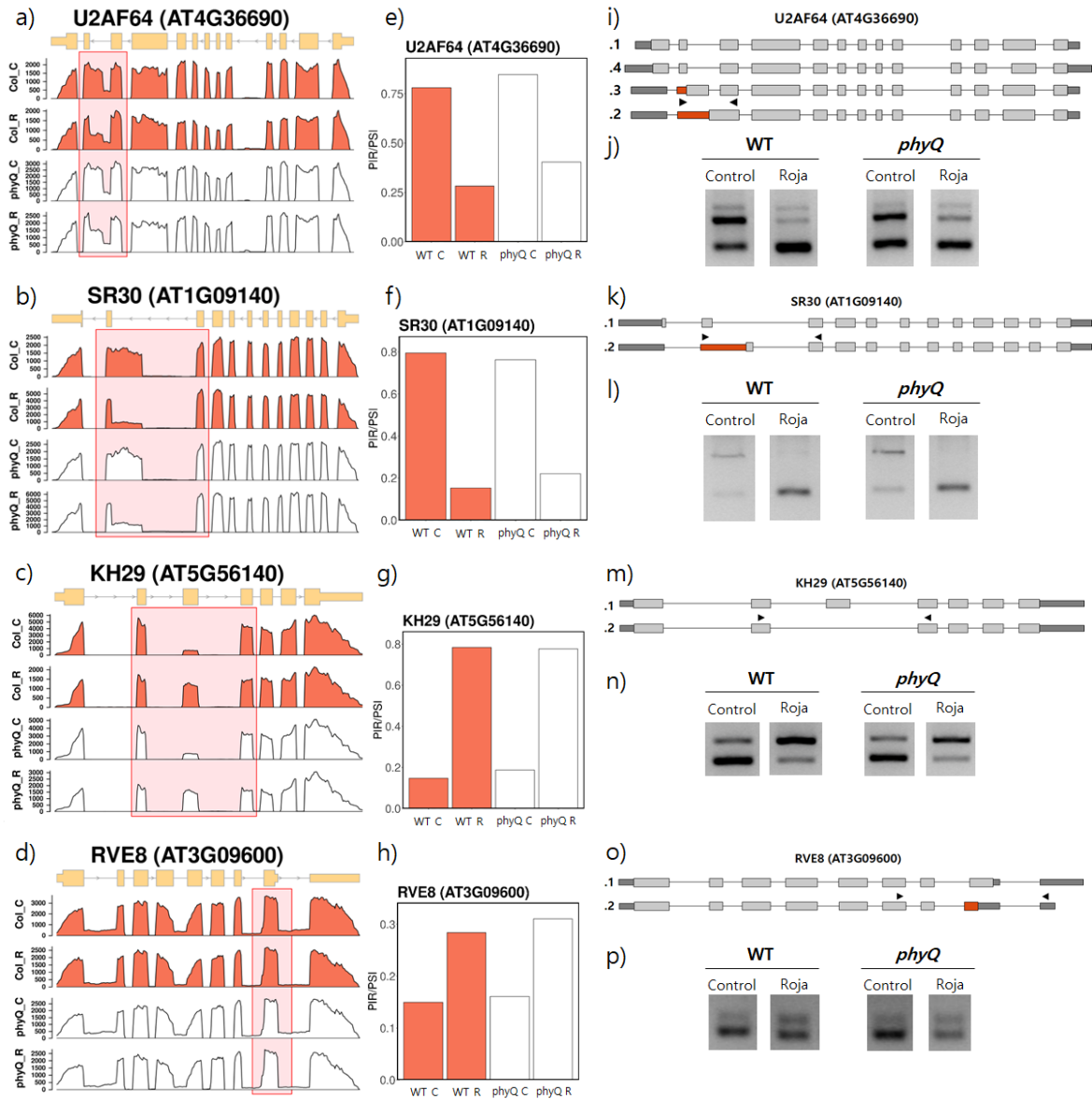


Fig. 8 Eventos representativos de SA regulados por luz pero independientes de fitocromos. Gráficos de cobertura y modelos genéticos correspondientes de a) *U2AF64* (AT4G36690), b) *SR30* (AT1G09140), c) *KH29* (AT5G56140) y d) *RVE8* (AT3G09600). Los gráficos de cobertura se generaron uniendo datos de tres réplicas biológicas distintas. (e-h) Valores promedio de porcentaje de inclusión (*Mean Percentage Spliced-in*, PSI) para cada gen en todas las condiciones experimentales. (i, k, m, o) Modelos genéticos de las diferentes isoformas anotadas para cada gen. Las cajas representan exones, las líneas representan intrones y las flechas representan las posiciones de los primers utilizados para la validación. (j, l, n, p) Validación de eventos con *splicing* diferencial (DSEs) mediante electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR. Adaptado de Careno et al., 2023 (174).

Los fitocromos son necesarios para el *splicing* de un subconjunto de genes

Entre los 440 DSEs exclusivos de WT, un subconjunto mostró cierto grado de dependencia de los fitocromos (Fig. 9a-d). Estos genes mostraron una respuesta más débil al pulso de luz R, como indican los valores de Δ PSI/PIR más pequeños entre *phyQ* con o sin el tratamiento (Fig. 9e-h). La validación de estos DSEs se llevó a cabo mediante RT-PCR (Fig. 9i-p). TTM1 es una metaloenzima asociada con la senescencia (175). Un evento de IR regulado por fitocromos conduce a un cambio en el marco de lectura que provoca un codón de terminación prematuro (Fig. 9i, j). De manera similar, SMD1a, un componente del complejo Smith (Sm) responsable de varios pasos en el metabolismo del ARN (176), sufre SA regulado por luz a través de fitocromos, lo cual conduce a un PTC (Fig. 9k, l). Por otro lado, ANK1, una proteína del retículo endoplasmático que contiene repeticiones de anquirina (177), da como resultado dos isoformas que posiblemente codifican proteínas funcionales (Fig. 9m, n), una variante de 534 aa y otra de mayor tamaño, con 13 aminoácidos adicionales debido a un evento de IR. Un análisis de dominios utilizando la herramienta ScanProsite reveló que la isoforma más larga posee 5 dominios con regiones repetidas de anquirina, mientras que la isoforma más corta posee 6. Finalmente, genes específicos del oscilador central como *PRR7*, *ELF3* y *LNK1* mostraron eventos SA diferencialmente expresados exclusivamente en WT, reforzando la evidencia de la conexión entre el reloj y las vías de señalización por fitocromos. En particular, el co-activador del reloj circadiano LNK1, cuya expresión es inducida por luz (29), sufre un evento de exclusión de exón regulado por fitocromos que presumiblemente resulta en una proteína más pequeña (Fig. 9o, p). En conjunto, estos resultados destacan la importancia de los fitocromos para el adecuado SA de un subgrupo específico de genes en plantas crecidas bajo ciclos de luz/oscuridad.

Los fitocromos regulan la expresión de factores de *splicing*

Al explorar los cambios en la expresión genica tras el tratamiento con luz roja, se identificaron 1634 genes que se expresaron diferencialmente en plantas WT, mientras que solo se detectaron 700 DEGs en mutantes *phyQ* (Fig. 10a). Para ver las listas detalladas de genes consultar tablas suplementarias S4 y S5 en (174). La mayoría de los genes que sufrieron SA no cambiaron su expresión (Fig. 10b). Como ha sido reportado en estudios anteriores, hay una superposición pequeña entre DEGs y DSGs entre WT y mutantes de las vías de señalización de luz roja y azul (161,167).

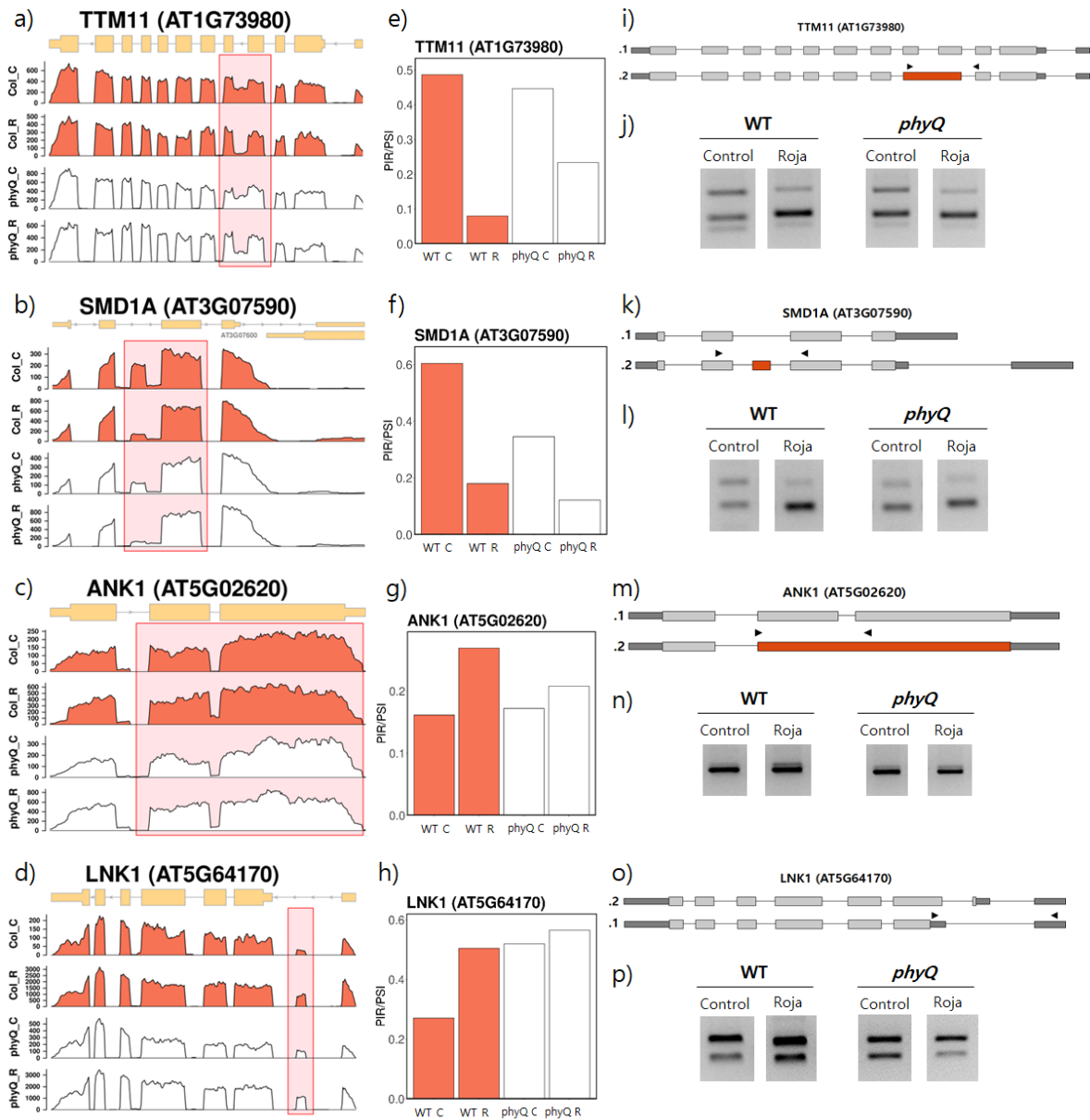


Fig. 9 *Eventos representativos de SA regulados por luz y fitocromos.* Gráficos de cobertura y modelos genéticos correspondientes de a) *TTM1* (AT1G73980), b) *SMD1a* (AT3G07590) c) *ANK1* (AT5G02620) y d) *LNK1* (AT5G64170). Los gráficos de cobertura se generaron uniendo datos de tres réplicas biológicas distintas. (e-h) Valores promedio de porcentaje de inclusión (*Mean Percentage Spliced-in*, PSI) o porcentaje de retención de intrones (*Mean Percentage Intron Retention*, PIR) para cada gen en todas las condiciones experimentales. (i, k, m, o) Modelos genéticos de las diferentes isoformas anotadas para cada gen. Las cajas representan exones, las líneas representan intrones y las flechas representan las posiciones de los primers utilizados para la validación. (j, l, n, p) Validación de eventos con *splicing* diferencial (DSEs) mediante electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR. Adaptado de Careno et al., 2023 (174).

Los niveles de transcritos de los factores de transcripción ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN2 (AtHB-2) y PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 1 (PIL1) son bajos en la oscuridad y/o condiciones de luz blanca en plantas crecidas con luz y aumentan frente a la exposición de FR en plantas WT, mientras que, en los mutantes de

fitocromos, los niveles de expresión son siempre altos (178). Esto fue corroborado con nuestros datos, confirmando que el transcriptoma de plantas mutantes *phyQ* se comportó como lo esperado (Fig. 10c, Figura suplementaria S2a). Además, la expresión del gen del reloj *PRR7* se reguló positivamente tras el tratamiento con luz R en plantas WT, mientras que se mantuvo sin cambios en las plántulas mutantes *phyQ* (Fig. 10d). Esta respuesta es consistente con la función previamente informada de *PRR7* como un componente de señalización que actúa río abajo de los fitocromos (179).

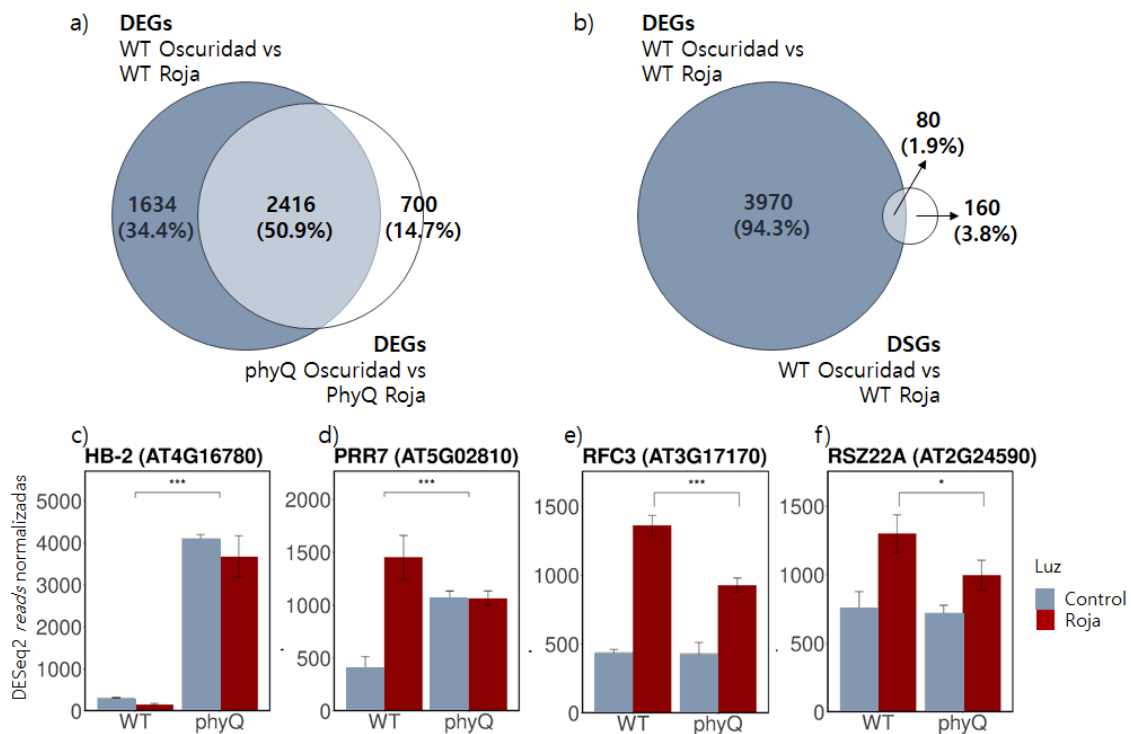


Fig. 10 Efecto de los fitocromos en la expresión genética. a) Superposición entre genes diferencialmente expresados (DEGs) tras un pulso de luz roja en WT y *phyQ*. b) Superposición entre DEGs y DSGs en WT. (c – f) Valores de recuento de lecturas normalizadas de c) *HB-2* (AT4G16780), d) *PRR7* (AT5G02810), e) *RFC3* (AT3G17170), f) *RSZ22A* (AT2G24590). El análisis estadístico se realizó utilizando ASpli. Para *HB-2* y *PRR7*, se muestra la significancia estadística del efecto del genotipo. Para *RFC3* y *RSZ22a*, se muestra la significancia estadística del contraste entre WT R y *phyQ* R. Se muestran la media y la desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes. *: FDR < 0,05, ***: FDR < 0,001. Adaptado de Careno et al., 2023 (174).

Algunos genes relacionados con el *splicing* mostraron una respuesta alterada a la luz R en *phyQ* (Figura 10e, f). El miembro de la familia SR, *RSZ22a*, mostró una pequeña reducción en su expresión en respuesta a la luz R en plántulas mutantes *phyQ* (WT R vs. *phyQ* R $\log_2(\text{FC}) = 0,35$). La función de *RSZ22* y sus homólogos cercanos en *Arabidopsis* se desconoce (180). La proteína *RFC3* mostró una tendencia similar (WT R vs. *phyQ* R $\log_2(\text{FC}) = 0,52$) (Figura 10e). *RFC3* es un miembro de la familia de proteínas ribosomales

bacterianas S6 (bRPS6), que interactúa con factores de *splicing* en plástidos (181). Además, *RS41* y *U2AF35a* mostraron una expresión alterada en respuesta a la luz R en plantas *phyQ* (RS41: WT C vs. WT R, $\log_2(\text{FC})=0,18$; *phyQ* C vs. *phyQ* R, $\log_2(\text{FC})=0,52$; U2AF35a: WT C vs. WT R, $\log_2(\text{FC})=1,34$; *phyQ* C vs. *phyQ* R, $\log_2(\text{FC})=0,81$) (Figura suplementaria S2b, c). Todos estos cambios en la expresión de los factores de *splicing* podrían contribuir en cierta medida a las alteraciones en el patrón de *splicing* gatilladas por el tratamiento con luz roja.

Análisis de ontología génica de DEGs y DSGs regulados por luz

Con el fin de obtener una mejor comprensión sobre los genes que sufren alteraciones en sus patrones de *splicing* y/o niveles de expresión, realizamos un análisis de ontología génica (*Gene Ontology term enrichment analysis, GO*). Este análisis tuvo como objetivo identificar términos específicamente asociados con pulsos de luz que sean dependientes o independientes de los fitocromos. Realizamos análisis de términos GO para todos los DEGs y DSGs bajo condiciones WT. Además, realizamos análisis separados para DEGs y DSGs exclusivamente presentes en WT pero no en la mutante *phyQ* (Fig. 11). La lista detallada de genes puede consultarse en las tablas suplementarias S6-S9, publicadas en (174).

Como era de esperar, la categoría "Respuesta a luz R" (GO:0010114) se destacó. Fuertemente vinculada a esta respuesta, observamos un enriquecimiento en términos asociados con los ritmos circadianos (GO:0007623). Dado que los niveles de clorofila sufren fluctuaciones cíclicas a lo largo del día (182), la perturbación del reloj circadiano inducida por la exposición a luz durante la noche podría contribuir al enriquecimiento del término "Proceso catabólico de la clorofila" (GO:0015996).

De acuerdo con hallazgos anteriores, detectamos un enriquecimiento significativo en términos relacionados con procesos de *splicing* (GO:0008380, GO:0006397, GO:0000395, GO:0000398 y GO:0000380). Este enriquecimiento subraya la intrincada regulación del SA, demostrando su rol en controlar el proceso de *splicing* en sí mismo.

Curiosamente, existe evidencia que demuestra que los experimentos con tratamientos nocturnos aceleran la floración. Este fenómeno podría ser responsable del enriquecimiento de términos como "Morfogénesis de estambres" (GO:0048448),

“Megagametogénesis” (GO:0009561), “Desarrollo de gametofitos” (GO:0048229), “Morfogénesis de órganos florales” (GO:0048444) y “Aceptación de polen” (GO:0060321).

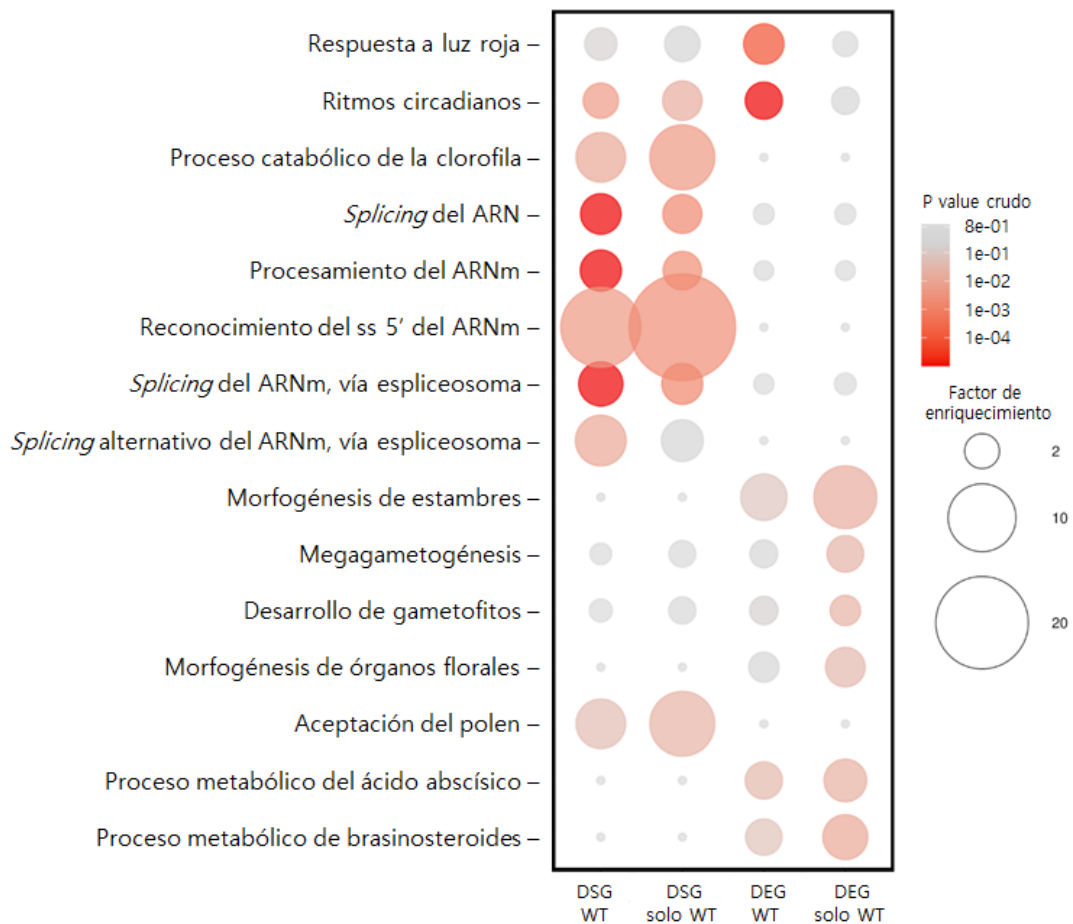


Fig. 11 Análisis de ontología genética (GO). Términos GO seleccionados enriquecidos entre genes que sufren *splicing* diferencial (DSGs) y genes diferencialmente expresados (DEG) identificados en plantas WT, y, DSGs y DEGs identificados en WT pero no en plántulas mutantes *phyQ*. El gradiente de color representa los *p values*, y las diferencias en el tamaño de las burbujas se correlaciona con el factor de enriquecimiento. Adaptado de Careno et al., 2023 (174).

Además, la regulación de los procesos metabólicos del ácido abscísico (ABA) (GO:0009687) y los brasinoesteroides (GO: 0016131) están intrincadamente modulados por *phyB* y las vías de señalización de luz R (183,184), impartiendo así un contexto más amplio a nuestros hallazgos. En conjunto, este análisis sugiere que los procesos fisiológicos regulados por los fitocromos no son sólo consecuencia de cambios en los niveles de expresión del ARNm sino también de cambios en el panorama del SA.

CONCLUSIONES

Se evaluó la contribución relativa de los fotorreceptores fotosensibles y fotosintéticos al control del SA en plántulas crecidas bajo condiciones de luz. Encontramos que 633 eventos de *splicing* se alteran por un tratamiento puntual con un pulso breve de luz roja a la mitad de la noche en plantas WT, correspondientes a 483 genes. De estos eventos, 193 también se alteran en la mutante *phyQ*, lo cual indicaría que son independientes de los fitocromos y fueron clasificados como eventos regulados por luz R. Por otro lado, de los DSEs solo presentes en WT, un subconjunto de genes mostro cierto grado de dependencia de los fitocromos, con una respuesta débil al pulso de luz R en la mutante *phyQ*. Estos resultados sugieren que los fitocromos son necesarios para el adecuado SA de solo una fracción de los eventos de *splicing* regulados por luz R, indicando que la mayoría de los eventos regulados por luz podrían ser controlados por fotorreceptores fotosintéticos.

En el análisis de expresión génica, se identificaron 700 genes que se expresaron diferencialmente en mutantes *phyQ* tras el tratamiento con luz R. Entre estos genes, se detectaron algunos relacionados con el *splicing* como el miembro de la familia SR, *RSZ22a*, *RFC3*, *RS41* y *U2AF35a*. Esto indicaría que los fitocromos modulan la actividad o disponibilidad de factores de *splicing*, que a su vez afectan el SA de genes río abajo, contribuyendo de esta manera a las alteraciones en el patrón de SA provocadas por el tratamiento con luz roja.

Por último, los términos GO más enriquecidos en los genes cuya expresión y SA son regulados por luz roja fueron los relacionados con procesos biológicos como la respuesta a la luz, los ritmos circadianos, el metabolismo del RNA, el desarrollo de la planta, y la transición floral. Estos resultados reflejan las funciones fisiológicas de los fitocromos como fotorreceptores que modulan la expresión génica y el SA en respuesta a señales lumínicas.

CAPÍTULO II

SA de genes del reloj circadiano asociado a cambios ambientales

INTRODUCCIÓN

Mantener una información temporal precisa es esencial para la supervivencia y óptimo crecimiento de las plantas. También es importante para anticiparse correctamente a las señales diarias y estacionales, como la duración de la luz y la variación de temperatura. Esto implica que el reloj circadiano se adapte a las temperaturas cambiantes del entorno sin sufrir alteraciones en su tiempo biológico. Para ello, posee un sistema de amortiguación molecular denominado “compensación de la temperatura”, que permite mantener ritmos robustos a través de un rango fisiológico de temperaturas, logrando así que las vías de salida del reloj sean, en gran medida, insensibles a estas fluctuaciones (111,185). Otra propiedad del sistema circadiano es su capacidad para sincronizar los ritmos con ciclos de temperatura cálida/fría que varíen 4°C o menos (186,187), demostrando que la información sobre la temperatura ambiente actúa como un fuerte estímulo para el entrenamiento del reloj.

Las plantas de *Arabidopsis* exhiben un crecimiento y rendimiento óptimos a 22°C, mientras que las temperaturas inferiores a 16°C y superiores a 28°C son estresantes, causando una severa reducción en el crecimiento, distorsión de la morfología vegetal y producción de semillas reducida (188). Aunque el rango de temperatura de 16-28°C no resulta estresante para esta especie, puede inducir distintos ajustes termomorfogénicos (Fig. 15). Por ejemplo, en respuesta a temperaturas cálidas, las plantas muestran alargamiento del hipocótilo, extensión del pecíolo de la hoja, hiponastia foliar incrementada y formación de hojas pequeñas y delgadas. Se postula que estos rasgos ayudan a las plantas a mantener los tejidos meristémicos apicales de los brotes alejados de la superficie del suelo caliente y facilitar el enfriamiento por evaporación de las hojas (189).

Se conocen distintos conjuntos de genes y mecanismos de señalización que median las respuestas de las plantas al estrés por calor/frío y estímulos termomorfogénicos, varios de los cuales son regulados por el reloj circadiano. Tal es el caso de la expresión circadiana de fotorreceptores (64,190) y de algunos factores de transcripción involucrados en las vías de señalización asociadas a altas y bajas temperaturas (86,90,91,191,192). Este fenómeno, conocido como *gating* circadiano, mejora la supervivencia al estrés ambiental sincronizando las respuestas de crecimiento adaptativo con los ciclos día-noche de temperatura y condiciones de luz fluctuantes.

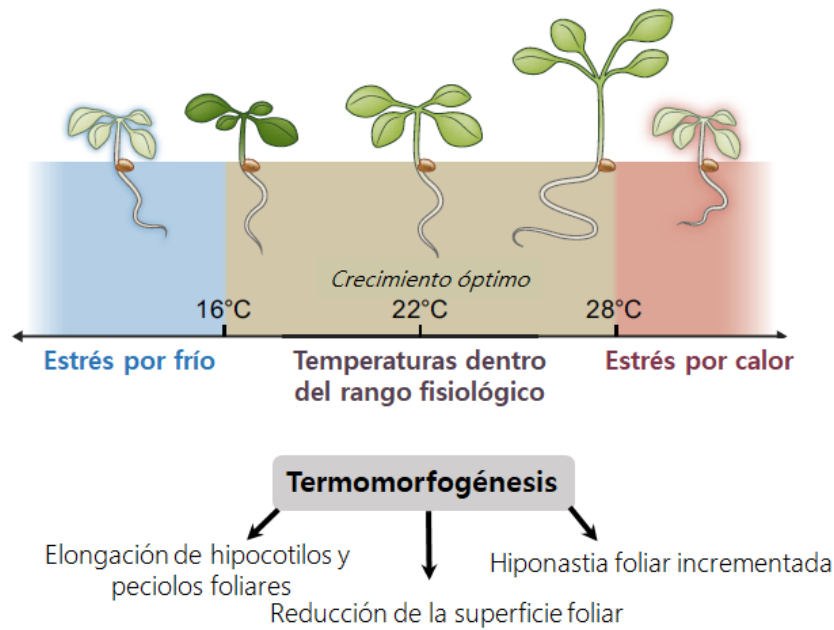


Fig. 15 Efectos de diferentes rangos de temperatura en el crecimiento y adaptación de las plantas. Mientras que *Arabidopsis* logra un crecimiento óptimo a 22°C, las temperaturas inferiores a 16°C o superiores a 28°C inducen respuestas de estrés, tales como reducción del crecimiento del tallo y las hojas, disminución en la biosíntesis de clorofila y menor producción de semillas. Dentro de un rango fisiológico de temperaturas ambiente altas (23-28°C), aunque el crecimiento general de la planta es normal y no muestra síntomas evidentes de estrés, *Arabidopsis* exhibe respuestas termomorfogénicas distintivas, tales como elongación del hipocotilo, extensión del peciolo de las hojas, aumento de la hiponastia foliar y hojas más pequeñas y delgadas. Cabe destacar que los ritmos circadianos se mantienen dentro de este rango de temperatura gracias al mecanismo de compensación térmica. Posiblemente, la hiponastia foliar mediada por la temperatura esté relacionada con el movimiento de hojas controlado por el reloj circadiano. Adaptado de Gil & Park, 2019 (188).

Existe una vasta evidencia que respalda que un grupo de componentes centrales del reloj, incluidos CCA1, LHY, GI, PRR7, PRR9 y el complejo EC, intervienen en el proceso de compensación de la temperatura (83,111,193). Cabe destacar que CCA1 y su ortólogo funcional LHY tienen roles diferenciales, funcionando el primero principalmente en un rango de bajas temperaturas, mientras que la función de LHY es más prominente en un rango de altas temperaturas ambientales. Notablemente, el gen *SICKLE (SIC)*, que regula la biogénesis de algunos microARN, degradación de intrones spliceados y respuesta a estrés (194), se requiere para producir las variantes de *splicing* de CCA1 y LHY en condiciones de baja temperatura ambiente (115). GI, en particular, es fundamental para el *buffering* mediado por CCA1/LHY de la ritmicidad circadiana robusta. Además, las mutantes *prp7* y *prp9* exhiben un fenotipo de sobrecompensación de temperatura, con un período alargado a 30°C y cercano al de WT a 12°C (193).

Los componentes activadores del oscilador central también poseen roles en las respuestas termomorfogénicas y el entrenamiento del reloj por ciclos de temperatura. Cuando los ciclos diarios están definidos por variaciones de temperatura sutiles, la doble mutante *Ink12* muestra defectos en la sincronización térmica, que solo son mitigados cuando se aumenta la diferencia entre las temperaturas máxima y mínima (195). Esto sugiere un rol para LNK1 y LNK2 en la integración adecuada de las señales térmicas ambientales, que se refuerza en la observación de su interacción con componentes de las vías de señalización de la temperatura, como COR27 y COR28 (195,196). Por otro lado, hallazgos recientes revelaron que dos miembros de la familia de genes *RVE*, con funciones menores en el reloj, están involucrados en la elongación del hipocotilo mediada por *ELF4* durante la termomorfogénesis. En respuesta a temperaturas cálidas, se induce la expresión del gen *RVE7*, el cual codifica una proteína que se une al EE en la región promotora de *ELF4*, reprimiendo su expresión. En consecuencia, los genes diana del EC, incluyendo al regulador positivo del crecimiento, *PIF4*, se ven liberados (197). Por el contrario, *RVE5*, regula positivamente la expresión de *ELF4* compitiendo por un elemento cis con el represor fuerte CCA1 bajo las mismas condiciones. Esto promueve la represión por parte del EC de sus genes target y, por ende, la inhibición de las respuestas de crecimiento mediadas por *PIF4* bajo condiciones cálidas (198). A pesar de estos hallazgos, todavía no hay una comprensión integrada de los mecanismos moleculares que proporcionan la compensación de la temperatura y el entrenamiento por temperatura al reloj circadiano.

Diversos estudios muestran que el SA de los transcritos del reloj circadiano constituye un mecanismo regulador importante para los ritmos circadianos en *Arabidopsis* (102,199). Mutantes de esta especie en cuatro genes diferentes asociados a la maquinaria de *splicing* exhiben un período circadiano alterado y SA de transcritos de genes centrales del reloj. Las mutantes *skip*, *stip1* y *prmt5* tienen un período alargado (97,98,101,114), mientras que *gemin2* tiene un período circadiano más corto (110). Las mutantes *skip* y *gemin2* también tienen alterado el mecanismo circadiano de compensación de la temperatura (110,114). Además, las cuatro mutantes exhiben un SA alterado de transcritos del oscilador central, lo cual afecta la abundancia de las variantes de *splicing* de esos genes (97,101,110,114). Todo esto indica que el reloj circadiano de *Arabidopsis* requiere una actividad eficiente del aparato de *splicing* y el SA de transcritos del reloj para mantener un periodo y compensación de la temperatura adecuados.

La temperatura ambiente a su vez influye en el SA de los transcritos del reloj circadiano de *Arabidopsis* (105,109). La abundancia de variantes de *splicing* de muchos genes del reloj, incluidos *CCA1*, *LHY*, *PRRs*, *TOC1*, *ELF3* y *RVEs* cambia en respuesta a señales de temperatura externas (107,108). Particularmente, se han reportado eventos de SA asociados a temperatura para el componente activador el reloj, RVE8, cuyos patrones de *splicing* han sido analizados dentro de un rango fisiológico de temperaturas. Utilizando RT-PCR, se detectaron diez eventos de SA al experimentar una caída en la temperatura, de 20°C a 4°C (108). La mayoría de estos transcritos con SA contienen un PTC en su secuencia, sin embargo, si los mismos son degradados por NMD o si producen un péptido truncado queda por aclarar. Previamente se ha reportado que RVE4 y RVE8 contribuyen a la inducción de la expresión génica por frío (91) y a las respuestas a las altas temperaturas, a través de las vías independientes de HSF (90), lo que demuestra que las proteínas RVE son fundamentales en la integración de las señales de temperatura a la función circadiana. Adicionalmente, las proteínas LNK, que actúan como co-activadores de las proteínas RVE para regular los ritmos a temperaturas normales, también cumplen este rol en las respuestas al estrés por frío y calor (30,95).

En base a estos hallazgos y con el fin de lograr una mejor comprensión sobre cómo la acumulación de variantes de *splicing* de los componentes del reloj circadiano afecta mecánicamente la función del mismo y sus respuestas a los cambios ambientales, se caracterizaron eventos de SA asociados a cambios en la luz y temperatura específicos de componentes centrales de las familias de genes *RVE* y *LNK* en *Arabidopsis*. Esto nos permitió indagar en la relevancia funcional de las isoformas de *splicing* generadas y su posible papel en la regulación de estas vías.

RESULTADOS

Identificación de eventos de *splicing* alternativo asociados a temperatura

Diversos estudios han revelado un extenso SA en genes de reloj circadiano y cambios dinámicos en los transcriptos alternativos producto de este proceso (105). Varios de estos cambios son dependientes de señales externas, como la luz y la temperatura, y contribuyen notablemente a la regulación de la expresión de los genes del reloj frente a transiciones o estreses ambientales, produciendo transcriptos que pueden tener distintos destinos (200). Dado que los factores de transcripción circadianos RVE4 y RVE8, en conjunto con la familia de los genes *LNK*, están involucrados en la regulación de las vías de estrés por calor y frío (90,91,93–95), decidimos enfocarnos en los genes *RVE8* y *LNK1*, en busca de eventos de SA que podrían generar variantes de ARNm de interés.

A partir de la secuenciación de RNA de plantas crecidas bajo un fotoperiodo de 12 h de luz/ 12 h de oscuridad a 22°C, y luego expuestas a 12°C, 17°C y 27°C (manteniendo un grupo control a 22°C), pudimos observar los patrones de expresión de cada gen en distintos momentos del día y bajo los distintos tratamientos. Se obtuvieron 12 muestras, correspondiendo el primer punto (ZT1) a una hora luego de iniciado el tratamiento térmico y encendido de las luces. A partir de allí se tomaron muestras cada 4 horas durante dos días (Fig. 16a). Se identificaron varios eventos de SA regulados por la temperatura para el gen *RVE8*, como la retención de los intrones 1, 4, 7 y 8, y un evento de ss 3' alternativo del intrón 7 (Figura Suplementaria S4), los cuales fueron previamente anotados. La información sobre las variantes se encuentra disponible en la base de datos Araport11 (*The Arabidopsis Information Portal*, versión 11). Nos centramos particularmente en el ss 3'alt del intrón 7, el cual adiciona 22 nucleótidos al extremo 5' del exón lindante e introduce un PTC que altera el marco de lectura y la longitud de transcripto (Fig. 16b). Como resultado, se traduce una proteína truncada de menor tamaño en comparación con su versión canónica, cuya función se desconoce.

Al observar la información de las juntas para esta región específica, detectamos una mayor diferencia entre las condiciones experimentales ("Porcentaje de Inclusión" [PSI]>10%) en el punto 6, es decir, a 21 horas de iniciado el tratamiento térmico (ZT21). A 12°C se vió un aumento del uso del 3'alt ss (PSI=55%), en comparación con el control a 22°C, dando lugar a una mayor cantidad de transcriptos de la isoforma alternativa.

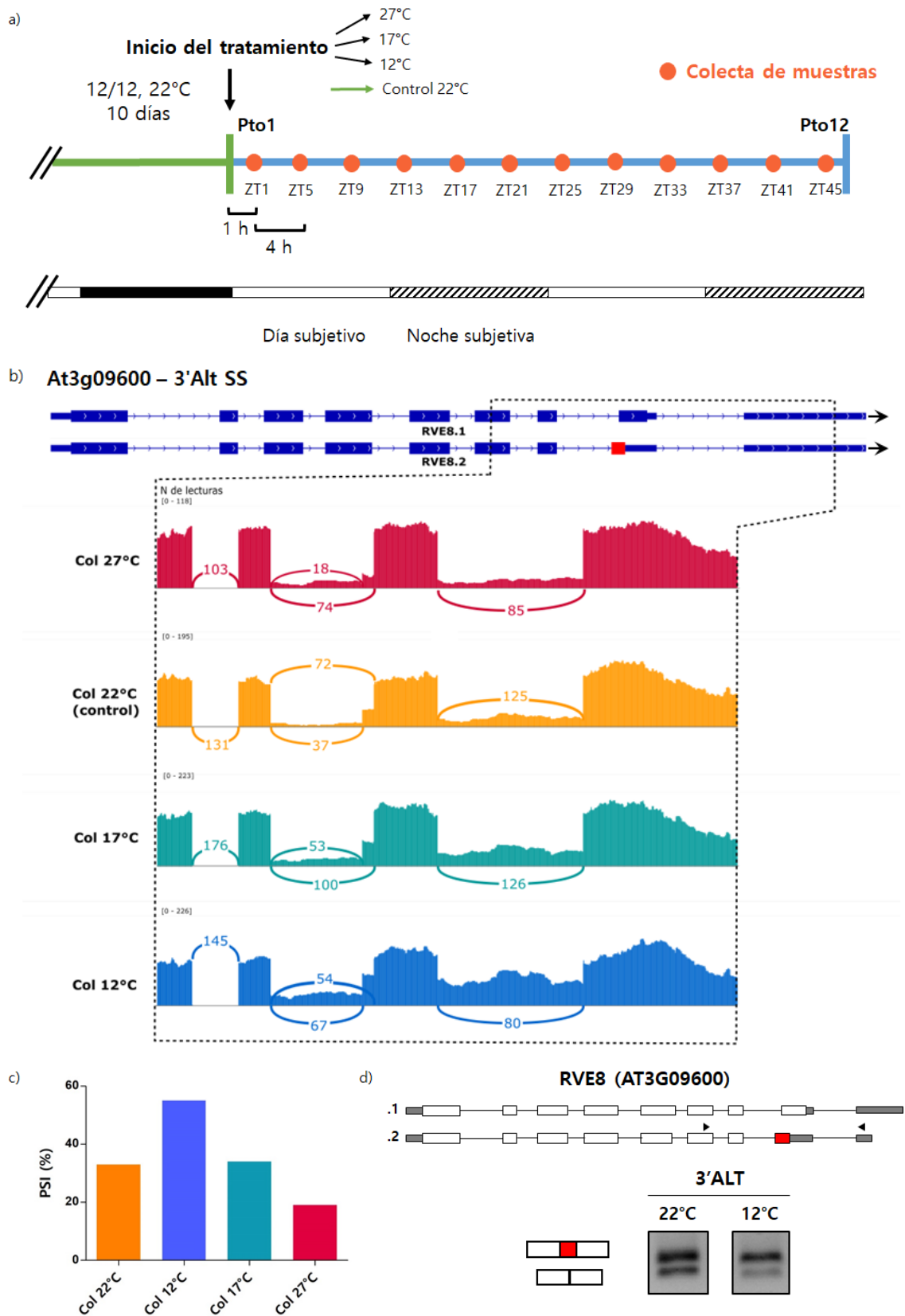


Fig. 16 Resultados de RNA-seq que muestran cambios en el SA de RVE8 frente a distintas temperaturas. a) Esquema del diseño experimental. Luego de 10 días de crecimiento bajo ciclos de 12 h luz/12 h de oscuridad a 22°C, un grupo de plantas fue expuesto a 27°C, a 17°C, a 12°C y un grupo control permaneció a 22°C. La cosecha se realizó en 12 puntos, siendo la primera colecta a una hora del inicio de la inducción (ZT1) y las restantes cada 4 horas. b) Sashimi

plots donde se destacan el número de lecturas y la información de las juntas para el evento ss 3'alt del intrón 7 a 27°C (rojo), 22°C (amarillo), 17°C (verde) y 12°C (azul). Los modelos de las isoformas asociadas al evento se encuentran representados. c) Gráfico que representa la media del "porcentaje de inclusión" o PSI en las distintas condiciones experimentales, y d) validación del evento 3'alt ss del intrón 7 mediante electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR. La región alternativa se resalta en rojo. Se muestran los modelos génicos de las isoformas para este evento. Las cajas representan exones, las líneas representan intrones y las flechas representan las posiciones de los cebadores utilizados para la validación.

A 27°C, en cambio, observamos una disminución del PSI (19%) en comparación con el control a 22°C, determinando un menor uso del 3'alt ss y mayor cantidad de la isoforma canónica en proporción. A 17°C no se presentaron diferencias con respecto al control (Fig. 16c).

Al analizar el gen *LNK1*, un interactor de RVE8 con función clave en el reloj, detectamos que, si bien no muestra intrones retenidos, se saltea un exón en la región 5' del gen (E2). A las 5 horas de iniciado el tratamiento térmico (ZT5), el E2 muestra una mayor inclusión en el transcripto a 27°C (PSI=62%), mientras que a temperaturas más bajas (17°C y 12°C) hay una mayor exclusión en relación al control a 22°C (PSI=29%; PSI=21%, respectivamente) (Fig. 17). Este exón abarca parte de la región 5' no codificante (UTR, *untranslated region*) y el inicio de la región codificante del gen. Aunque la exclusión del mismo introduce un codón de inicio alternativo, las consecuencias que esto implica en la nueva variante proteica se desconocen.

Como fue previamente reportado para genes del reloj de *Arabidopsis* bajo el efecto de transiciones de temperatura o aclimatación (107,111), nuestras observaciones indican que la temperatura actúa modulando el SA de *RVE8* y *LNK1*, con una tendencia opuesta en los efectos entre las altas temperaturas y las bajas.

Con este panorama en mente, decidimos profundizar en la caracterización de estos eventos para intentar esclarecer cómo la modulación de los niveles de transcriptos en cuestión encaja con el actual modelo de reloj, y eventualmente, establecer un rol para los mismos en la regulación circadiana y/o la respuesta a la temperatura.

Validación de eventos SA asociados a cambios ambientales

Con el fin de corroborar los cambios en los patrones de las isoformas de *splicing* alternativo observados en los resultados de RNA-seq frente al tratamiento a bajas temperaturas, se realizó RT-PCR semi cuantitativa para los eventos señalados de SA de los genes del reloj *RVE8* y *LNK1*. Plántulas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia

fueron crecidas bajo ciclos de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad a 22°C por 10 días. En el día 11, la mitad de las plántulas fueron expuestas a 12°C por 24 horas. La cosecha de las muestras se realizó en el momento del día en que se reporta el pico de expresión de los genes analizados (135). Tanto para *RVE8*, como para *LNK1*, este corresponde a la media mañana (ZT3-ZT6). Se procedió a la extracción del ARN total de las muestras y posterior retro-transcripción para obtener el ADN complementario (ADNc).

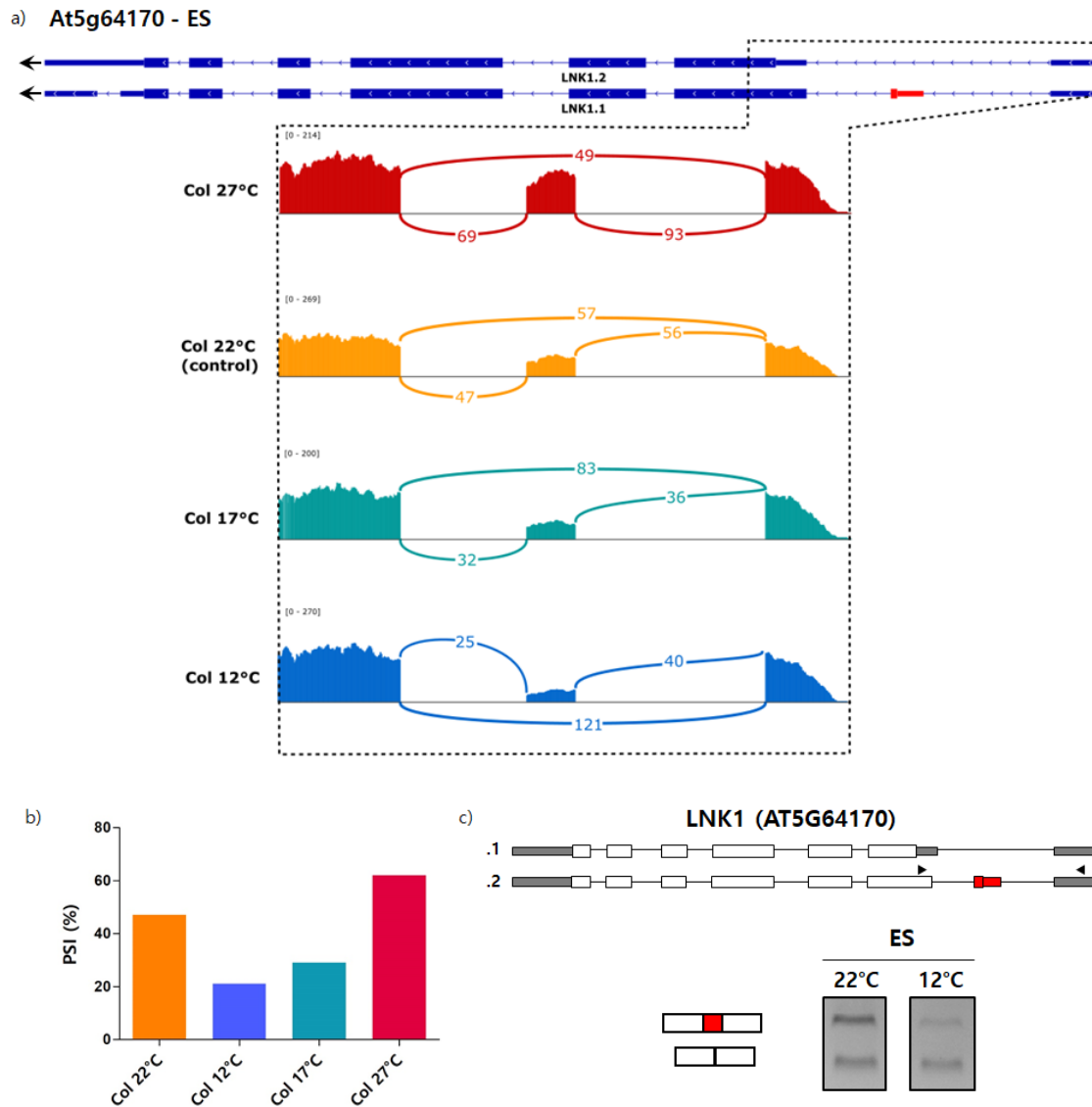


Fig. 17 Resultados de RNA-seq que muestran cambios en el SA de *LNK1* a nivel de exón frente a distintas temperaturas. a) Sashimi plots donde se destacan el número de lecturas o *reads* y la información de las juntas para el evento ES del exón 2 a 27°C (rojo), 22°C (amarillo), 17°C (verde) y 12°C (azul). Los modelos de las isoformas asociadas al evento se encuentran representados. b) Gráfico con los valores de la media del “porcentaje de inclusión” o PSI en las distintas condiciones experimentales. c) Modelos génicos de las isoformas anotadas para *LNK1*. Las cajas representan exones, las líneas representan intrones y las flechas representan las posiciones de los cebadores utilizados para la validación. Se muestra la validación del evento ES en el exón 2 mediante electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR. La región alternativa se resalta en rojo.

Utilizando primers específicos que flanquean los eventos de SA de ambos genes, se amplificaron las isoformas correspondientes y se observaron los cambios frente a los distintos tratamientos. Para el evento 3'alt del I7 de *RVE8*, se observó un aumento del transcripto alternativo en el tratamiento a bajas temperaturas, mientras que los transcriptos de la isoforma canónica se ven proporcionalmente reducidos en comparación con su abundancia relativa a 22°C (Fig. 16d). De forma similar, para el evento ES de *LNK1*, la variante alternativa sin el E2 mantiene su expresión frente a la exposición a bajas temperaturas, mientras que la isoforma *full spliced* se ve reducida (Fig. 17c). Por lo tanto, a 12°C aumentaría la frecuencia del evento SA en ambos casos. En conjunto, estos resultados son consistentes con lo observado en las lecturas de la secuenciación del transcriptoma.

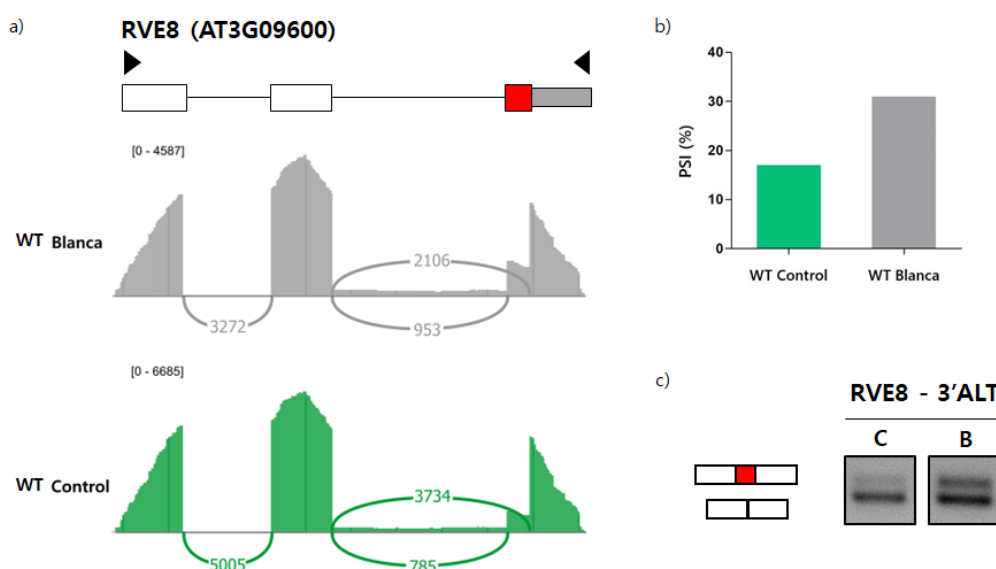


Fig. 18 Efectos de la luz en el evento 3'alt ss de *RVE8*. a) Sashimi plots donde se destacan el número de lecturas y la información de las juntas para el evento 3'alt ss del intrón 7, frente a un pulso de luz blanca o en oscuridad. Se indica el modelo génico de la isoforma alternativa. Las cajas representan exones, las líneas representan intrones y las flechas representan las posiciones de los cebadores utilizados para la validación. b) Gráfico que representa la media del "porcentaje de inclusión" o PSI en las distintas condiciones experimentales. c) Validación del evento ES en el exón 2 por RT-PCR. La región alternativa se resalta en rojo.

Previamente identificamos que *RVE8* y *LNK1* forman parte de un subconjunto de genes cuyo *splicing* se encuentra regulado por luz R, de forma independiente de los fitocromos (174). Para comprobar estos cambios en los patrones de *splicing* del intrón 7 de *RVE8* en respuesta al estímulo lumínico, realizamos un análisis de *amplicon sequencing*. Crecimos plantas de *Arabidopsis* de ecotipo Columbia en un fotoperiodo de 12 h de luz/12 h de oscuridad por 10 días. Luego, la mitad de las plántulas fueron expuestas a un pulso de 2

horas de luz blanca en la mitad de la noche (ZT18) y el resto permanecieron en la oscuridad. Ambos grupos fueron cosechados en el ZT20. Se obtuvo el RNA de 3 réplicas biológicas independientes por condición y se realizó RT-PCR con primers que flanquean el evento 3'alt ss para amplificar, y posteriormente secuenciar, esa región específica. Mapeamos las lecturas resultantes en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (TAIR 10) y evaluamos los cambios en el SA para ese evento. En concordancia con estudios anteriores (52,171), confirmamos que la luz blanca, al igual que el tratamiento con luz R y los cambios en la temperatura, induce cambios rápidos en el SA de factores de transcripción circadianos como RVE8 en plantas adultas crecidas bajo ciclos de luz/oscuridad. La exposición a la luz durante la noche, simulando un alargamiento del fotoperiodo, afecta el uso del 3'alt ss del I7 generando una mayor abundancia de la isoforma alternativa en estas condiciones (PSI=31%) (Fig. 18).

Análisis de las isoformas de SA de RVE8

Con el fin de investigar la implicación funcional de las isoformas producidas por *splicing* alternativo del gen *RVE8* dentro del reloj circadiano de *Arabidopsis*, generamos plantas transgénicas expresando la región codificante de la versión canónica (FL, *full length*) y la versión alternativa (AS, *alternatively spliced*) de RVE8 fusionada con la proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*), bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y de su propio promotor (Fig. 19a, b). Las distintas isoformas de RVE8-GFP se transformaron en el fondo mutante *rve4-1 rve6-1 rve8-1 CCR2::LUC (rve468)*. De esta manera, eliminamos otros componentes de la familia con funciones parcialmente redundantes para un mejor análisis funcional de las versiones de nuestras proteínas de interés. Una vez que obtuvimos líneas homocigotas independientes (T3) de inserción única, se procedió a verificar los niveles de transcripto de las variantes génicas y la abundancia de las proteínas (Fig.19c-f). Para ello, las líneas generadas se cultivaron bajo ciclos de 16 h luz/ 8 h oscuridad (LD) por 10 días y luego se cosecharon en el momento del pico de expresión de *RVE8* (ZT5). Mediante el análisis de RT-qPCR, observamos que las líneas sobreexpresantes B3, B6 y B12 de la isoforma RVE8-FL, y A12, A15 y A17, de la isoforma RVE8-AS, mostraron una expresión del transgen alta e intermedia respecto a WT, y se seleccionaron para una caracterización adicional (Fig.19c; Figura suplementaria S5). En cuanto a las líneas de expresión endógena, se detectaron niveles de transcriptos similares a WT para las líneas B'5 de la isoforma RVE8-FL, y A'5 de

la isoforma RVE8-AS (Fig.19d). El análisis de inmunotransferencia o Western Blot (WB) indicó una acumulación de proteínas congruente con los niveles de transcritos observados (Fig. 19e, f).

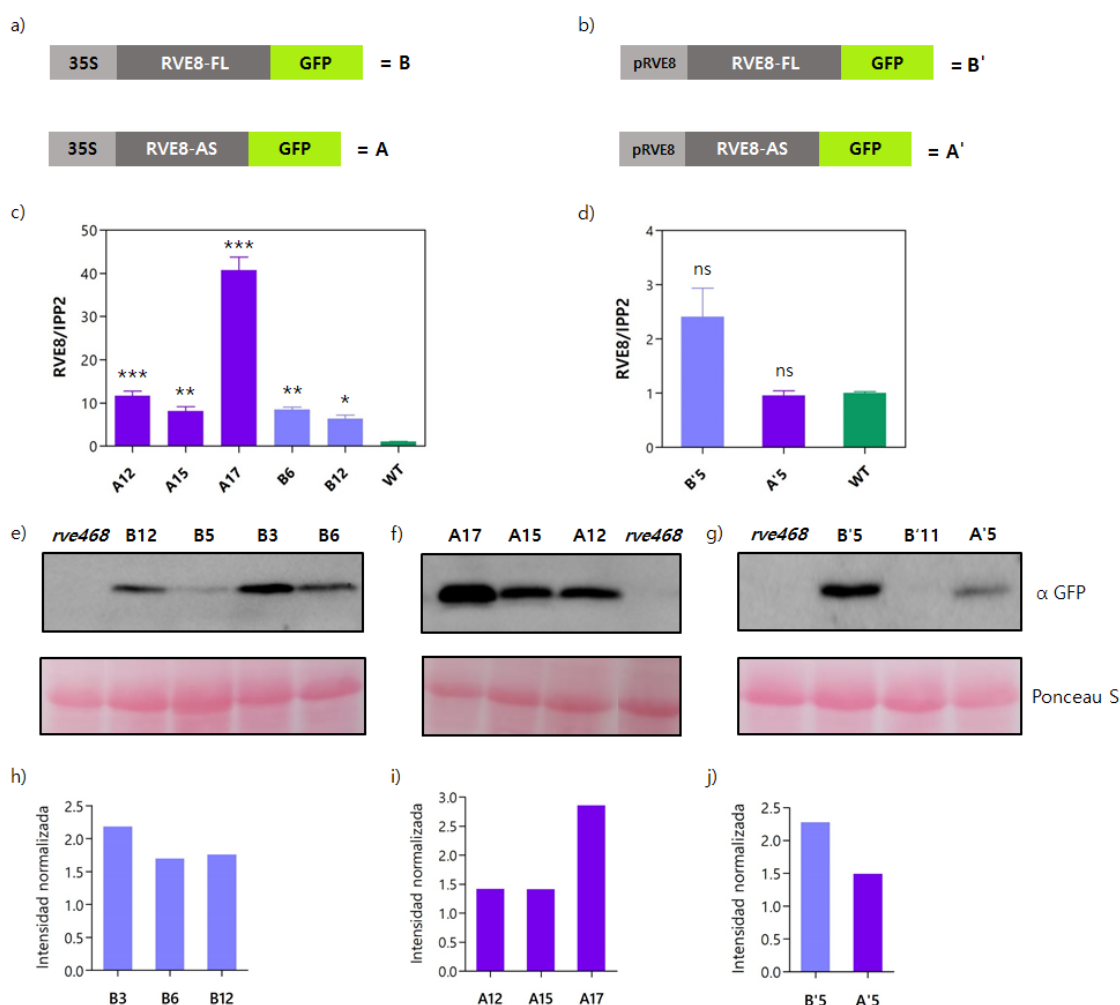


Fig. 19 Medición de los niveles de expresión de transcritos y acumulación de isoformas proteicas de RVE8 en las líneas transgénicas generadas. Diagrama esquemático de las construcciones de la versión *full length* de RVE8 (RVE8-FL) y una versión truncada o *alternatively spliced* (RVE8-AS) fusionadas con GFP, a) bajo el control de un promotor constitutivo 35S (CaMV) o b) del promotor endógeno. Se indica la nomenclatura de las líneas empleadas para su posterior identificación. c) Expresión relativa medida por RT-qPCR (n=3 réplicas técnicas) de RVE8-FS (B6, B12) y RVE8-AS (A12, A15, A17) en líneas sobreexpresantes, y d) RVE8-FS (B'5) y RVE8-AS (A'5) en líneas bajo control del promotor endógeno. Para el análisis, plantas WT y líneas transgénicas fueron crecidas bajo condiciones de día largo (16:8) por 10 días a 22°C y cosechadas 5 horas después del amanecer (ZT5). Se realizó ANOVA de un factor seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni entre las líneas transgénicas y WT (*: significativamente diferente, $p \leq 0,05$; **: significativamente diferente, $p \leq 0,01$; ***: significativamente diferente, $p \leq 0,001$; ns: no significativo). e-g) Western blot donde se observa la acumulación de la proteína RVE8-FL (B3, B6, B12) (e) y RVE8-AS (A12, A15, A17) (f) en líneas transgénicas sobreexpresantes o RVE8-FL (B'5) y RVE8-AS (A'5) en líneas transgénicas endógenas (g), crecidas bajo condiciones de día largo (16:8) por 10 días a 22°C y cosechadas 5 horas después del amanecer (ZT5). Las isoformas se detectaron con anticuerpo α GFP. La tinción de Ponceau S se muestra como control de carga. La mutante *rve468* se uso como control negativo. h-j) Cuantificación de la acumulación de proteínas RVE8-FL (h) y RVE8-AS (i) en líneas transgénicas sobreexpresantes y en líneas transgénicas endógenas (j). Se midió la densidad

integrada de las bandas utilizando el software Fiji y se normalizó respecto a la carga total de proteína (Ponceau S). Los valores son expresados en unidades arbitrarias (a.u.).

Para evaluar la expresión y la localización subcelular de RVE8-FL/AS:GFP en las líneas sobreexpresantes seleccionadas, observamos la fluorescencia de GFP en distintos órganos. Las plántulas se mantuvieron en condiciones de LD (16:8) por 4 días a 22°C previo a su visualización. Tanto en las líneas sobreexpresando RVE8-FL:GFP (B3, B6), como RVE8-AS:GFP (A12, A17) se detecta señal preferentemente en el núcleo, con una distribución algo difusa en el citoplasma (Figuras suplementarias S6 y S7).

Adicionalmente, se generaron constructos con las distintas versiones de SA de LNK1, fusionadas al epítipo de hemaglutinina YPYDVPDYA (tag HA), bajo el control de su propio promotor. Las distintas isoformas de LNK1-HA fueron introducidas en la cuádruple mutante *InkQ* en *Arabidopsis* para la obtención de líneas transgénicas. Se corroboró la presencia de las proteínas en las líneas homocigotas seleccionadas (Figura suplementaria S8). Sin embargo, por cuestiones de tiempo y volumen de trabajo, nos centramos en la caracterización funcional de las líneas correspondientes a un solo gen (*RVE8*) y las variantes de ADNc de *LNK1* se utilizarán sólo para evaluar interacción proteica.

Caracterización fisiológica de líneas sobreexpresantes de RVE8-FL y RVE8-AS

Con el objetivo de mejorar la comprensión sobre el rol del *splicing* alternativo como mecanismo de sincronización e integración de señales ambientales al reloj circadiano, se realizó una caracterización fisiológica de las líneas transgénicas sobreexpresantes de las isoformas SA del gen del reloj *RVE8*. Se optó por trabajar con las líneas seleccionadas de expresión constitutiva para facilitar la identificación de posibles roles funcionales, y observar como esto afecta los fenotipos relacionados. Estas líneas fueron generadas sobre un *background* mutante *rve468*, con lo cual, aunque se rescata RVE8, aún faltan otros dos componentes de la familia con funciones redundantes, RVE4 y RVE6, lo que podría dificultar observar un efecto claro del rescate al expresarse *RVE8* bajo su promotor endógeno. Por último, la sobreexpresión permite mantener niveles de expresión de la isoforma de interés más estables, eliminando la variabilidad asociada a la actividad del promotor nativo durante el día. Este enfoque facilitaría la exploración del posible rol de la isoforma alternativa en la regulación de los niveles de *RVE8* y/o integración de señales lumínicas y/o térmicas al reloj, evaluando el grado de rescate del fenotipo mutante en distintos procesos controlados por el reloj bajo condiciones ambientales variables.

Anteriormente se describieron varios fenotipos regulados por el reloj y por luz para la triple mutante *rve468* (32, 201). Para examinar si el periodo circadiano alargado de la triple mutante *rve* se restaura con la introducción de las isoformas de RVE8 en condiciones normales de crecimiento, monitoreamos los ritmos circadianos del movimiento de las hojas en plantas WT, mutantes *rve468*, y líneas con la versión canónica (B3; B6; B12) y con la versión alternativa (A12; A15; A17) de RVE8. Ambas líneas, RVE8-FL y RVE8-AS, restauraron de manera parcial pero no completa el periodo circadiano a niveles WT (Fig. 20a). Sin embargo, el período levemente alargado es consistente con la ausencia de RVE4 y RVE6, que poseen funciones redundantes en el control del ritmo del reloj. No se observaron diferencias entre el periodo exhibido por las líneas RVE8-FL y las líneas RVE8-AS. B3 y A17 presentaron periodos muy similares a WT (24.5 y 24.6 h vs. 24.4 h, respectivamente), mientras que B6 y A15 mostraron un mayor retraso con periodos de 25.3 y 25.9 h (Fig. 20a, b), aunque estadísticamente no significativo. Estos resultados sugieren que ambas isoformas proteicas se comportan de manera similar a las proteínas nativas y son funcionales dentro del sistema circadiano.

En ensayos previos donde caracterizamos la triple mutante *rve468* junto con mutantes de la familia *LNK*, se evidenció un rol menor de los genes *RVE* sobre el control del tiempo floración bajo la condición de día largo (16:8) y ninguno bajo SD (8:16) o LL (Figura suplementaria S9). Decidimos entonces explorar como se ve afectado el control de la transición del crecimiento vegetativo a la fase reproductiva en las líneas transgénicas RVE8-FL/AS bajo ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad, junto con mutantes *rve468* y WT. De esta forma, pudimos evaluar en qué medida el retraso en la floración descrito en la triple mutante *rve* bajo condiciones de LD se presenta en este fotoperiodo, y, si alguna de nuestras versiones transgénicas rescata ese rasgo fenotípico. Todas las líneas mostraron un número de hojas similar al de WT al momento de la floración y diferencias significativas respecto a la mutante *rve468* (Fig. 20c). No se observaron diferencias entre las líneas con la versión canónica y alternativa de RVE8. Colectivamente, estos resultados sugieren que en condiciones de 12 h luz/12 h oscuridad, ambas isoformas de RVE8 restauran parcialmente el fenotipo de retraso en la floración observado.

Otro rasgo controlado por luz que se ve afectado en la triple mutante *rve468* corresponde a los patrones de crecimiento de los hipocotilos en estadio de plántula (32) (Figura suplementaria S10). Para determinar si las líneas complementadas con las isoformas RVE8-FL/AS restauran el fenotipo WT en algún grado o si existe alguna diferencia entre ellas en

la regulación de este proceso, evaluamos la longitud de los hipocotilos en condiciones de luz blanca continua (LL). De manera global, las líneas transgénicas con ambas versiones de la proteína mostraron hipocotilos más cortos que la triple mutante *rve468* (Fig. 20d). Sin embargo, aquellas que expresan la isoforma alternativa exhibieron un menor grado de reversión del fenotipo de hipocotilos. Se detectaron longitudes de hipocotilos iguales o incluso menores que WT en las líneas sobreexpresantes de RVE8-FL, particularmente B12, lo cual se reflejó en diferencias significativas con respecto a las líneas RVE8-AS en todos los casos (Fig. 20d; Tabla suplementaria S2a). Estos resultados indicarían un rol más activo de la isoforma canónica en la inhibición de la elongación de los hipocotilos e incluso un efecto de la sobreexpresión de RVE8-FL.

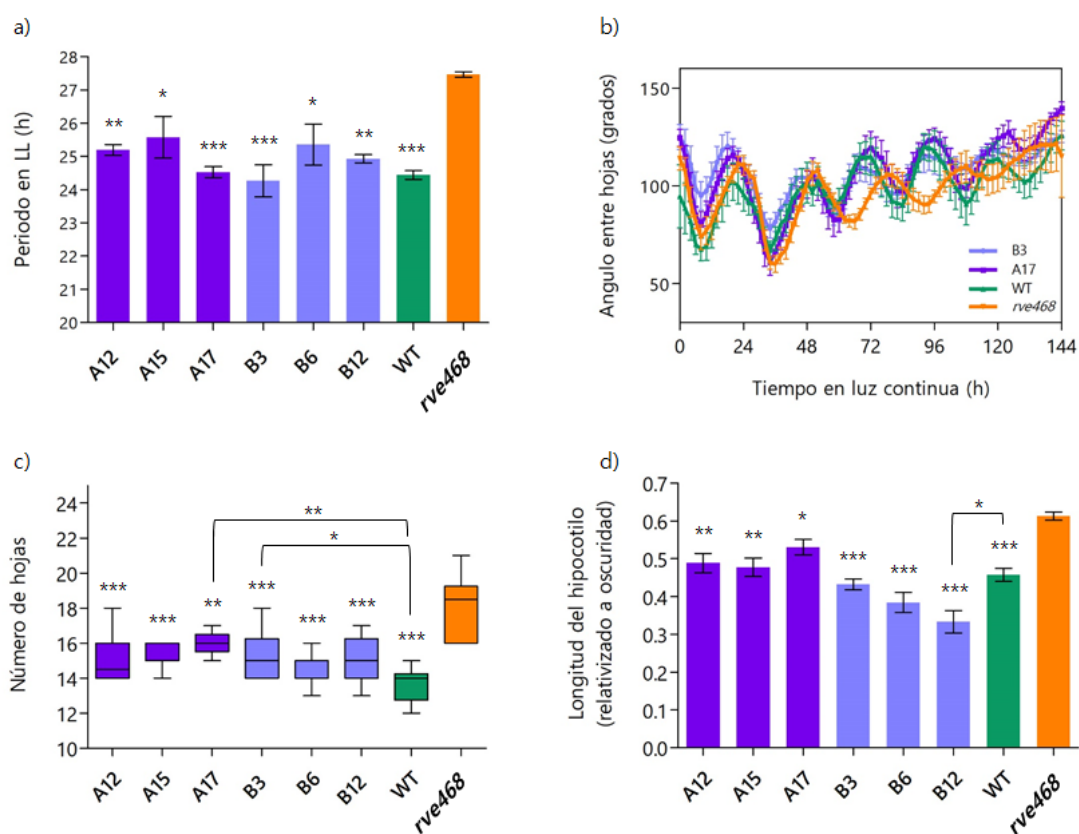


Fig. 20 Caracterización fisiológica de líneas transgénicas sobreexpresantes de las isoformas RVE8-FL y AS. a, b) Ritmos circadianos del movimiento de hojas en luz blanca continua (LL), luego de un entrenamiento en condiciones de día largo (LD). Se midió el ángulo entre el primer par de hojas verdaderas (b) en plántulas sobreexpresantes de RVE8-FL (B3, B6, B12) y RVE8-AS (A12, A15, A17), WT y mutantes *rve468* de 10 días por un periodo de tiempo definido (n=5). a) El período asociado a los ritmos circadianos fue estimado por FFT-NLLS con el software BioDare2. b) Tiempo de floración, medido como el número de hojas en la roseta al momento de la floración en condiciones de 12 h de luz/12 h de oscuridad (12:12) (n=10). Las líneas horizontales dentro de los diagramas de caja representan las medianas; las barras y los valores atípicos se calcularon con el método de Tukey. d) Longitud de hipocotilos de plántulas crecidas en luz blanca constante (LL) a una intensidad de 1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ (n=6 réplicas de 10 plántulas cada una). Los resultados se expresan relativizados al largo de cada genotipo en oscuridad (control). Se realizó ANOVA de un factor seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se muestran las diferencias entre las líneas

transgénicas y los controles *rve468* y WT (*: significativamente diferente, $p \leq 0,05$; **: significativamente diferente, $p \leq 0,01$; ***: significativamente diferente, $p \leq 0,001$; ns: no significativo). Las comparaciones por pares entre líneas RVE8-FL/AS se encuentran disponibles en la Tabla suplementaria S2a. Las barras de error indican el SEM. Los datos son ilustrativos de al menos dos experimentos independientes.

A partir del comportamiento diferencial observado entre las líneas sobreexpresando las isoformas de RVE8 en el crecimiento de hipocotilos bajo condiciones de luz constante, decidimos examinar el efecto de distintos tratamientos lumínicos sobre este proceso. Para ello, medimos los hipocotilos de plántulas de las líneas RVE8-FL/AS, WT y *rve468* crecidos bajo fotoperiodos específicos. En condiciones de día largo (16:8), similar a lo observado en LL, todas las líneas transgénicas revirtieron el fenotipo mutante. No obstante, aquellas con la isoforma canónica mostraron un acortamiento de los hipocotilos aún mayor con respecto a WT, destacándose las líneas B6 y B12 (Fig. 21a, Tabla suplementaria S2b). Por otro lado, en las mediciones realizadas en día corto (8:16), no se detectaron diferencias significativas entre las líneas con la isoforma alternativa y la triple mutante *rve*, a excepción de A17, que mostró una diferencia menor (Fig. 21b). En conjunto, estos resultados confirman la predominancia de la isoforma canónica sobre el control del crecimiento del tallo embrionario mediado por luz, revelando un fenotipo de sobreexpresión en todas las condiciones analizadas. La isoforma alternativa, en cambio, muestra un efecto menor sobre estas vías, y de una forma que depende del fotoperiodo.

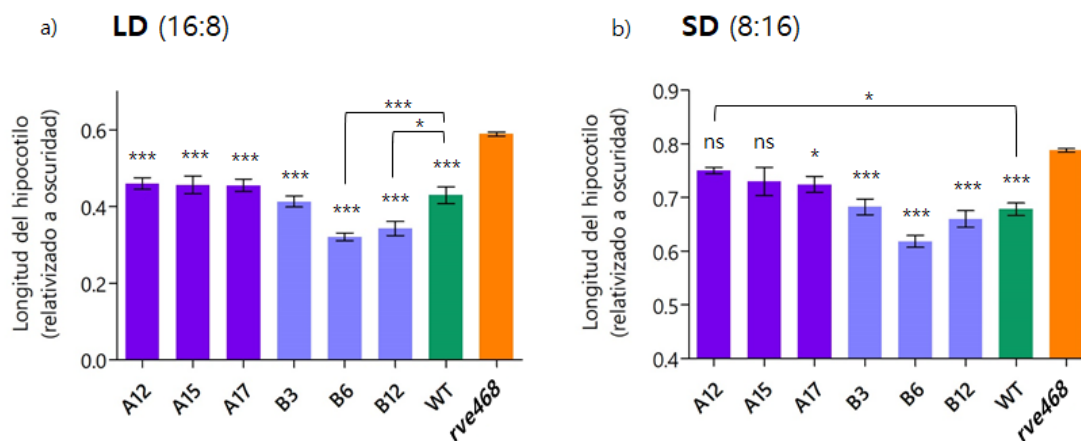


Fig. 21 Inhibición de la elongación de hipocotilos en líneas transgénicas sobreexpresantes de las isoformas RVE8-FL y AS bajo diferentes fotoperiodos. Longitud de hipocotilos relativizada al control en oscuridad de plántulas sobreexpresantes de RVE8-FL (B3, B6, B12) y RVE8-AS (A12, A15, A17), plantas WT y mutantes *rve468* crecidas en fotoperiodos de (a) día largo (LD, 16h de luz/8h de oscuridad) o (b) día corto (SD, 8h de luz/16h de oscuridad) a una intensidad de $1 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ ($n=6$ réplicas de 10 plántulas cada una). Se realizó ANOVA de un factor seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se muestran las diferencias entre las líneas transgénicas y los controles *rve468* y WT (*: significativamente diferente, $p \leq 0,05$; **: significativamente diferente, $p \leq 0,01$; ***: significativamente diferente, $p \leq 0,001$; ns: no significativo). Las comparaciones por pares entre líneas RVE8-FL/AS se encuentran

disponibles en las Tablas suplementarias S2. Las barras de error indican el SEM. Los datos son ilustrativos de al menos dos experimentos independientes.

A continuación, analizamos la influencia de distintas temperaturas ambientales sobre la elongación de los hipocotilos en nuestras líneas transgénicas, bajo un régimen de luz específico (LD), en el cual previamente validamos la funcionalidad de ambas isoformas. Crecimos plántulas de las líneas transgénicas RVE8-FL/AS, WT y *rve468* a 16°C y 28°C, en condiciones de día largo y a las intensidades de luz blanca indicadas (Fig. 22). Las temperaturas empleadas se encuentran dentro del rango fisiológico que *Arabidopsis* puede experimentar a lo largo del día, y aunque no son estresantes, desencadenan respuestas termomorfogénicas y la compensación de la temperatura mediada por componentes del reloj.

A 16°C, la tendencia observada en la triple mutante *rve468* a 22°C se invierte, mostrando longitudes de hipocotilos menores que WT (Fig. 22a, b). Esta diferencia, sin embargo, solo es estadísticamente significativa a bajas intensidades de luz (1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$). En estas condiciones, las líneas con la variante canónica, B6 y B12, muestran una reducción significativa en el crecimiento respecto a los controles. El resto de las líneas exhibe longitudes similares a *rve468* (Fig. 22a). Frente a un incremento en la intensidad de luz (10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$), se detectó una mayor inhibición de la elongación de los hipocotilos en todas las líneas transgénicas, particularmente aquellas sobreexpresando RVE8-FL (Fig. 22b). Según estos resultados, no se evidencia un rescate del fenotipo WT por parte de las líneas complementadas con RVE8-FL/AS a 16°C. Sin embargo, el acortamiento de los hipocotilos, con una tendencia opuesta a WT e incluso a la mutante *rve*, sugiere un efecto de la sobreexpresión de las isoformas, que se acentúa en el caso de RVE8-FL y depende de la intensidad lumínica.

A 28°C e intensidades bajas de luz, la longitud de los hipocotilos de todos los genotipos testeados fue mayor que en condiciones normales de temperatura, con diferencias fenotípicas menos claras (Figura suplementaria S11). Las líneas RVE8-FL/AS no mostraron longitudes significativamente diferentes a los controles. No obstante, aquellas sobreexpresando la isoforma canónica, exhibieron valores más cercanos a WT, siendo B12 la única línea con hipocotilos notablemente más cortos que los de RVE8-AS y la triple mutante *rve* (Fig. 22c, Tabla suplementaria S3a). Las líneas RVE8-AS, por otro lado, mostraron una tendencia análoga a *rve468*, con hipocotilos de igual o incluso mayor longitud. Como se esperaría, a mayor intensidad de luz (10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$), aumenta la

inhibición de la elongación de los hipocotilos y se pueden observar diferencias significativas tanto entre líneas RVE8-FL/AS, como entre estas y *rve468* (Tabla suplementaria S3b). Las líneas B6 y B12, además, exhiben un fenotipo de sobreexpresión con hipocotilos más cortos que WT (Fig. 22d). Similar a lo observado a 22°C, se evidencia un efecto diferencial de las isoformas proteicas sobre los patrones de crecimiento de los hipocotilos a temperaturas ambiente altas, que es más claro a intensidades lumínicas moderadas.

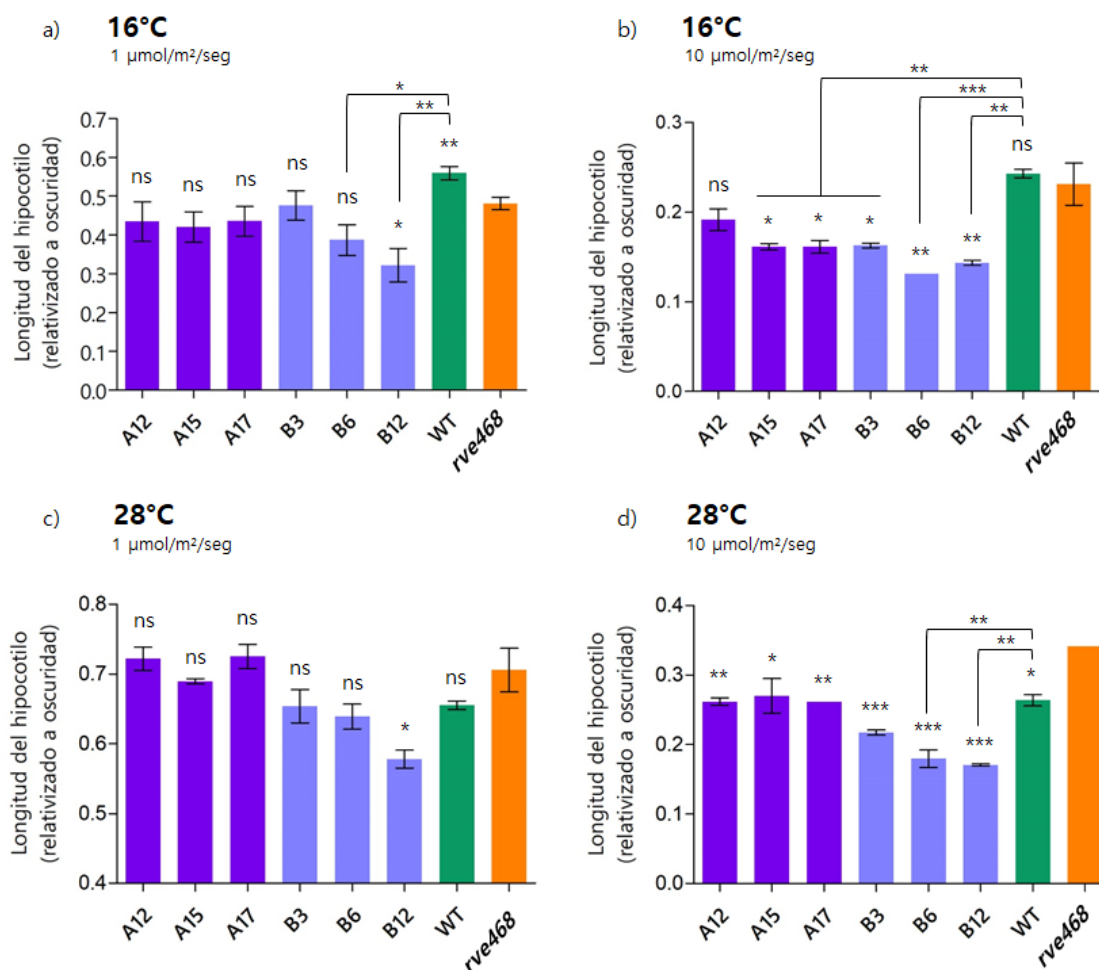


Fig. 22 Inhibición de la elongación de hipocotilos de líneas transgénicas sobreexpresantes de las isoformas RVE8-FL y AS a distintas temperaturas. a-d) Longitud de hipocotilos relativizada al control en oscuridad de plántulas sobreexpresantes de RVE8-FL (B3, B6, B12) y RVE8-AS (A12, A15, A17), plantas WT y mutantes *rve468* crecidas en fotoperiodo de día largo (LD, 16h de luz/8h de oscuridad) a 16°C (a, b) y 28°C (c, d) bajo las intensidades de luz indicadas (n=6 réplicas de 10 plántulas cada una). Se realizó ANOVA de un factor seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Se muestran las diferencias entre las líneas transgénicas y los controles *rve468* y WT (*: significativamente diferente, $p \leq 0,05$; **: significativamente diferente, $p \leq 0,01$; ***: significativamente diferente, $p \leq 0,001$; ns: no significativo). Las comparaciones por pares entre líneas RVE8-FL/AS se encuentran disponibles en las Tablas suplementarias S3. Las barras de error indican el SEM. Los datos son ilustrativos de al menos dos experimentos independientes.

En conclusión, a 22°C y 28°C los patrones de crecimiento de los hipocotilos entre las líneas son similares, con un rescate parcial del fenotipo WT por parte de la isoforma RVE8-AS y una regulación más fina de la isoforma canónica RVE8-FL que afecta negativamente el crecimiento dando como resultado hipocotilos más cortos que WT. A 16°C, en cambio, se alteran los patrones de los controles de referencia, con lo cual no se observa un rescate del fenotipo WT en las líneas RVE8-FL/AS, pero sí una reducción significativa de la elongación de los hipocotilos en ambos casos, que da cuenta de un efecto dominante negativo derivado probablemente de la sobreexpresión en combinación con las bajas temperaturas (Figura suplementaria S11).

Adicionalmente, se evaluó la función del reloj a 16°C por medio de un análisis de movimiento de hojas. Plantas WT, mutantes *rve468*, y líneas con la versión canónica (B3; B6; B12) y con la versión alternativa (A12; A15; A17) de RVE8 fueron expuestas a 16°C y fotografiadas en intervalos regulares de tiempo durante una semana. Las plántulas exhibieron un movimiento de hojas reducido debido a la exposición al frío, con lo cual, las oscilaciones fueron menos marcadas y la amplitud de las mismas menor que en condiciones normales (Figura suplementaria S12b).

Todos los genotipos observados mostraron un periodo circadiano alargado en comparación con las mediciones realizadas a 22°C. WT exhibió un retraso de 2 h, con un periodo de 26.5 h a 16°C (vs. 24.4 en condiciones normales), y la mutante *rve468*, presentó un periodo 3 h más largo (30.2 h en condiciones de bajas temperaturas vs. 27.4 h en condiciones normales). Las líneas B12 y A17 restauraron el fenotipo WT casi en su totalidad (27.3 y 27.4 h vs. 26.5, respectivamente), mientras que, las líneas restantes (RVE8-FL/RVE8-AS) mostraron poca diferencia o ninguna en el periodo respecto a la triple mutante *rve* (Figura suplementaria S12a). Considerando la variabilidad entre las líneas hermanas de ambos grupos, no se logró determinar una diferencia evidente entre RVE8-FL y RVE8-AS. Se podría sugerir que ambas isoformas restauran al menos en parte el periodo WT frente a temperaturas ambiente bajas, aunque en menor grado que lo observado en condiciones estándar de crecimiento (Figura suplementaria S12c).

Patrones de acumulación de las isoformas RVE8 frente a bajas temperaturas

Diversos estudios han dado cuenta del complejo vínculo entre el reloj circadiano y los mecanismos de regulación de la expresión génica inducida por frío. Particularmente, RVE4 y RVE8 funcionan como activadores transcripcionales de la expresión de genes maestros

involucrados en la adaptación al estrés por frío (91). Además de regular la expresión de otros genes target en este proceso, se ha demostrado que la propia expresión de *RVE8* se ve afectada frente a cambios en la temperatura a través del *splicing* alternativo (108). Para determinar si la abundancia de las isoformas generadas por SA en respuesta a los cambios térmicos exhiben patrones de oscilación rítmicos, examinamos la acumulación de la versión canónica de RVE8 y su versión alternativa, cuya expresión se ve aumentada frente a bajas temperaturas, en condiciones normales de crecimiento y bajo estrés por frío.

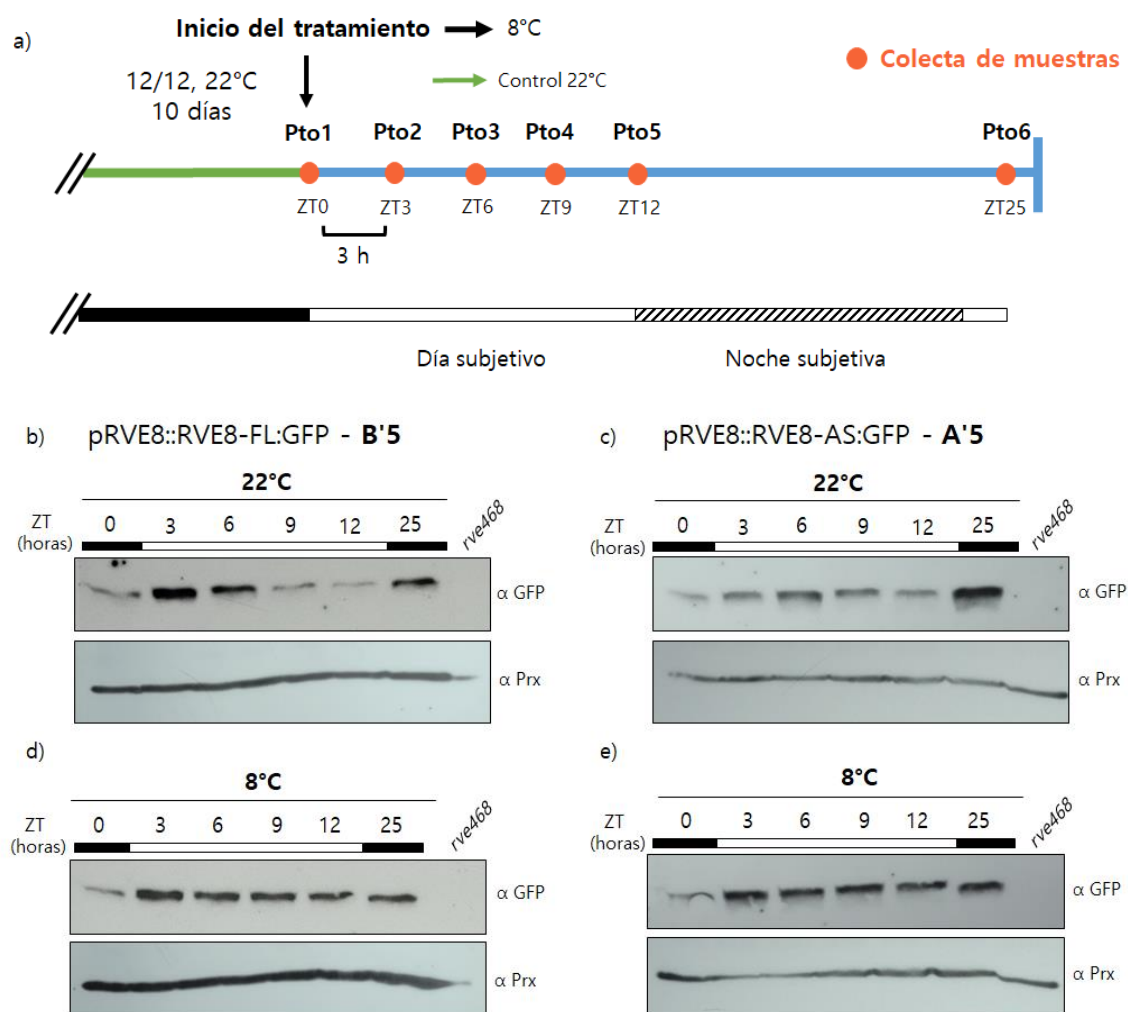


Fig. 23 Patrones de abundancia de las proteínas RVE8-FL y RVE8-AS en condiciones normales y a bajas temperaturas. a) Esquema del diseño experimental. Luego de 10 días de crecimiento bajo ciclos de 12 h luz/12 h de oscuridad a 22°C, un grupo de plantas fue expuesto a 8°C y un grupo control permaneció a 22°C. La cosecha se realizó en 6 puntos, siendo la primera colecta al inicio de la inducción (ZT0). Luego se cosecharon muestras cada 3 horas hasta el anochecer subjetivo, y una muestra final una hora después del amanecer subjetivo (ZT25). b-e) Patrones de acumulación de proteínas de 24 horas en condiciones normales y en frío, analizados por Western blot. Se utilizaron líneas transgénicas que expresan RVE8-FL (b, d) y RVE8-AS (c, e), controlados por su propio promotor. Se recolectó tejido cada 3 horas de plantas de 10 días crecidas en condiciones de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad a 22 °C y luego transferidas, o no, a 8°C hasta 25 horas desde ZT0. Se usó el anticuerpo α GFP para detectar RVE8-FL/AS y

2-Cys peroxirredoxina (Prx) como control de carga. Las barras blancas y negras indican día subjetivo y noche subjetiva, respectivamente. Se utilizó *rve468* como el control negativo.

Para ello, utilizamos plantas transgénicas expresando las distintas versiones de *RVE8* (FL y AS) fusionadas a GFP y controladas por su propio promotor, en *background rve468* (Fig. 19b, d, f). Estas fueron crecidas por 10 días en condiciones de 12 h de luz/12 h de oscuridad a 22°C, y luego la mitad de las plántulas fue transferida a 8°C por 25 h. Las muestras fueron cosechadas a partir del ZT0, cada 3 horas hasta el anochecer subjetivo y un punto adicional a las 25 horas de tratamiento (Fig. 23a). Los análisis de inmunotransferencia indicaron que tanto RVE8-FL como RVE8-AS se acumularon más en el ZT3 y ZT6 durante el día a 22°C (Fig. 23b, c). No obstante, se observa un leve retraso en el punto máximo de acumulación entre la isoforma canónica y la isoforma alternativa, con la primera mostrando el pico de abundancia en el ZT3 y la segunda unas horas después, en el ZT6. A partir de este punto y hacia el final del día la abundancia de las proteínas decae, lo cual es consistente con reportes previos (28,94). Bajo condiciones de estrés por frío, los niveles de las dos versiones de la proteína aumentaron a partir del inicio del tratamiento y se mantuvieron constantes durante el día (Fig. 23c, d). El punto tomado a las 25 horas corresponde a una hora después del inicio del día subjetivo, por lo cual RVE8-FL/AS se ven aumentados y no se observan diferencias en ninguna condición. En conjunto, estos resultados indican que la isoforma alternativa de RVE8 muestra un patrón circadiano de abundancia normal con un leve retraso en el pico de expresión a 22°C, mientras que a 8°C tanto RVE8-FL como RVE8-AS se acumulan y mantienen una abundancia constante, perdiendo la ritmicidad. Este patrón de RVE8 bajo condiciones de estrés por frío y su acumulación en el núcleo, fueron reportadas con anterioridad (91). Sin embargo, nuestros hallazgos aportan evidencia adicional sobre la isoforma alternativa de RVE8, sugiriendo un posible rol en la regulación post-traducciona en respuesta al estrés por frío.

Efectos de la temperatura sobre la expresión relativa de *RVE8* y genes río abajo

Luego nos propusimos analizar los perfiles de expresión de *RVE8* y de genes cuyos niveles son regulados por el mismo, en condiciones normales y frente a bajas temperaturas. Estos corresponden a los genes circadianos *PRR5*, *TOC1*, *ELF4* y, un componente activador de la expresión génica inducible por frío, *DREB1A/CBF3*. De esta manera, evaluamos comparativamente la dinámica transcripcional de las distintas isoformas de *RVE8* y sus genes diana a 22°C, y, cómo la exposición a bajas temperaturas afecta estos patrones de

expresión, proporcionando información clave sobre su papel en la adaptación al estrés térmico.

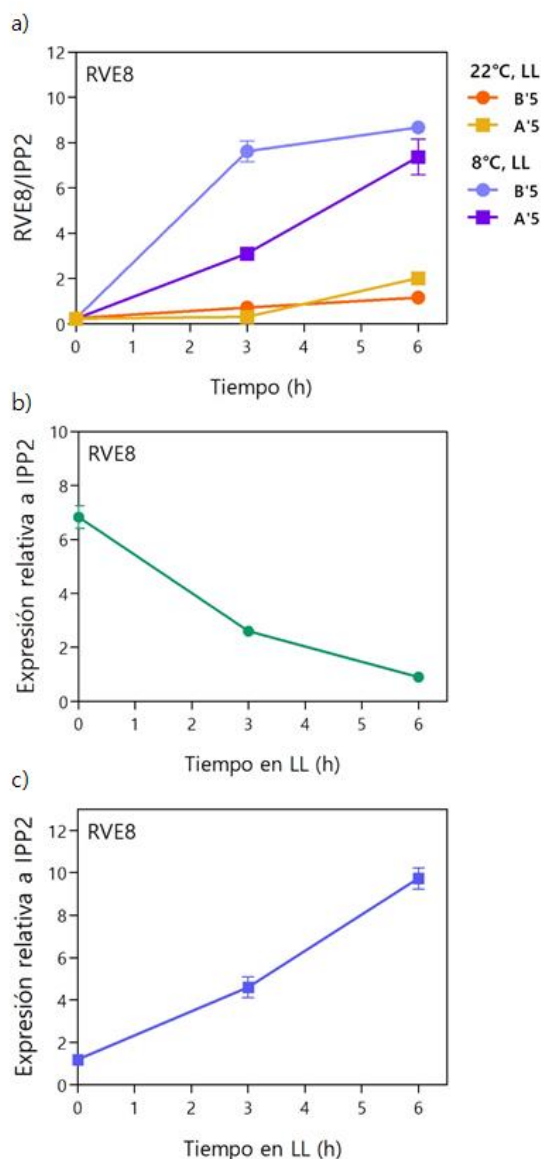


Fig. 24 Expresión relativa de *RVE8* en líneas transgénicas complementadas y WT bajo condiciones normales de temperatura y estrés por frío. a) Niveles de expresión medidos por qPCR en plántulas expresando *RVE8*-FL y *RVE8*-AS bajo el control de su promotor endógeno a 22°C y 8°C. b) Patrón de expresión de *RVE8* a 22°C y (c) bajo estrés por frío (8°C) en plántulas WT. Se recolectó tejido cada 3 horas de plantas de 10 días crecidas en condiciones de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad a 22 °C y luego transferidas, o no, a 8°C hasta 25 horas desde ZT0. Los datos son el promedio de 3 réplicas biológicas relativizadas al gen constitutivo *IPP2* y normalizados a WT 22°C en cada punto temporal (a, c) o a un punto de referencia intermedio (b). Se realizó ANOVA de dos factores seguido de pruebas de Bonferroni comparando ambas líneas en cada condición por separado (*: significativamente diferente, $p \leq 0,05$; **: significativamente diferente, $p \leq 0,01$; ***: significativamente diferente, $p \leq 0,001$). Las barras de error representan el SEM. h: horas.

A partir del ARN extraído de las muestras descritas en el apartado anterior (Fig. 23a), obtuvimos ADNc de plantas WT, mutantes *rve468* y plantas transgénicas expresando

RVE8-FL (B'5) y RVE8-AS (A'5) bajo el control de su promotor endógeno. Se midieron por qPCR los niveles de ARNm en los tres puntos iniciales del experimento, a 22°C y 8°C, en condiciones de libre curso (ZT0-6). También se midió la expresión del gen constitutivo o *housekeeping* *IPP2* (AT3G02780) para la normalización. La expresión de los genes en las líneas transgénicas se relativizó en ambas condiciones a WT 22°C en el mismo punto temporal. Esto nos permitió comparar el efecto del tratamiento o del genotipo respecto a WT en cada tiempo o ZT de forma más precisa y aislando el ritmo de expresión basal de cada gen.

En primer lugar, analizamos los patrones de expresión de *RVE8* en condiciones normales de crecimiento. En plantas WT, similar a lo reportado previamente (28,37), se observan mayores niveles de ARNm en las primeras horas de la mañana subjetiva, con una tendencia decreciente hacia el atardecer (Fig. 24b). A primera hora de la mañana (ZT0), las líneas RVE8-FL/AS muestran niveles reducidos en comparación con el control WT (Fig. 24a). La línea B'5 que expresa la versión canónica de RVE8, exhibe un incremento paulatino a partir de este punto, que continua hacia el ZT6. En cambio, la línea con la isoforma alternativa A'5, mantiene sus niveles bajos hasta el ZT3 y a partir de este punto aumenta moderadamente, mostrando un retraso en el pico consistente con lo observado en los análisis de inmunotransferencia (Fig. 23c). No se detectó expresión en la mutante *rve468* (Figura suplementaria 14a). En el tratamiento a 8°C, ambas líneas transgénicas mostraron un aumento de la expresión a las 3 horas de la exposición al estímulo, alcanzando un nivel máximo a las 6 horas (Fig. 24a). Curiosamente, la línea B'5, presenta una respuesta más abrupta al tratamiento térmico, con un salto en la expresión de RVE8-FL en ZT3. Por el contrario, A'5, muestra un patrón de aumento más uniforme a lo largo del tiempo, similar a lo observado en WT (Fig. 24c). La respuesta anticipada de RVE8-FL respecto a RVE8-AS podría guardar relación con la acumulación circadiana diferencial entre las isoformas, o bien, podría sugerir una mayor sensibilidad de RVE8-FL al tratamiento térmico. En conjunto, nuestros datos muestran que los niveles de expresión de *RVE8* bajo condiciones de estrés por frío son más elevados en todos los puntos medidos con respecto a aquellos obtenidos a 22°C tanto para WT como para las líneas transgénicas.

El siguiente paso fue cuantificar la expresión relativa de cuatro genes seleccionados que son controlados por RVE8, en las condiciones previamente mencionadas. A 22°C, *PRR5* mostró niveles más altos en las líneas B'5 y A'5 respecto a WT, en todos los puntos

medidos. La tendencia, no obstante, es de aumento hacia la tarde subjetiva en todos los casos, con los valores más altos a las 6 h en LL (Fig. 25a, Figura suplementaria 13a). Por el contrario, la triple mutante *rve468* mostró niveles más altos en el ZT0, que van disminuyendo a lo largo del día (Figura suplementaria S14b). En condiciones de estrés por frío, las líneas RVE8-FL/AS muestran un incremento drástico de la expresión de *PRR5* a las 3 horas de tratamiento y luego disminuyen ligeramente (Fig. 25a). Sin embargo, la magnitud del aumento varía entre las líneas. B'5 muestra un incremento más pronunciado (ZT3=339.25) que A'5 (ZT3=102.86), lo cual sugiere una regulación de *PRR5* más activa por parte de RVE8-FL. Esta diferencia también podría deberse, al menos en parte, a la variabilidad en la expresión basal de *RVE8* entre ambas líneas (Fig. 19d).

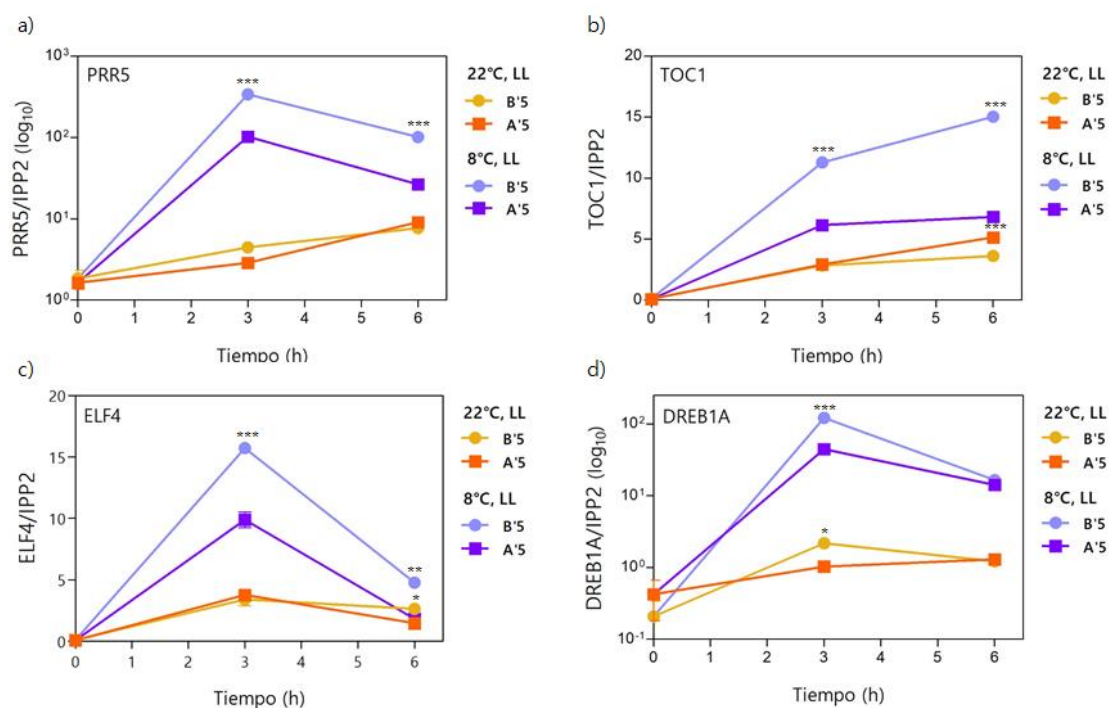


Fig. 25 Expresión relativa de genes regulados por *RVE8* en líneas transgénicas complementadas bajo condiciones normales de temperatura y estrés por frío. a-d) Niveles de expresión de los genes circadianos *PRR5* (a), *TOC1* (b), *ELF4* (c) y el FT de respuesta al frío *DREB1A* (d), medidos por qPCR en plántulas expresando *RVE8*-FL y *RVE8*-AS bajo el control de su promotor endógeno, a 22°C y 8°C. Se recolectó tejido cada 3 horas de plantas de 10 días crecidas en condiciones de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad a 22 °C y luego transferidas, o no, a 8°C hasta 25 horas desde ZT0. Se muestran los valores correspondientes a los 3 puntos temporales iniciales del experimento. Los datos son el promedio de 3 réplicas biológicas relativizadas al gen constitutivo *IPP2* y normalizados a WT 22°C en cada punto temporal. Se realizó ANOVA de dos factores seguido de pruebas de Bonferroni comparando ambas líneas en cada condición por separado (*: significativamente diferente, $p \leq 0,05$; **: significativamente diferente, $p \leq 0,01$; ***: significativamente diferente, $p \leq 0,001$). Las barras de error representan el SEM. h: horas.

Al medir los niveles endógenos de *PRR5* frente al tratamiento en WT, observamos el mismo patrón de expresión que las líneas transgénicas, pero con niveles más bajos en

todos los puntos temporales (Figura suplementaria 13b). Esto indicaría que ambas isoformas son funcionalmente activas en la regulación de *PRR5* en las primeras horas de exposición al frío, incluso con una mayor inducción que en WT, y un efecto más pronunciado en el caso de RVE8-FL.

En condiciones normales de temperatura, la expresión de *TOC1* aumenta ligeramente a partir de ZT0 con el transcurso de las horas en las líneas B'5 y A'5, contrario al patrón observado en WT, que mantiene niveles bajos y no manifiesta cambios significativos a lo largo del tiempo (Fig. 25b, Figura suplementaria 13c). A'5 muestra mayor inducción a las 6 horas en LL (ZT6=5.14). Por su parte, la mutante *rve468* exhibe una expresión reducida, con un leve incremento a las 3 horas y posterior disminución (Figura suplementaria S14c). Bajo estrés por frío, B'5 activa la expresión de *TOC1* moderadamente, alcanzando los niveles más altos en ZT6. A'5, por otro lado, muestra niveles similares de expresión a los detectados a 22°C, con una pequeña inducción en ZT3 (Fig. 25b). Las mediciones en WT, también revelaron un aumento de la expresión de *TOC1* en condiciones de frío, pero de magnitud considerablemente menor respecto a B'5 (Figura suplementaria 13d). Estos datos sugieren que hay un cambio en el perfil de expresión de *TOC1* en las líneas transgénicas a 22°C, y, que a diferencia de RVE8-AS, la variante RVE8-FL promueve una activación notable de *TOC1* en respuesta al estrés por frío.

La expresión del miembro del EC, *ELF4*, se ve aplacada durante las primeras horas del día subjetivo en WT, de acuerdo con lo reportado para dicho gen en condiciones normales de temperatura (202). Hacia el atardecer sus niveles comienzan a elevarse (ZT6=3.05) (Figura suplementaria 13e). Las líneas B'5 y A'5 muestran un patrón similar al de la mutante *rve468*, con una inducción temprana en el ZT3 que alcanza un pico y luego disminuye levemente. No obstante, mantienen niveles más elevados en ZT3-6 (Fig. 25c, Figura suplementaria 14d). Durante el tratamiento a 8°C, ambas líneas transgénicas muestran una marcada activación de *ELF4* a las 3 horas. Sin embargo, B'5 alcanza el pico máximo con una expresión aproximadamente 15 veces mayor que la basal, seguida de A'5 (ZT3=9.88) que también exhibe un aumento significativo. A las 6 horas de tratamiento, la expresión disminuye en todos los casos, acercándose a sus niveles a 22°C (Fig. 25c). El mismo patrón de expresión se observa en WT, con una magnitud en el aumento equiparable al de A'5 (Figura suplementaria 13f). Según estos resultados, la expresión de *ELF4* tiene una fase de inducción más temprana a temperatura ambiente en las líneas transgénicas y una regulación frente al frío más marcada por parte de B'5 en comparación con A'5 y WT, sugiriendo una mayor sensibilidad, o bien, un efecto derivado de la expresión basal de *RVE8*.

Por último, analizamos la expresión del factor de transcripción inducible por frío *DREB1A/CBF3*. A temperatura ambiente, los niveles se mantuvieron bajos y relativamente estables para las líneas B'5, A'5 y WT (Fig. 25c, Figura suplementaria 13g). Como se esperaría, una inducción considerable de *DREB1A* ocurre frente al tratamiento a 8°C en todas las líneas, alcanzando un pico a las 3 horas, que luego decae (Fig. 25c, Figura suplementaria 13h). La línea B'5 exhibe la mayor magnitud en la respuesta (~120 mayor que su expresión basal), seguido de WT (~70 veces) y A'5 (~40 veces). Todo esto indicaría que la proteína RVE8-FL presente en la línea B'5 es más sensible en la respuesta al frío que RVE8-AS, activando con más fuerza la expresión de *DREB1A* en las primeras horas de exposición a bajas temperaturas.

De manera más global, los genes circadianos y de las vías de señalización térmica analizados ajustan su actividad en función de la variante proteica de RVE8 presente y de la temperatura. En frío, la expresión de los genes medidos aumenta significativamente dentro de las 3 primeras horas y posteriormente se reduce. Además, la magnitud de la inducción varía según la línea transgénica, siendo B'5 la candidata que más favorece la aclimatación a bajas temperaturas. Posiblemente, la isoforma alternativa RVE8-AS actúa como moduladora de su propia expresión frente al estrés térmico.

Tras la batería de experimentos realizados a nivel fisiológico y molecular en las líneas expresando las isoformas RVE8-FL y RVE8-AS, demostramos que ambas variantes proteicas son funcionales, presentan un comportamiento circadiano y responden a estímulos ambientales. Esto las convierte en herramientas ideales para estudiar interacciones proteicas relevantes.

Modelado de las isoformas de *splicing* alternativo de RVE8 y LNK1

El SA juega un papel crucial en la regulación de la expresión génica y la estructura/función de las proteínas, aportando una gran flexibilidad al transcriptoma y proteoma. Los efectos que puede tener el SA en los transcritos y proteínas resultantes son muy diversos (47). Por un lado, puede regular la abundancia de transcritos, y, en consecuencia, de proteínas, mediante la producción de ARNm alternativos que son enviados a las vías de NMD. Sin embargo, también puede aumentar la complejidad proteica, ya que las variantes de transcritos que se traducen pueden producir isoformas de proteínas diferentes, a menudo con funciones distintas o incluso antagónicas. Las alteraciones en las nuevas versiones proteicas pueden implicar cambios o remoción completa de dominios funcionales. Particularmente, la selección alternativa del sitio 3' de *splicing* en el

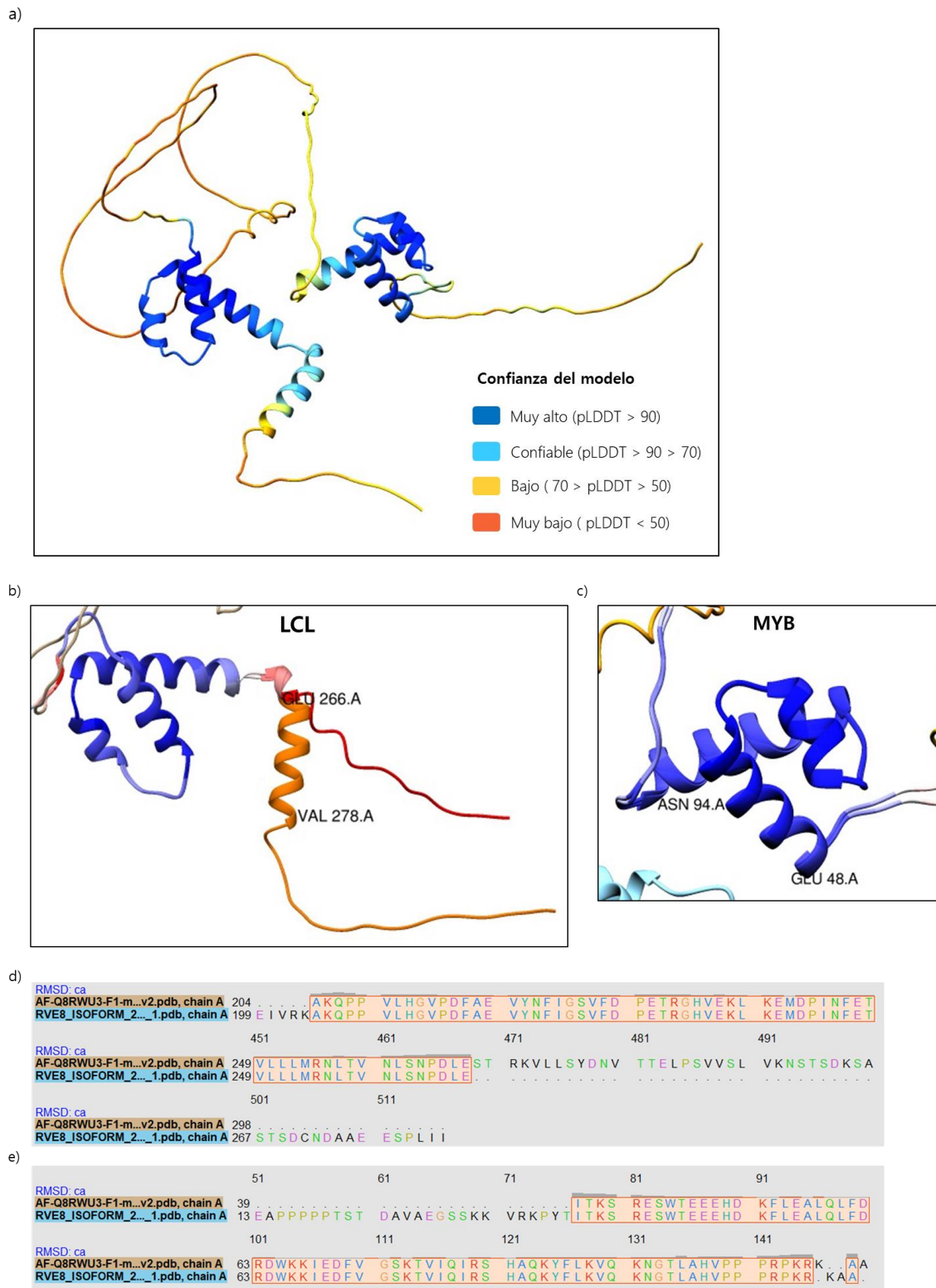


Fig. 26 Alineamiento estructural y de secuencia entre el modelo de la isoforma alternativa generada con AlphaFold2 (AF-Q8RWU3-F2) y el modelo de la proteína canónica de RVE8 (AF-Q8RWU3-F1). a) Estructura de la proteína RVE8 (AF-Q8RWU3-F1) visualizada según valores (0-100) de un score de confianza por residuo (pLDDT). Las regiones con un pLDDT alto (azul/celeste) corresponden a las regiones de los dominios Myb y LCL de la proteína, mientras que las regiones con un pLDDT bajo (amarillo/naranja) pertenecen a regiones desordenadas, no conservadas. b, c) Alineamiento estructural en las regiones de dominios de la proteína RVE8. A la izquierda se muestra el alineamiento del dominio LCL [210-268] (b) entre la isoforma RVE8-FL y la isoforma RVE8-AS. En rojo el extremo C-terminal de la

isoforma alternativa. En naranja, el extremo C-terminal de la proteína canónica. Se destaca la posición del último aminoácido (aa) que conforma la hélice α del dominio LCL para ambos modelos. RMSD total = 0.590. A la derecha, alineamiento estructural en la región del dominio MYB [40-100] (c) entre la isoforma RVE8-FL y la isoforma RVE8-AS. RMSD = 0.749. Visualizado por color según valores de RMSD (azul: valores más bajos; rojo: valores más altos). d) Alineamiento de secuencias en la región del dominio LCL entre la isoforma alternativa y la isoforma canónica. e) Alineamiento de secuencias en la región del dominio Myb entre la isoforma alternativa y la isoforma canónica. En los recuadros rojos se destacan las regiones alineadas y conservadas. Se utilizó el software Chimera para la visualización y análisis de las estructuras.

intrón 7 de *RVE8*, adiciona 22 nucleótidos al transcripto, introduciendo un codón de terminación prematuro (PTC) que resulta en una versión truncada de la proteína. Para evaluar en qué medida la estructura de la proteína alternativa se ve afectada por la pérdida de nucleótidos en el extremo 3' del transcripto AS, se creó un modelo predictivo de la proteína RVE8-AS. En primer lugar, se obtuvieron las secuencias canónica (Q8RWU3-1) y alternativa (Q8RWU3-2) de la proteína de RVE8 a través del repositorio central de datos sobre proteínas Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), donde, además, una estructura predictiva de la versión canónica de RVE8 se encuentra disponible (AF-Q8RWU3-F1) (Fig. 26a, Figura suplementaria S15). Utilizamos un sistema de inteligencia artificial (IA), AlphaFold2, el cual, a partir de la secuencia primaria de una proteína, realiza una predicción estructural de alta precisión. Se obtuvieron cinco modelos tridimensionales a partir de la secuencia *query* de la isoforma tomada de UniProt. También se obtuvieron distintas métricas de confianza, útiles para analizar la calidad de los modelos, tales como el pLDDT (*predicted local-distance difference test*), el PAE (por *Predicted Aligned error*) y un gráfico de la cobertura del alineamiento. Las regiones mejor modeladas y con mayor confianza correspondieron a las secuencias conservadas de los dominios que forman estructuras globulares y poseen mayor homología con otras estructuras, mientras que las regiones con menor complejidad presentaron mayor dificultad para alinearse debido a la baja confianza de la predicción. Estas últimas se corresponden con regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs), las cuales son muy abundantes en proteínas involucradas en transducción de señales y transcripción.

Para analizar el grado de similitud entre el modelo de la isoforma generado (AF-Q8RWU3-F2) y el modelo disponible de la proteína canónica RVE8 (AF-Q8RWU3-F1), se realizó un alineamiento por dominios utilizando el software de análisis de estructuras moleculares, UCSF Chimera (143). Ambos dominios alinearon correctamente (Fig. 26b-e).

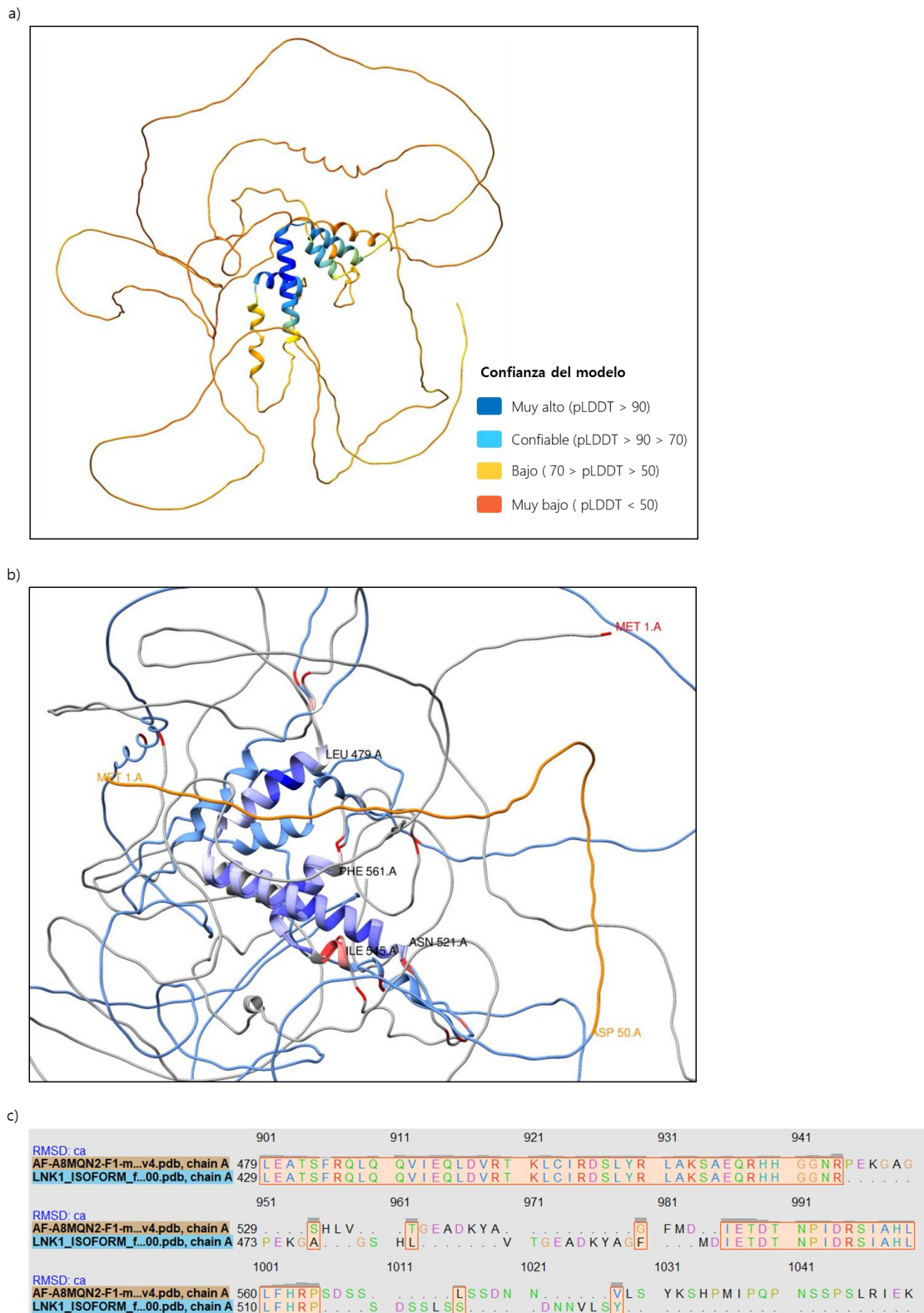


Fig. 27 Alineamiento estructural y de secuencia entre el modelo de la isoforma alternativa generada con AlphaFold2 (AF-A8MQN2-2) y el modelo de la proteína canónica de LNK1 (AF-A8MQN2-1). a) Estructura de la proteína LNK1 (AF-A8MQN2-1) visualizada según valores (0-100) de un score de confianza por residuo (pLDDT). Las regiones con un pLDDT alto (azul/celeste) corresponden a las regiones de dominios conservados de la proteína, mientras que las regiones con un pLDDT bajo (amarillo/naranja) pertenecen a regiones desordenadas. b) Alineamiento estructural en la región C-terminal conservada de la proteína LNK1. Se muestra el alineamiento de las estructuras globulares [474-

564, LNK1-FL; 424-514, LNK1-AS] entre la isoforma RVE8-FL y la isoforma RVE8-AS. RMSD total = 0.744. En rojo, el extremo N-terminal [1, LNK1-AS; 51, LNK1-FL] de la isoforma alternativa. En naranja, el extremo N-terminal de la proteína canónica [1-50]. Se destacan las posiciones de aminoácidos (aa) del modelo de referencia al inicio y final de las hélices α alineadas. Las imágenes se visualizan por color según valores de RMSD (azul: valores más bajos; rojo: valores más altos). c) Alineamiento de secuencias en la región C-terminal entre la isoforma alternativa y la isoforma canónica LNK1. En los recuadros rojos se destacan las regiones alineadas y conservadas. Se utilizó el software Chimera para la visualización y análisis de las estructuras.

El dominio MYB [35-120] con un desvío cuadrático medio (RMSD) total de 0.749 angstroms, y el dominio LCL [210-268] con un RMSD de 0.590 angstroms. Sin embargo, en el extremo C-terminal se pueden observar diferencias entre las estructuras de las proteínas (Fig. 26b). La alteración de la secuencia original de aminoácidos en la isoforma alternativa (RKVLLSYDNVTTEL \rightarrow SDCNDAAEESPLII) [268-282], producida por un cambio en el marco de lectura debido a la inserción de un PTC en el transcripto de la misma, genera un cambio en la conformación de una hélice α en el dominio LCL [264-280]. Esta se desestabiliza debido a la presencia de aminoácidos polares (prolina, serina y treonina), perdiendo su estructura helicoidal. Además, los residuos de la posición 283 a 298 se pierden (Fig. 26b, d; Figura suplementaria S15). Estos hallazgos indican que la variante proteica de RVE8 no solo presenta una menor longitud que la versión canónica, sino que los cambios a nivel de aminoácidos modifican la estructura del dominio LCL de la proteína.

El mismo procedimiento fue llevado a cabo para la proteína LNK1, cuyo transcripto alternativo carece de un exón hacia la región 5' del gen (ES, E2) dando como resultado una proteína de menor tamaño. Para comprender mejor los cambios que sufre esta isoforma proteica a nivel estructural, utilizamos la secuencia y el modelo predictivo disponible en el repositorio de datos Uniprot de la proteína canónica LNK1 (AF-A8MQN2-1) (Fig. 27a, Figura suplementaria S16) y lo alineamos al modelo AF-A8MQN2-2 (LNK1-AS) generado a partir de la secuencia primaria con AlphaFold2. En la región C terminal de las proteínas, se observó un alineamiento exitoso, con un RMSD total de 0.744 (Fig. 27b, c). Sin embargo, hacia el extremo N terminal, el alineamiento de las estructuras se dificultó debido a la gran cantidad de IDRs presentes en las proteínas. La principal modificación por la pérdida del E2, se produce al inicio de la proteína [1-50], en una región de baja complejidad estructural. Los residuos de las posiciones indicadas están ausentes en la proteína alternativa, con lo cual se visualiza un segmento faltante en el N-terminal (Fig. 27b, Figura suplementaria S16). Estos resultados indicarían que LNK1-AS mantiene las regiones R1-R2 conservadas en el extremo C-terminal que son fundamentales para

interactuar con RVE8, pero se ve afectada en la región del dominio "Extra N-terminal Tail" (ENT), presente únicamente en LNK1/LNK2.

Análisis de las interacciones entre isoformas de RVE8 y LNK1

A diferencia del dominio Myb altamente conservado en el extremo N-terminal, el extremo C-terminal de las proteínas RVE suele ser variable y está implicado en la modulación de la actividad transcripcional de la proteína. El dominio LCL se encuentra exclusivamente en los cinco miembros de la subclase RVE/LCL y es responsable de la interacción con los componentes de la familia LNK (33). Para analizar la funcionalidad del dominio LCL modificado de la isoforma RVE8-AS utilizamos un sistema de doble híbrido.

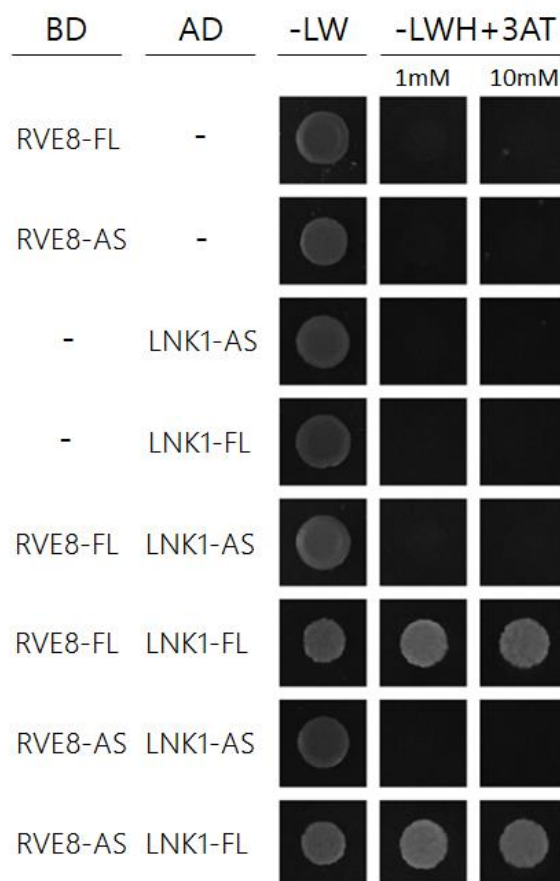
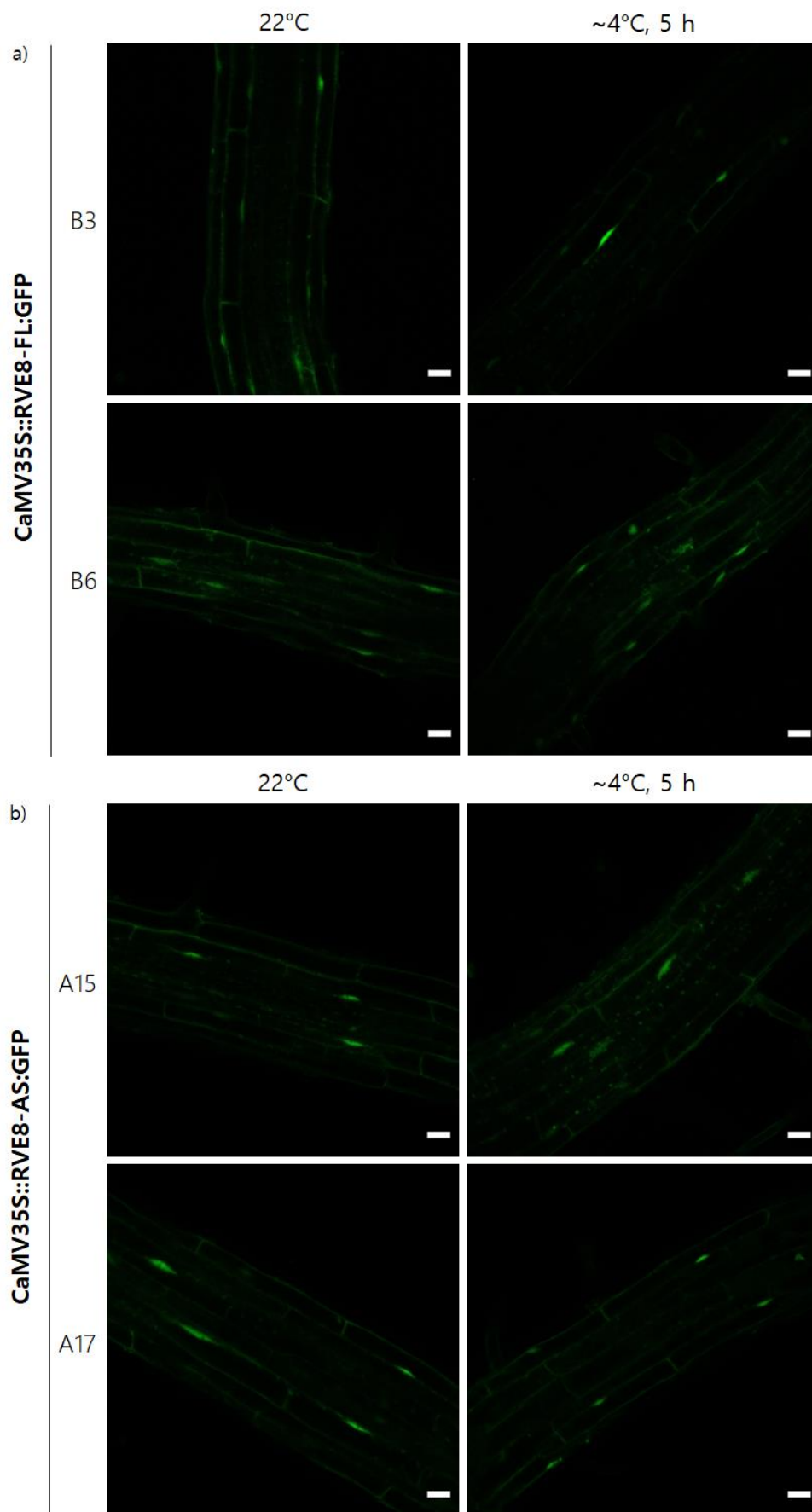


Fig. 28 Sistema de doble híbrido en levaduras que muestra la interacción entre las isoformas RVE8-FL/AS y LNK1-FL/AS. Colonias de la cepa Y2H Gold expresando GAL4-DBD fusionada a RVE8-FL y RVE8AS (*bait*), y colonias de la cepa Y187 expresando GAL4-AD fusionado a LNK1-FL y LNK1-AS (*prey*), fueron apareadas en las combinaciones indicadas y sembradas en medio de crecimiento selectivo. Los apareamientos exitosos pueden crecer en medio SD - Leucina/ -Tryptófano (-LW), mientras que los interactores positivos pueden crecer en medio SD -Leucina/ -Tryptófano/ -Histidina + 3-amino-1,2,4-triazol (3AT) (-LWH + 3AT). Se realizaron al menos dos replicas experimentales.

Se clonaron las regiones codificantes de las isoformas de SA de LNK1 (LNK1-FL/AS, *prey*) fusionadas al dominio de activación de Gal4 (GAD) y las isoformas RVE8-FL/AS (*bait*) fusionadas al dominio de unión al ADN (GBK) de levadura. Combinaciones de los plásmidos generados se sembraron en medio selectivo SD -LWH (-Leu, -Trp, -His) para detectar las posibles interacciones entre isoformas. Curiosamente, encontramos que las cepas de levadura expresando cualquiera de las dos versiones RVE8-FL o RVE8-AS, y LNK1-FL eran capaces de crecer en el medio selectivo (Fig. 28). Las líneas donde las isoformas de RVE8 se apareaban con LNK1-AS, no mostraron crecimiento en el medio selectivo, indicando una interacción negativa con esta isoforma en particular. Estos resultados sugieren que la modificación detectada en el dominio LCL de RVE8 no afectaría su capacidad de unión con LNK1, sino que la especificidad de la interacción está determinada por LNK1, cuyo SA parece modular su capacidad de unión a ambas isoformas de RVE8.

Análisis de expresión y localización subcelular de RVE8-FL y RVE8-AS bajo estrés por frío

Para elucidar el comportamiento de las variantes proteicas de RVE8 en respuesta al estrés por frío, examinamos la fluorescencia y la localización subcelular utilizando las líneas transgénicas sobreexpresantes de las isoformas RVE8-FL y RVE8-AS fusionadas a GFP. Empleamos estas últimas debido a una baja señal de fluorescencia de GFP detectada en las líneas de expresión endógena, lo cual dificultaría una visualización precisa. Plántulas de las líneas B3, B6, A15 y A17 fueron crecidas en placas de Petri bajo condiciones de día largo (16 h luz/8 h oscuridad) a 22°C durante una semana. Luego, la mitad de las plántulas fueron sometidas a un tratamiento a 4 °C por 5 horas, mientras que el resto permaneció a temperatura ambiente. En condiciones normales de temperatura, la proteína RVE8-FL se localiza preferentemente en el núcleo, aunque también se observa en el citoplasma. Luego de 5 horas de exposición al frío, la fluorescencia parecería estar más focalizada en el núcleo, principalmente en la línea B3 (Fig. 29a). Para explorar esta posible traslocación, cuantificamos la intensidad relativa de fluorescencia GFP en los núcleos detectados en ambas condiciones. Debido al número limitado de replicas biológicas, los resultados obtenidos son preliminares y reflejan solo tendencias que requieren mayor robustez experimental para ser confirmadas.



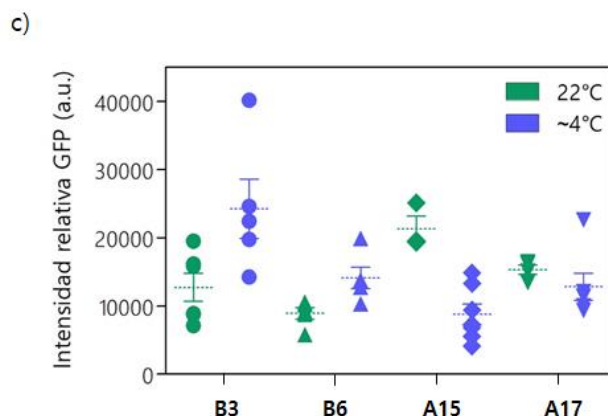


Fig. 29 Localización subcelular y fluorescencia de GFP de líneas sobreexpresantes de RVE8-FL y RVE8-AS bajo condiciones de estrés por frío. a) Fluorescencia de GFP en líneas sobreexpresantes de la isoforma RVE8-FL (B3, B6) y (b) RVE8-AS (A15, A17) fusionadas a GFP, bajo el control del promotor CaMV 35S. Las plántulas transgénicas fueron crecidas en LD (16 h luz/8 h oscuridad) por 7 días antes de ser tratadas, o no, a $\sim 4^{\circ}\text{C}$ por 5 horas. Se observó la fluorescencia en los hipocotilos a temperatura normal (22°C) y bajo estrés por frío ($\sim 4^{\circ}\text{C}$), (barras de escala, 20 μm). c) Intensidad relativa de fluorescencia (GFP). Se cuantificó la intensidad media de los núcleos en ambas condiciones utilizando el software FIJI. Los valores fueron corregidos por la intensidad del fondo y expresados en unidades arbitrarias (a.u.). Las líneas de puntos y las barras de error representan el promedio \pm SEM de 4-8 réplicas biológicas por línea independiente. No se realizaron análisis estadísticos debido al bajo número de réplicas por condición.

La evidencia indicaría que efectivamente las líneas B3 y, en menor medida, B6, muestran mayores niveles de acumulación en el núcleo bajo estrés por frío (Fig. 29c). En el caso de la proteína RVE8-AS, no se observan diferencias apreciables en la distribución de la fluorescencia en las imágenes entre tratamientos (Fig. 29b). Sin embargo, al cuantificar la intensidad relativa en los núcleos, detectamos una tendencia opuesta con mayor acumulación en el núcleo a 22°C que a $\sim 4^{\circ}\text{C}$ en ambas líneas, siendo más marcado el efecto en A15 (Fig. 29c). Estos datos exploratorios sugieren diferencias en la regulación de ambas isoformas proteicas. Mientras que la expresión de la isoforma canónica de RVE8 se activa y acumula en el núcleo bajo estrés por frío, la isoforma alternativa no muestra cambios evidentes en la localización subcelular bajo la misma condición. No obstante, se requieren más replicas independientes para avalar estos resultados.

CONCLUSIONES

Se identificaron eventos de *splicing* alternativo (SA) en los genes circadianos *RVE8* y *LNK1*, cuya regulación está influenciada por cambios en la temperatura. Se observó que la exposición a bajas temperaturas (12°C) favorece la generación de isoformas alternativas, mientras que a temperaturas elevadas (27°C) prevalecen las isoformas canónicas. La validación experimental mediante RT-PCR confirmó la expresión diferencial de estas isoformas frente a variaciones térmicas. Además, se comprobó que la exposición a luz blanca durante la noche también modula el uso del sitio alternativo de *splicing* en *RVE8*, lo que indica un control combinado por luz y temperatura. Estos resultados refuerzan la idea de que el SA podría ser un mecanismo regulador en la adaptación circadiana a condiciones ambientales fluctuantes.

A nivel funcional, la caracterización a distintas temperaturas de líneas sobreexpresantes de las isoformas SA de *RVE8*, reveló que ambas variantes restauran parcialmente el periodo circadiano y el tiempo de floración, sin observarse diferencias entre las mismas para estos fenotipos. La isoforma canónica (FL) sí mostró un mayor grado de reversión del fenotipo mutante que la isoforma alternativa (AS) en el proceso de inhibición de la longitud de los hipocotilos mediada por luz, observándose incluso un efecto sutil de la sobreexpresión con un crecimiento reducido en comparación con plantas WT, parcialmente dependiente del fotoperiodo. Esto indicaría que ambas isoformas son funcionales dentro del sistema circadiano, aunque la isoforma canónica tendría una mayor eficiencia en la regulación de algunos de los procesos estudiados.

Los patrones de acumulación de las proteínas *RVE8*-FL/AS mostraron ritmicidad circadiana, pero con un leve retraso en el pico para la isoforma AS. Tras la exposición prolongada a estrés por frío, observamos un aumento en los niveles de ambas isoformas que se mantuvo constante en el tiempo. El análisis de la expresión de genes diana regulados por *RVE8* indicó que la isoforma FL induce una respuesta más pronunciada durante las primeras horas de tratamiento térmico, especialmente en *PRR5* y *DREB1A*. Además, al observar la fluorescencia de GFP en las líneas endógenas de ambas isoformas, se observó una tendencia a acumularse en el núcleo de *RVE8*-FL tras la exposición a frío, mientras que *RVE8*-AS mantuvo un patrón de localización citoplasmático-nuclear sin cambios significativos bajo la misma condición.

Se realizó un modelado predictivo de las isoformas alternativas de RVE8 y LNK1 que evidenció modificaciones estructurales en las proteínas AS de ambos genes. El dominio LCL de RVE8-AS se ve afectado por un cambio en la conformación de una hélice α y la pérdida de residuos en el extremo C-terminal. Mientras que, LNK1-AS pierde un segmento en el extremo N-terminal, posiblemente afectando el dominio "Extra N-terminal Tail" (ENT).

Finalmente, los ensayos de interacción proteica sugieren que la isoforma alternativa de RVE8 conserva la capacidad de unirse a ciertos factores de transcripción circadianos, aunque su afinidad con LNK1 parece estar modulada por el SA de este último.

En conjunto, estos hallazgos sugieren que RVE8-AS podría funcionar como un elemento regulador que, al no sustituir completamente a RVE8-FL para todas sus funciones, atenuaría su funcionamiento en respuesta a los cambios ambientales que incrementan sus niveles. En este sentido, el SA representaría un mecanismo de ajuste fino, evitando una respuesta abrupta a los cambios ambientales y contribuyendo a la estabilidad del reloj circadiano en condiciones variables.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Con el objetivo general de evaluar cómo las señales ambientales influyen sobre los niveles y/o la función de genes del reloj circadiano, y, en consecuencia, de los genes subyacentes, a través de su efecto sobre procesos post-transcripcionales, nos centramos en el estudio de las respuestas a dos factores fundamentales para el correcto funcionamiento del oscilador central: la luz y la temperatura.

Los fitocromos en la regulación del *splicing* alternativo controlado por luz

La luz constituye una fuente fundamental de energía e información para las plantas. La percepción de la luz por las moléculas de clorofila desencadena el proceso fotosintético, que permite a las plantas utilizar la luz como fuente de energía para la acumulación de biomasa. A su vez, la luz percibida por los fotorreceptores sensoriales controla múltiples aspectos del ciclo de vida de la planta, como la germinación de las semillas, la desetiología, las respuestas de escape al sombreado (*shade avoidance*) y la transición a la etapa reproductiva. Dado que la luz excita simultáneamente los fotorreceptores fotosintéticos y fotosensoriales, determinar la contribución relativa de cada vía al control de la expresión génica en plantas completas resulta un desafío.

En la primera sección de este trabajo, utilizamos mutantes *phyQ* para desentrañar el efecto dual de la luz sobre el *splicing* alternativo (SA). Al exponer mutantes *phyQ* a un pulso de luz R de 2 horas administrado en la mitad de la noche, pudimos evaluar en qué medida el efecto de la luz R sobre el SA estaba mediado por fotorreceptores fotosintéticos y/o por fotorreceptores fotosensoriales. De hecho, descubrimos que los fitocromos tienen una contribución significativa, pero no esencial, en el SA de plantas de *Arabidopsis* crecidas en ciclos de luz. Si bien la regulación de algunos eventos de SA depende de los fitocromos, muchos eventos mostraron cambios similares en los patrones de *splicing* en respuesta a la luz R tanto en WT como en mutantes *phyQ* (Fig. 8 y 9).

La duración del tratamiento de luz influye en los eventos de *splicing* diferencial específicos que se pueden detectar (203). El equilibrio entre la tasa de síntesis de las nuevas isoformas y la tasa de degradación de las antiguas determina el pool de isoformas que se pueden cuantificar. En la literatura, se han aplicado tratamientos de luz con diferentes duraciones, lo que podría explicar las discrepancias entre los DSGs encontrados en diferentes conjuntos de datos. En este estudio, utilizamos un tratamiento de pulso de luz de 2 h para evaluar las respuestas inmediatas, en lugar de las respuestas indirectas a largo plazo a la

luz R, maximizando al mismo tiempo el número de eventos SA potencialmente detectables.

Encontramos que 340 genes eran susceptibles a cambios en el SA tras el tratamiento con luz R, de forma independiente de los fitocromos (Fig. 7c). Presumiblemente, estos eventos de *splicing* están controlados por alguna señal derivada del proceso fotosintético (170). En efecto, la luz y la sacarosa regulan el SA de forma similar en plántulas etioladas (203), y se ha demostrado que el efecto de los azúcares y la luz sobre el SA de un subconjunto de genes específicos depende de la actividad de TOR, tanto en plántulas etioladas como en raíces de plantas crecidas en luz (172,204). Múltiples factores de *splicing* son targets de fosforilación de TOR, lo cual sugiere que este podría ser un mecanismo de regulación del SA por luz que actúa a través de fotorreceptores fotosintéticos (205). Adicionalmente, la luz regula el SA en plantas crecidas en luz controlando la tasa de elongación de la ARN Polimerasa II, lo que afecta diferencialmente el reconocimiento de sitios de corte donores y aceptores débiles y fuertes (171). Para comprender mejor cómo la luz y los azúcares regulan el SA en las plantas, sería interesante profundizar en las conexiones mecanicistas, si las hubiera, entre los efectos de TOR sobre el SA y los cambios en la tasa de elongación de Pol II. Finalmente, sería útil evaluar si los fotorreceptores fotosintéticos que actúan a través de TOR modulan la actividad de los factores de *splicing*, incluyendo aquellos que interactúan físicamente con los fitocromos y criptocromos.

Los fitocromos adoptan su conformación activa Pfr en respuesta a la luz R y se translocan al núcleo donde interactúan, entre otras proteínas, con factores de *splicing* tales como SFPS, RRC1 y SWAP1. Se ha planteado la hipótesis de que SWAP1, RRC1 y SFPS modulan la actividad del snRNP U2 de forma dependiente de los fitocromos a través de un mecanismo aún no esclarecido (206). En efecto, los mutantes con pérdida de función de estos genes muestran fenotipos similares a los observados en mutantes *phyB* en respuesta a la luz R durante la desetiología. Sin embargo, aún no se ha estudiado si estos factores desempeñan un papel en otros procesos regulados por fitocromos, como las respuestas de *shade avoidance*. Abordar esta cuestión contribuiría a una mejor comprensión de la relevancia biológica de las interacciones entre fitocromos y factores de *splicing*, que hasta ahora se ha evaluado principalmente en plántulas etioladas. Sería interesante analizar si estas interacciones y su efecto sobre el SA persisten en plantas crecidas en ciclos de luz.

Evidencia creciente apunta a que el efecto de la luz sobre el SA está mediado por una compleja y dinámica red de interacciones. El SA de *RS31*, por ejemplo, se regula por luz de forma dependiente de phyA/phyB en plántulas etioladas, mientras que no depende de phyA ni de phyB en plantas crecidas en luz (162,170). Nuestro análisis genómico de la regulación del SA por luz R en mutantes *phyQ* crecidas en luz, muestra que el SA de muchos genes cuyos patrones de *splicing* están regulados por fitocromos durante la desetiación, se regula por luz R de manera independiente de los fitocromos en plantas crecidas en ciclos de luz (Figura suplementaria S3). Si bien no podemos descartar la posibilidad de que algunas de estas diferencias se deban a detalles particulares de cada diseño experimental, como la intensidad o duración de la luz, es probable que el panorama de *splicing* en un momento dado sea el resultado de interacciones complejas entre múltiples vías de señalización lumínica, incluidas aquellas asociadas con fitocromos, criptocromos y señales derivadas de la fotosíntesis, que actúan para regular el SA de forma dependiente del contexto de desarrollo.

En conclusión, evaluamos la contribución relativa de los fotorreceptores fotosintéticos y fotosensoriales al control del SA en plantas crecidas en ciclos de luz. Descubrimos que los fitocromos son necesarios para el correcto *splicing* alternativo de tan solo una fracción de los eventos regulados por luz R, lo cual indicaría que la mayoría pueden ser controlados por fotorreceptores fotosintéticos en plantas crecidas en luz. Se requieren estudios más detallados para cuantificar la contribución relativa de los diferentes fotorreceptores a la regulación del SA en diferentes etapas del desarrollo, así como más estudios que aborden el papel de los diferentes reguladores del *splicing* en el control del SA por la luz. De esta manera, obtendríamos un marco más integrado que nos permitirá comprender completamente los mecanismos subyacentes al SA regulado por luz y sus implicaciones biológicas.

SA de genes activadores del reloj en respuesta a la temperatura: ¿regulación de la expresión o diversificación del proteoma?

La temperatura es otra señal externa esencial para el crecimiento y adaptación al ambiente de las plantas. Las fluctuaciones térmicas influyen en procesos como la germinación, el tiempo de floración y la dormición de semillas (206, 207). Existe una clara relación entre el reloj circadiano de las plantas y su percepción y respuesta a la temperatura, aunque los mecanismos subyacentes aún no se comprenden del todo.

Frente a un rango fisiológico de temperaturas (16°C-28°C), predominan fenómenos como el entrenamiento termoperiódico y la compensación térmica, que aseguran una función circadiana estable en los ciclos día-noche y a lo largo de las estaciones (209). Sin embargo, las temperaturas consideradas extremas, por debajo o arriba del rango normal, representan un factor de estrés para la planta que activa diversas vías de respuesta promoviendo la expresión de genes de tolerancia, muchas de las cuales están reguladas por el reloj (210). Curiosamente, se ha demostrado que los genes implicados en las respuestas al estrés tienen más probabilidades de sufrir SA (211). Se han documentado múltiples casos de SA bajo diferentes condiciones de temperatura, tanto para componentes del oscilador central como para factores de *splicing* y de respuesta a estrés abiótico (107, 211). Todo esto sugiere que el SA es un mecanismo central de respuesta al estrés en las plantas, garantizando flexibilidad fisiológica y mediando la integración de varios estímulos ambientales. Aun así, los principios que gobiernan estas redes siguen siendo una incógnita.

En la segunda parte de este trabajo, investigamos el rol del SA en miembros clave de dos familias de activadores y co-activadores del reloj circadiano: *RVE8* y *LNK1*. A través de la secuenciación de nueva generación (NGS) de plantas WT expuestas a distintas temperaturas, identificamos y cuantificamos la ocurrencia de eventos de SA específicos asociados a cambios ambientales para dichos genes (Fig. 16 y 17). Encontramos que bajo condiciones de bajas temperaturas ambientales (12°C), se reportaba un mayor uso de sitios de *splicing* alternativos en los eventos analizados (3'alt ss, *RVE8*, EE, *LNK1*), mientras que a mayores temperaturas ambiente aumentaba el uso de sitios canónicos. Estos resultados nos llevaron a explorar el destino de los transcritos alternativos de *splicing* involucrados.

Existen dos vías principales para los ARN mensajeros producto de SA: la síntesis de proteínas en el citoplasma o, en presencia de un codón de terminación prematuro (PTC), las vías de degradación *non mediated decay* (NMD) (213). El resultado de la primera vía es la expansión del proteoma y la diversificación funcional mediante la creación de isoformas proteicas distintas, como es el caso de los genes circadianos *CCA1*, *LHY*, *PRR7*, *PRR9* y *ZTL* (199,200). Por otro lado, la vía NMD, se considera una forma de controlar la expresión génica y eliminar los transcritos de ARNm improductivos. Algunos ejemplos de ello son las variantes SA de ARN de *TOC1* y *ELF3* (200). En plantas, la evidencia sugiere que los ARNm que contienen PTCs pero son insensibles a la vía NMD, desempeñan un

papel importante en la adaptación del transcriptoma a las demandas del desarrollo y/o en las respuestas a estreses ambientales (102,199). En el presente estudio, evaluamos los roles fisiológicos de las isoformas generadas por la selección de un sitio 3' alternativo de *RVE8* bajo diferentes condiciones de crecimiento. Mediante la caracterización de plantas sobreexpresando las variantes de ARNm específicas producto del SA en un fondo mutante *rve468*, observamos que la isoforma alternativa (RVE8-AS) posee un rol activo en la función circadiana a temperatura óptima (Fig. 20a). Previamente se reportó un periodo circadiano de libre curso significativamente alargado en la triple mutante *rve* (32), que se restaura parcialmente en nuestras líneas transgénicas sobreexpresando ambas isoformas. El rescate parcial y no total del periodo WT es consistente con la ausencia de RVE4 y RVE6, los homólogos más cercanos de RVE8 que promueven el ritmo del reloj de manera parcialmente redundante (37). Por otro lado, se ha descrito un fenotipo de sobreexpresión de *RVE8* en background WT, que provoca un acortamiento sutil (~1h) de los ritmos en condiciones de luz continua (28). Este no fue detectado en nuestras líneas complementadas en fondo mutante *rve468*. Posiblemente, los niveles elevados de *RVE8* no logran maximizar su efecto debido a la falta de los otros componentes *RVE* con función en el reloj, sugiriendo que la redundancia sería incompleta.

El tiempo de floración en plantas crecidas bajo ciclos de 12 h de luz/ 12 h de oscuridad mostró una reversión parcial del fenotipo similar entre las líneas sobreexpresando ambas isoformas de *splicing*, lo cual sugiere un papel de RVE8-AS en este proceso dependiente del fotoperiodo. Nuestro laboratorio reportó previamente que las mutantes dobles *Ink12* y *InkQ* florecen más tarde que plantas WT bajo fotoperiodos de día largo (16/8; 12/12)(126). LNK1 y LNK2 codifican coactivadores transcripcionales que trabajan con las proteínas RVE para controlar la expresión de genes del reloj y también son regulados por luz (29,52). En ensayos realizados comparando mutantes de los genes *LNK* y la triple mutante *rve*, detectamos un leve retraso relativo a WT en la floración por parte de esta última en condiciones de LD y un retraso significativo y de mayor magnitud por parte de las mutantes *Ink12* y *InkQ* respecto a WT y a *rve468* en LD y LL. En SD no se detectaron diferencias en ningún caso (Figura suplementaria S9). Aunque ambas familias de genes intervienen en las vías de floración de manera dependiente de la duración del día, los genes *RVE* muestran un rol más modesto que los genes *LNK1* y *LNK2*. Cabe aclarar que, en otros *outputs* controlados por el reloj, se han demostrado funciones antagónicas de

las proteínas LNK (31,38). Por lo tanto, las relaciones entre los FT tipo MYB y LNK1/2 son complejas y los fenotipos mutantes difíciles de predecir.

Otra función asociada a RVE4, RVE6 y RV8 es la regulación del crecimiento en distintos estadios de desarrollo de la planta dependiente del fotoperiodo. Los hipocotilos de la mutante *rve468* se caracterizan por un crecimiento exacerbado que varía según la intensidad y las horas de luz (32). Este fenotipo se revierte de forma parcial en las líneas expresando la isoforma RVE8-AS en condiciones de luz blanca continua (LL) (Fig. 20d) y LD, pero no muestra diferencias con la triple mutante *rve* bajo ciclos de SD (Fig. 21). Mientras que, en LD y LL, los factores de crecimiento PIF4 y PIF5 son los principales responsables del fenotipo de crecimiento observado en *rve468* (32), el mecanismo que gobierna este proceso en SD es otro. Las proteínas PIF1 y PIF3 han sido implicadas en la promoción de la elongación del hipocotilo en condiciones de día corto (213, 214). A su vez, TOC1 co-regula la expresión de genes relacionados con el crecimiento junto con PIF3 en plantas crecidas en SD, inhibiendo la actividad de transactivación de las proteínas PIF en los promotores de genes target durante las primeras horas de la noche (62). Posiblemente, en las líneas expresando la isoforma RVE8-AS en SD, se produce una modificación en la fase de acumulación de TOC1, de modo que no ocurre la inhibición normal de la actividad promotora de PIF durante el anochecer.

Las líneas RVE8-FL, por su parte, mostraron longitudes de hipocotilos menores que WT en todos los fotoperiodos testeados. Se ha demostrado que la sobreexpresión de RVE8 produce el acortamiento de los hipocotilos a baja intensidad de luz continua (28). La expresión de *PRR5* y *TOC1*, dos represores conocidos de la expresión de *PIF4* y *PIF5* (20, 215), es regulada positivamente de forma directa por RVE8 (28,37). De manera que, los mayores niveles de RVE8 funcional contribuirían a la inhibición de *PIF4* y *PIF5* durante la noche dando como resultado un crecimiento reducido. En conjunto, estos resultados sugieren que RVE8-FL reprime el crecimiento de los hipocotilos de manera más eficaz que la isoforma RVE8-AS, y, por lo tanto, esta última posee un rol menor en el crecimiento en estadio de plántula. La inhibición parcial del crecimiento por parte de las líneas RVE8-AS en LD y LL, a pesar de estar bajo el control de un promotor constitutivo, refuerza esta conclusión. Se requieren análisis más detallados de las líneas sobreexpresantes de RVE8-FL/AS, que incluyan los niveles de expresión de los genes target que regulan los factores de crecimiento responsables de los fenotipos observados y de los factores de crecimiento

en sí mismos bajo diferentes fotoperiodos, para comprender mejor los mecanismos detrás de este comportamiento diferencial.

Al analizar cómo afectan los cambios de temperatura moderados al ritmo del reloj y a la inhibición del crecimiento de los hipocotilos por luz en nuestras líneas, no observamos patrones claros entre las isoformas que den cuenta de una función diferenciada de las mismas. Las bajas temperaturas consideradas estresantes ($>10^{\circ}\text{C}$) para la planta, provocan una reducción de la amplitud en las oscilaciones de los componentes centrales del reloj y amortiguan o interrumpen las oscilaciones de los *outputs*, mientras que en luz continua todos los ciclos se vuelven arrítmicos (217). Por este motivo, las mediciones del periodo circadiano se realizaron a 16°C , donde, si bien el movimiento de hojas se ve alterado con una menor amplitud en los ciclos y un periodo ligeramente alargado respecto a las mediciones a 22°C (Fig. 21b), mantiene cierta ritmicidad y picos de expresión similares. La restauración de un ciclo de ~ 24 h en las líneas RVE8-FL/AS es menos obvia que en condiciones normales de temperatura, sin embargo, al menos una línea independiente de cada isoforma revierte el periodo alargado de *rve468* a un periodo cercano a WT (Figura suplementaria S12a). El comportamiento similar por parte de ambas isoformas, sugeriría que el *splicing* alternativo de RVE8 no desempeña un papel clave en la aclimatación a temperaturas frías moderadas. Esto es congruente con los patrones de *splicing* observados en las lecturas de secuenciación a 17°C .

El crecimiento de los hipocotilos a temperaturas ambiente cálidas (28°C) se vio mejorado en todas las líneas, con patrones similares a los observados a 22°C . A una intensidad de luz media ($10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$), las líneas RVE8-AS restauraron el fenotipo WT y las líneas RVE8-FL mostraron un fenotipo de sobreexpresión con hipocotilos más cortos que WT, sugiriendo una mayor eficacia de la proteína canónica en la regulación del crecimiento termomorfogénico (Fig. 22b, c). Se han descrito distintas vías que regulan las respuestas asociadas con este proceso en plántulas de *Arabidopsis* desetioldadas, muchas de las cuales involucran componentes del reloj (192). ELF3, un termosensor ampliamente caracterizado, es inactivado frente a temperaturas cálidas, dando como resultado una actividad reducida del EC, y, en consecuencia, un aumento del factor de crecimiento PIF4 (83). También se ha sugerido a ELF4 como un modulador de la termomorfogénesis, sin embargo, todavía no se comprenden los mecanismos que rigen su actividad. RVE8 promueve la expresión de *ELF4* (7), así como la de otros represores de las proteínas PIF

conocidos (20,216), con lo cual, una actividad reducida de este FT causada por modificaciones en la proteína alternativa podría contribuir a las diferencias detectadas.

En sentido opuesto, es decir, cuando baja la temperatura, los mismos mecanismos ocurren a la inversa y la actividad del EC incrementa, llevando a niveles más bajos de expresión de *PIF4* e inhibición del crecimiento. A 22°C, los hipocotilos de la triple mutante *rve468* son más alargados en relación a WT en luz continua o LD (Fig. 20d; Fig. 21a). La expresión de genes represores tales como *PRR5*, *TOC1* y *ELF4*, se ve reducida en ausencia de las proteínas RVE, lo cual regula de manera positiva el crecimiento. Sorpresivamente, a 16°C, los hipocotilos de la triple mutante *rve* mostraron longitudes menores en comparación con WT en LD (Fig. 22a, b). Recientemente, se encontraron funciones en la regulación del crecimiento de los hipocotilos a temperaturas cálidas para los genes *RVE5* y *RVE7* (197,198). Probablemente, el fenotipo observado a bajas temperaturas de *rve468* esté relacionado con un efecto aditivo de la activación de *ELF3*, la desregulación de los ritmos y la interacción de otros componentes con funciones menores en el reloj como *RVE5* y *RVE7*, que regulan *PIF4* y *PF5* de forma indirecta a través del control de *ELF4*. Futuros estudios deberían considerar la influencia de las vías de respuesta hormonal, como la biosíntesis de auxinas, junto con la regulación circadiana para abarcar mejor la complejidad de este proceso.

Recientemente, se reportó que *RVE4* y *RVE8* se transfieren de manera reversible al núcleo y activan la expresión de los genes *DREB1*, uniéndose al elemento *cis* activo (EE) de su promotor, en respuesta a una disminución de la temperatura por debajo de 10°C (91). Nuestros análisis de inmunotransferencia utilizando líneas de expresión endógena revelaron que la isoforma alternativa de *RVE8* muestra un patrón circadiano de acumulación en condiciones normales de temperatura, con un retraso sutil del pico de expresión (ZT6) respecto a la isoforma canónica (ZT3). Demostramos que a las 3 horas de exposición a estrés por frío (8°C), ambas variantes se acumulan y mantienen sus niveles elevados a lo largo del día (Fig. 23b-e). Sin embargo, al observar la localización de las respectivas proteínas, detectamos una distribución preferencial en el núcleo de *RVE8-FL* bajo condiciones de estrés por frío, mientras que *RVE8-AS* estaba presente en el citoplasma y en el núcleo, y no se evidenció tanta translocación nuclear en respuesta al frío (Fig. 29). Adicionalmente, al analizar la expresión de *DREB1A* a bajas temperaturas (8°C) en una serie temporal, encontramos que los niveles aumentan significativamente a las 3 horas de tratamiento (ZT3) en las líneas expresando ambas isoformas, no obstante,

la línea RVE8-FL muestra una magnitud notablemente mayor en la inducción (Fig. 25d). Estos resultados indicarían una regulación menos eficiente en la expresión de genes target específicos de respuesta al frío por parte de la isoforma alternativa, con niveles menores que WT en ZT3. Esta diferencia en la magnitud de la inducción manifestada en la línea canónica (B'5) respecto a la alternativa (A'5) podría estar relacionada, en parte, con los niveles de expresión basales (Fig. 19d, j).

Al comparar la expresión circadiana de los transcritos de *RVE8* en condiciones normales de temperatura, detectamos el mismo retraso en el pico de expresión entre las líneas observado en los análisis de acumulación de la proteína (Fig. 24a). En WT los niveles muestran un pico máximo en ZT0 y van disminuyendo a lo largo del día (Fig. 24b), en cambio, la expresión en las líneas transgénicas RVE8-FL/AS es baja durante las primeras horas y aumenta hacia el ZT6. Estos cambios en la fase podrían estar relacionados con una desregulación del reloj asociado a la ausencia de RVE4 y RVE6 o bien con la estabilidad del ARNm de los transgenes. Frente a estrés por frío, los niveles de expresión de *RVE8* en ambas líneas muestran una respuesta similar a WT con un aumento en la expresión que alcanza un máximo a las 6 horas de tratamiento (Fig. 24a, c). RVE8-FL, por su parte, muestra una activación más rápida y pronunciada en ZT3, mientras que RVE8-AS exhibe una inducción más moderada y progresiva a lo largo del tiempo. Estas diferencias en la sensibilidad al tratamiento y, por lo tanto, abundancia de RVE8 durante las primeras horas de exposición al frío, podrían explicar en parte la regulación diferencial de *DREB1A* observada entre las isoformas.

Los genes *PRR5* y *TOC1* son regulados por el reloj circadiano, particularmente RVE8 promueve su expresión hacia el final del día, pero también son inducidos por estrés térmico (95). La expresión relativa de *PRR5* en las líneas complementadas con ambas isoformas mostró un patrón circadiano similar a WT y opuesto al de la triple mutante *rve*, de acuerdo con lo reportado para este gen (17). En contraste, la expresión de *TOC1* presentó alteraciones, con una inducción temprana a las 3 h de encendido de las luces, que indicaría un cambio de fase. Las modificaciones en los perfiles de expresión de genes nocturnos (*TOC1*, *ELF4*) podrían atribuirse a los cambios en el pico de expresión de RVE8-FL/AS detectados en las líneas. En respuesta al estrés por frío, ambos genes aumentaron su expresión (Fig. 25a, b). *PRR5* incremento sus niveles drásticamente en las primeras horas (ZT3) y luego disminuyó. En cambio, *TOC1* mostró un aumento más moderado que se mantuvo hacia el ZT6. En estudios anteriores se demostró que la sobreexpresión de

PRR5 eleva la tolerancia a estreses abióticos, entre ellos el frío, a través de la regulación positiva de genes target directos (*DREB1s*) y de sus genes río abajo (218,219). Nuestros datos comprueban que la isoforma alternativa de RVE8 puede ser funcional en el sistema circadiano y conserva la respuesta frente a estrés térmico, pero en un menor grado que la proteína canónica. Por un lado, esto podría implicar que la variante alternativa funcione principalmente como un mecanismo de regulación de la expresión, y, en ausencia de RVE8 endógeno, podría reemplazar condicionalmente la actividad de la proteína canónica con una eficiencia reducida, o bien, que la isoforma RVE8-AS compite con la proteína canónica RVE8-FL por la unión a los promotores de los genes diana atenuando la intensidad de la respuesta frente a estreses ambientales.

Por último, a través del modelado predictivo de estructuras proteicas revelamos que la isoforma alternativa RVE8-AS presenta una alteración en el extremo C-terminal que afecta la conformación del dominio LHY-/CCA1-LIKE (LCL) de la proteína, característico de los miembros de la familia RVE (Fig. 26b). Mientras que el dominio MYB, presente en el N-terminal, proporciona la especificidad de unión al ADN, el dominio LCL recluta los componentes del reloj, específicamente las proteínas LNK, para dirigirse a los promotores de genes diana (33). Estas últimas, funcionan como co-activadores de las proteínas RVE en la regulación del reloj bajo condiciones normales de temperatura y en las vías de respuesta al estrés térmico (95,195). Nuestro análisis de la estructura proteica de la isoforma de LNK1 producto de un evento de *splicing* alternativo (EE) regulado por temperatura, demostró que el extremo extra N-terminal (ENT) sufre una modificación en la longitud, perdiendo un número sustancial de aminoácidos (Fig. 27). El dominio ENT, presente solo en LNK1 y LNK2, es necesario para la co-represión de C4H mediada por LNK1 y MYB3 (38). También podría ser responsable del papel represor de LNK1 en la expresión de genes estructurales de antocianina, donde actúa de manera antagónica a la función activadora de RVE8 (31). Por otro lado, las regiones R1 y R2 ubicadas en el C-terminal de la isoforma proteica no se vieron afectados. Las interacciones proteína-proteína están circunscriptas a estos motivos conservados que contienen arginina/asparagina, comunes a todos los miembros de la familia LNK (30). Estos hallazgos nos llevaron a explorar las interacciones entre las distintas isoformas de *splicing* de RVE8 y LNK1, empleando un sistema de doble híbrido en levadura (Fig. 28). Paradójicamente, encontramos que la isoforma RVE8-AS, a pesar de mostrar alteraciones en el dominio LCL, es capaz de interactuar con la isoforma canónica de LNK1, lo cual

explicaría el grado de funcionalidad exhibido por la misma en procesos regulados por el reloj. La isoforma LNK1-AS, por el contrario, no reportó interacción con ninguna variante de RVE8, a pesar de conservar la región C-terminal intacta, lo cual sugiere un rol presumiblemente regulatorio. Para aclarar este interrogante, sería interesante caracterizar fenotípica y fisiológicamente las líneas expresando las distintas variantes de LNK1, confeccionadas durante esta investigación, que por cuestiones de tiempo no fueron analizadas. Además, estudios de purificación por afinidad acoplada a espectrometría de masas (AP-MS) o secuenciación por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-seq) en las líneas expresando las isoformas de RVE8 y LNK1 aportarían información valiosa sobre posibles interactores novedosos que, en última instancia, ayuden a desentrañar el mecanismo regulador del *splicing* en las vías de señalización circadiana y de temperatura.

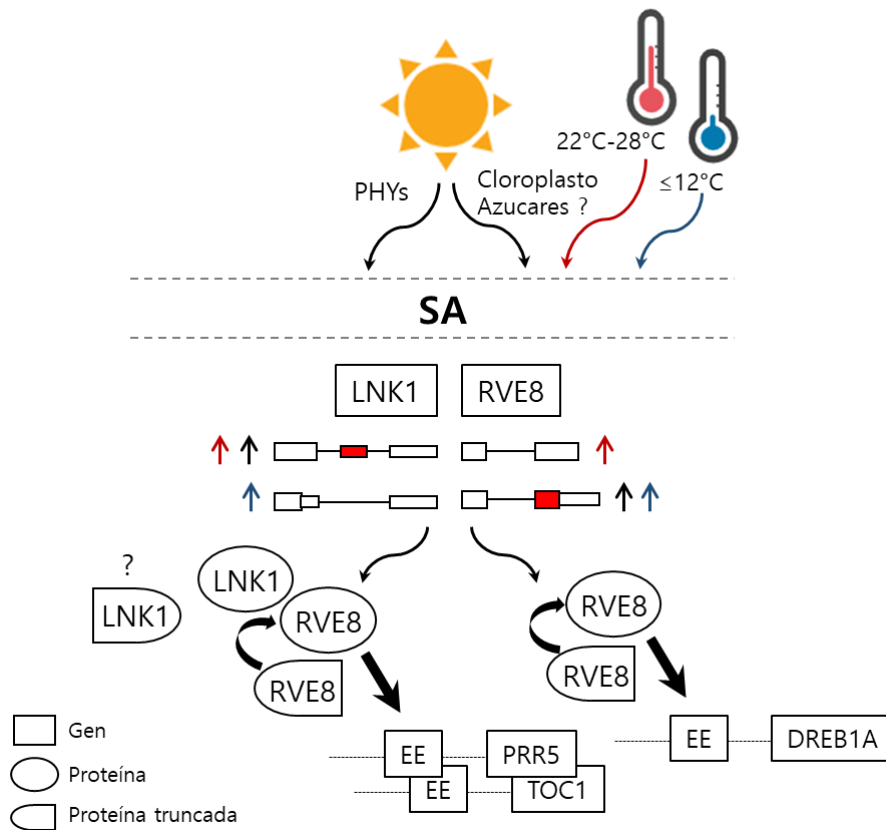


Fig. 30 El *splicing* alternativo de genes centrales del reloj es regulado por señales ambientales. Modelo esquemático que ilustra cómo la luz regula los patrones de SA a través de los fitocromos (PHY), en el caso de *LNK1*, o de forma independiente de PHYs, como ocurre con *RVE8*. Como resultado, se altera la proporción de los transcritos, lo cual a su vez afecta la expresión de genes río abajo. La temperatura también tiene un papel en la regulación del SA de genes circadianos. Mientras que a temperaturas cálidas predominan las isoformas canónicas de los genes indicados, a bajas temperaturas, incrementan los niveles de las isoformas alternativas que parecerían funcionar como auto-reguladores de la expresión. Las flechas indican qué isoforma aumenta según la condición: luz (negras), temperaturas cálidas (rojas) y temperaturas bajas (azules). Los exones se representan como cajas, los intrones como líneas y las regiones alternativas se resaltan en rojo.

En resumen, caracterizamos a nivel fisiológico y molecular isoformas de SA específicas del gen circadiano *RVE8*, cuya expresión es regulada por cambios ambientales. Encontramos que la isoforma alternativa (RVE8-AS), producto de un evento 3'alt ss, es capaz de restaurar parcialmente el fenotipo WT en procesos asociados al reloj y la respuesta al estrés por frío, es decir, que posee cierto grado de funcionalidad en el sistema circadiano. Además, revelamos que a partir de este evento de SA se produce una proteína truncada que alberga un dominio estructuralmente afectado, aunque esto no interviene en su capacidad de interacción con el co-activador LNK1. Este último también sufre SA regulado por señales ambientales pero sus implicancias funcionales se desconocen. Los resultados obtenidos en este estudio, refuerzan la evidencia de que el *splicing* alternativo de los genes del reloj, ya sea mediante la producción de isoformas truncadas que actúan como auto-reguladores o mediante la modulación de la abundancia de transcritos FL a nivel postranscripcional, contribuye al control preciso de la función del reloj, particularmente en condiciones ambientales fluctuantes. También podría servir como una red que integra las señales de estrés ambiental en el reloj, proporcionando una estrategia de adaptación en respuesta a cambios ambientales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wijnen H, Young MW. Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms. *Annu Rev Genet.* 2006;40:409-48.
2. Más P. Circadian clock function in *Arabidopsis thaliana*: time beyond transcription. *Trends in Cell Biology.* junio de 2008;18(6):273-81.
3. McClung CR. Plant Circadian Rhythms. *Plant Cell.* abril de 2006;18(4):792-803.
4. Harmer SL. The Circadian System in Higher Plants. *Annu Rev Plant Biol.* 1 de junio de 2009;60(1):357-77.
5. Mas P. Circadian clock signaling in *Arabidopsis thaliana*: from gene expression to physiology and development. *Int J Dev Biol.* 2005;49(5-6):491-500.
6. Greenham K, McClung CR. Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nat Rev Genet.* octubre de 2015;16(10):598-610.
7. Nohales MA, Kay SA. Molecular mechanisms at the core of the plant circadian oscillator. *Nat Struct Mol Biol.* diciembre de 2016;23(12):1061-9.
8. Barak S, Tobin EM, Green RM, Andronis C, Sugano S. All in good time: the *Arabidopsis* circadian clock. *Trends in Plant Science.* diciembre de 2000;5(12):517-22.
9. Alabadi D, Oyama T, Yanovsky MJ, Harmon FG, Más P, Kay SA. Reciprocal Regulation Between *TOC1* and *LHY/CCA1* Within the *Arabidopsis* Circadian Clock. *Science.* 3 de agosto de 2001;293(5531):880-3.
10. Schaffer R, Ramsay N, Samach A, Corden S, Putterill J, Carré IA, et al. The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell.* 1998;93(7):1219-29.
11. Yakir E, Hilman D, Kron I, Hassidim M, Melamed-Book N, Green RM. Posttranslational Regulation of *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1* in the Circadian Oscillator of *Arabidopsis*. *Plant Physiology.* 1 de junio de 2009;150(2):844-57.
12. Kamioka M, Takao S, Suzuki T, Taki K, Higashiyama T, Kinoshita T, et al. Direct Repression of Evening Genes by *CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1* in the *Arabidopsis* Circadian Clock. *The Plant Cell.* 1 de marzo de 2016;28(3):696-711.
13. Nagel DH, Doherty CJ, Pruneda-Paz JL, Schmitz RJ, Ecker JR, Kay SA. Genome-wide identification of *CCA1* targets uncovers an expanded clock network in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 25 de agosto de 2015;112(34):E4802-10.
14. Wang ZY, Tobin EM. Constitutive Expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (*CCA1*) Gene Disrupts Circadian Rhythms and Suppresses Its Own Expression. *Cell.* 26 de junio de 1998;93(7):1207-17.
15. Adams S, Manfield I, Stockley P, Carré IA. Revised Morning Loops of the *Arabidopsis* Circadian Clock Based on Analyses of Direct Regulatory Interactions. *PLOS ONE.* 1 de diciembre de 2015;10(12):e0143943.
16. Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Más P, et al. Cloning of the *Arabidopsis* Clock Gene *TOC1*, an Autoregulatory Response Regulator Homolog. *Science.* 4 de agosto de 2000;289(5480):768-71.
17. Kamioka M, Takao S, Suzuki T, Taki K, Higashiyama T, Kinoshita T, et al. Direct Repression of Evening Genes by *CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1* in the *Arabidopsis* Circadian Clock. *The Plant Cell.* 1 de marzo de 2016;28(3):696-711.

18. Nakamichi N, Kiba T, Henriques R, Mizuno T, Chua NH, Sakakibara H. PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 Are Transcriptional Repressors in the Arabidopsis Circadian Clock. *The Plant Cell*. 1 de marzo de 2010;22(3):594-605.
19. Huang W, Pérez-García P, Pokhilko A, Millar AJ, Antoshechkin I, Riechmann JL, et al. Mapping the core of the Arabidopsis circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science*. 2012;336(6077):75-9.
20. Nakamichi N, Kiba T, Kamioka M, Suzuki T, Yamashino T, Higashiyama T, et al. Transcriptional repressor PRR5 directly regulates clock-output pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 16 de octubre de 2012;109(42):17123-8.
21. Nusinow DA, Helfer A, Hamilton EE, King JJ, Imaizumi T, Schultz TF, et al. The ELF4-ELF3-LUX Complex Links the Circadian Clock to Diurnal Control of Hypocotyl Growth. *Nature*. 13 de julio de 2011;475(7356):398-402.
22. Herrero E, Kolmos E, Bujdoso N, Yuan Y, Wang M, Berns MC, et al. EARLY FLOWERING4 Recruitment of EARLY FLOWERING3 in the Nucleus Sustains the Arabidopsis Circadian Clock. *The Plant Cell*. 1 de febrero de 2012;24(2):428-43.
23. Mizuno T, Nomoto Y, Oka H, Kitayama M, Takeuchi A, Tsubouchi M, et al. Ambient Temperature Signal Feeds into the Circadian Clock Transcriptional Circuitry Through the EC Night-Time Repressor in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*. 1 de mayo de 2014;55(5):958-76.
24. Chow BY, Helfer A, Nusinow DA, Kay SA. ELF3 recruitment to the PRR9 promoter requires other Evening Complex members in the Arabidopsis circadian clock. *Plant Signaling & Behavior*. 1 de febrero de 2012;7(2):170-3.
25. Helfer A, Nusinow DA, Chow BY, Gehrke AR, Bulyk ML, Kay SA. LUX ARRHYTHMO Encodes a Nighttime Repressor of Circadian Gene Expression in the Arabidopsis Core Clock. *Current Biology*. 25 de enero de 2011;21(2):126-33.
26. Lu SX, Webb CJ, Knowles SM, Kim SHJ, Wang Z, Tobin EM. CCA1 and ELF3 Interact in the Control of Hypocotyl Length and Flowering Time in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 1 de febrero de 2012;158(2):1079-88.
27. Shalit-Kaneh A, Kumimoto RW, Filkov V, Harmer SL. Multiple feedback loops of the Arabidopsis circadian clock provide rhythmic robustness across environmental conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 3 de julio de 2018;115(27):7147-52.
28. Rawat R, Takahashi N, Hsu PY, Jones MA, Schwartz J, Salemi MR, et al. REVEILLE8 and PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 Form a Negative Feedback Loop within the Arabidopsis Circadian Clock. Copenhaver GP, editor. *PLoS Genet*. 31 de marzo de 2011;7(3):e1001350.
29. Rugnone ML, Faigón Soverna A, Sanchez SE, Schlaen RG, Hernando CE, Seymour DK, et al. LNK genes integrate light and clock signaling networks at the core of the Arabidopsis oscillator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 16 de julio de 2013;110(29):12120-5.
30. Xie Q, Wang P, Liu X, Yuan L, Wang L, Zhang C, et al. LNK1 and LNK2 Are Transcriptional Coactivators in the Arabidopsis Circadian Oscillator. *The Plant Cell*. 1 de julio de 2014;26(7):2843-57.
31. Pérez-García P, Ma Y, Yanovsky MJ, Mas P. Time-dependent sequestration of RVE8 by LNK proteins shapes the diurnal oscillation of anthocyanin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 21 de abril de 2015;112(16):5249-53.
32. Gray JA, Shalit-Kaneh A, Chu DN, Hsu PY, Harmer SL. The REVEILLE Clock Genes Inhibit Growth of Juvenile and Adult Plants by Control of Cell Size. *Plant Physiology*. 1 de abril de 2017;173(4):2308-22.

33. Ma Y, Gil S, Grasser KD, Mas P. Targeted Recruitment of the Basal Transcriptional Machinery by LNK Clock Components Controls the Circadian Rhythms of Nascent RNAs in Arabidopsis. *Plant Cell*. abril de 2018;30(4):907-24.
34. Liu TL, Newton L, Liu MJ, Shiu SH, Farré EM. A G-Box-Like Motif Is Necessary for Transcriptional Regulation by Circadian Pseudo-Response Regulators in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 1 de enero de 2016;170(1):528-39.
35. Farinas B, Mas P. Functional implication of the MYB transcription factor RVE8/LCL5 in the circadian control of histone acetylation. *The Plant Journal*. 2011;66(2):318-29.
36. Huang H, Nusinow DA. Into the evening: Complex interactions in the Arabidopsis circadian clock. *Trends in Genetics*. 2016;32(10):674-86.
37. Hsu PY, Devisetty UK, Harmer SL. Accurate timekeeping is controlled by a cycling activator in Arabidopsis. *Elife*. 2013;2:e00473.
38. Zhou M, Zhang K, Sun Z, Yan M, Chen C, Zhang X, et al. LNK1 and LNK2 Corepressors Interact with the MYB3 Transcription Factor in Phenylpropanoid Biosynthesis1. *Plant Physiol*. julio de 2017;174(3):1348-58.
39. Michael TP, McClung CR. Enhancer Trapping Reveals Widespread Circadian Clock Transcriptional Control in Arabidopsis. *Plant Physiol*. junio de 2003;132(2):629-39.
40. Romanowski A, Yanovsky MJ. Circadian rhythms and post-transcriptional regulation in higher plants. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2015 [citado 13 de febrero de 2023];6. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00437>
41. Mateos JL, De Leone MJ, Torchio J, Reichel M, Staiger D. Beyond transcription: fine-tuning of circadian timekeeping by post-transcriptional regulation. *Genes*. 2018;9(12):616.
42. Nolte C, Staiger D. RNA around the clock. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2015 [citado 13 de febrero de 2023];6. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00311>
43. Romanowski A, Schlaen RG, Perez-Santangelo S, Mancini E, Yanovsky MJ. Global transcriptome analysis reveals circadian control of splicing events in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*. 2020;103(2):889-902.
44. Koncz C, deJong F, Villacorta N, Szakonyi D, Koncz Z. The Spliceosome-Activating Complex: Molecular Mechanisms Underlying the Function of a Pleiotropic Regulator. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2012 [citado 13 de febrero de 2023];3. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2012.00009>
45. Will CL, Lührmann R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011;3(7):a003707.
46. Braunschweig U, Guerousov S, Plocik AM, Graveley BR, Blencowe BJ. Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways. *Cell*. 2013;152(6):1252-69.
47. Staiger D. Shaping the Arabidopsis transcriptome through alternative splicing. *Advances in Botany*. 2015;2015.
48. Nilsen TW, Graveley BR. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*. 28 de enero de 2010;463(7280):457-63.
49. Wang Z, Burge CB. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *Rna*. 2008;14(5):802-13.
50. Li S, Wang Y, Zhao Y, Zhao X, Chen X, Gong Z. Global Co-transcriptional Splicing in Arabidopsis and the Correlation with Splicing Regulation in Mature RNAs. *Molecular Plant*. 3 de febrero de 2020;13(2):266-77.

51. Zhu D, Mao F, Tian Y, Lin X, Gu L, Gu H, et al. The Features and Regulation of Co-transcriptional Splicing in Arabidopsis. *Molecular Plant*. 3 de febrero de 2020;13(2):278-94.
52. Mancini E, Sanchez SE, Romanowski A, Schlaen RG, Sanchez-Lamas M, Cerdán PD, et al. Acute Effects of Light on Alternative Splicing in Light-Grown Plants. *Photochemistry and Photobiology*. enero de 2016;92(1):126-33.
53. Nicholson P, Mühlemann O. Cutting the nonsense: the degradation of PTC-containing mRNAs. *Biochemical Society Transactions*. 2010;38(6):1615-20.
54. Isken O, Maquat LE. The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation. *Nat Rev Genet*. septiembre de 2008;9(9):699-712.
55. Kong SG, Okajima K. Diverse photoreceptors and light responses in plants. *J Plant Res*. 1 de marzo de 2016;129(2):111-4.
56. Oakenfull RJ, Davis SJ. Shining a light on the Arabidopsis circadian clock. *Plant, Cell & Environment*. 2017;40(11):2571-85.
57. Lerner VS, Franklin KA, Whitelam GC. Photoreceptors and light signalling pathways in plants. *Annu Plant Rev Endog Plant Rhythms*. 21(107):10-1002.
58. Viczián A, Klose C, Ádám É, Nagy F. New insights of red light-induced development. *Plant, Cell & Environment*. 2017;40(11):2457-68.
59. Seluzicki A, Burko Y, Chory J. Dancing in the dark: darkness as a signal in plants. *Plant, cell & environment*. 2017;40(11):2487-501.
60. Martínez-García JF, Huq E, Quail PH. Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science*. 2000;288(5467):859-63.
61. Nieto C, López-Salmerón V, Davière JM, Prat S. ELF3-PIF4 Interaction Regulates Plant Growth Independently of the Evening Complex. *Current Biology*. 19 de enero de 2015;25(2):187-93.
62. Soy J, Leivar P, González-Schain N, Martín G, Diaz C, Sentandreu M, et al. Molecular convergence of clock and photosensory pathways through PIF3-TOC1 interaction and co-occupancy of target promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 26 de abril de 2016;113(17):4870-5.
63. Zhu JY, Oh E, Wang T, Wang ZY. TOC1-PIF4 interaction mediates the circadian gating of thermoresponsive growth in Arabidopsis. *Nat Commun*. 14 de diciembre de 2016;7(1):13692.
64. Li G, Siddiqui H, Teng Y, Lin R, Wan X yuan, Li J, et al. Coordinated transcriptional regulation underlying the circadian clock in Arabidopsis. *Nature cell biology*. 2011;13(5):616-22.
65. Huang H, Nusinow DA. Into the evening: Complex interactions in the Arabidopsis circadian clock. *Trends in Genetics*. 2016;32(10):674-86.
66. Liu XL, Covington MF, Fankhauser C, Chory J, Wagner DR. ELF3 Encodes a Circadian Clock-Regulated Nuclear Protein That Functions in an Arabidopsis PHYB Signal Transduction Pathway. *Plant Cell*. junio de 2001;13(6):1293-304.
67. Yu JW, Rubio V, Lee NY, Bai S, Lee SY, Kim SS, et al. COP1 and ELF3 Control Circadian Function and Photoperiodic Flowering by Regulating GI Stability. *Molecular Cell*. 5 de diciembre de 2008;32(5):617-30.
68. Wang CQ, Sarmast MK, Jiang J, Dehesh K. The Transcriptional Regulator BBX19 Promotes Hypocotyl Growth by Facilitating COP1-Mediated EARLY FLOWERING3 Degradation in Arabidopsis. *Plant Cell*. abril de 2015;27(4):1128-39.
69. Más P, Kim WY, Somers DE, Kay SA. Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in Arabidopsis thaliana. *Nature*. 2003;426(6966):567-70.

70. Kim WY, Fujiwara S, Suh SS, Kim J, Kim Y, Han L, et al. ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature*. 2007;449(7160):356-60.
71. Kim J, Geng R, Gallenstein RA, Somers DE. The F-box protein ZEITLUPE controls stability and nucleocytoplasmic partitioning of GIGANTEA. *Development*. 1 de octubre de 2013;140(19):4060-9.
72. Liu B, Yang Z, Gomez A, Liu B, Lin C, Oka Y. Signaling mechanisms of plant cryptochromes in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Res*. marzo de 2016;129(2):137-48.
73. Kim JY, Song HR, Taylor BL, Carré IA. Light-regulated translation mediates gated induction of the *Arabidopsis* clock protein LHY. *The EMBO Journal*. 17 de febrero de 2003;22(4):935-44.
74. McClung CR, Davis SJ. Ambient Thermometers in Plants: From Physiological Outputs towards Mechanisms of Thermal Sensing. *Current Biology*. 21 de diciembre de 2010;20(24):R1086-92.
75. Boikoglou E, Ma Z, von Korff M, Davis AM, Nagy F, Davis SJ. Environmental Memory from a Circadian Oscillator: The *Arabidopsis thaliana* Clock Differentially Integrates Perception of Photic vs. Thermal Entrainment. *Genetics*. octubre de 2011;189(2):655-64.
76. Inoue K, Araki T, Endo M. Integration of Input Signals into the Gene Network in the Plant Circadian Clock. *Plant and Cell Physiology*. 1 de junio de 2017;58(6):977-82.
77. Delker C, van Zanten M, Quint M. Thermosensing enlightened. *Trends in Plant Science*. 2017;22(3):185-7.
78. Casal JJ, Qüesta JI. Light and temperature cues: multitasking receptors and transcriptional integrators. *New Phytologist*. 2018;217(3):1029-34.
79. Jung JH, Domijan M, Klose C, Biswas S, Ezer D, Gao M, et al. Phytochromes function as thermosensors in *Arabidopsis*. *Science*. 2016;354(6314):886-9.
80. Legris M, Klose C, Burgie ES, Rojas CCR, Neme M, Hiltbrunner A, et al. Phytochrome B integrates light and temperature signals in *Arabidopsis*. *Science*. 18 de noviembre de 2016;354(6314):897-900.
81. Paik I, Kathare PK, Kim JI, Huq E. Expanding Roles of PIFs in Signal Integration from Multiple Processes. *Molecular Plant*. 7 de agosto de 2017;10(8):1035-46.
82. Foreman J, Johansson H, Hornitschek P, Josse EM, Fankhauser C, Halliday KJ. Light receptor action is critical for maintaining plant biomass at warm ambient temperatures. *The Plant Journal*. 2011;65(3):441-52.
83. Box MS, Huang BE, Domijan M, Jaeger KE, Khattak AK, Yoo SJ, et al. ELF3 Controls Thermo-responsive Growth in *Arabidopsis*. *Current Biology*. 19 de enero de 2015;25(2):194-9.
84. Mizuno T, Kitayama M, Takayama C, Yamashino T. Insight into a Physiological Role for the EC Night-Time Repressor in the *Arabidopsis* Circadian Clock. *Plant and Cell Physiology*. 1 de septiembre de 2015;56(9):1738-47.
85. Ezer D, Jung JH, Lan H, Biswas S, Gregoire L, Box MS, et al. The Evening Complex coordinates environmental and endogenous signals in *Arabidopsis*. *Nat Plants*. 26 de junio de 2017;3:17087.
86. Chow BY, Sanchez SE, Breton G, Pruneda-Paz JL, Krogan NT, Kay SA. Transcriptional Regulation of LUX by CBF1 Mediates Cold Input to the Circadian Clock in *Arabidopsis*. *Current Biology*. 7 de julio de 2014;24(13):1518-24.
87. Kidokoro S, Maruyama K, Nakashima K, Imura Y, Narusaka Y, Shinwari ZK, et al. The Phytochrome-Interacting Factor PIF7 Negatively Regulates DREB1 Expression under Circadian Control in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 1 de diciembre de 2009;151(4):2046-57.
88. Lee CM, Thomashow MF. Photoperiodic regulation of the C-repeat binding factor (CBF) cold acclimation pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 11 de septiembre de 2012;109(37):15054-9.

89. Kinmonth-Schultz HA, Golembeski GS, Imaizumi T. Circadian clock-regulated physiological outputs: dynamic responses in nature. *Semin Cell Dev Biol.* mayo de 2013;24(5):407-13.
90. Li B, Gao Z, Liu X, Sun D, Tang W. Transcriptional Profiling Reveals a Time-of-Day-Specific Role of REVEILLE 4/8 in Regulating the First Wave of Heat Shock-Induced Gene Expression in Arabidopsis. *Plant Cell.* octubre de 2019;31(10):2353-69.
91. Kidokoro S, Hayashi K, Haraguchi H, Ishikawa T, Soma F, Konoura I, et al. Posttranslational regulation of multiple clock-related transcription factors triggers cold-inducible gene expression in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 9 de marzo de 2021;118(10):e2021048118.
92. Scharf KD, Berberich T, Ebersberger I, Nover L. The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms.* febrero de 2012;1819(2):104-19.
93. Kidokoro S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional regulatory network of plant cold-stress responses. *Trends in Plant Science.* 2022;
94. Sorkin ML, Tzeng SC, Romanowski A, Kahle N, Bindbeutel RK, Hiltbrunner A, et al. COR27/28 Regulate the Evening Transcriptional Activity of the RVE8 and LNK1/2 Circadian Complex. *bioRxiv.* 2022;2022-05.
95. Kidokoro S, Konoura I, Soma F, Suzuki T, Miyakawa T, Tanokura M, et al. Clock-regulated coactivators selectively control gene expression in response to different temperature stress conditions in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 18 de abril de 2023;120(16):e2216183120.
96. Meyer K, Koester T, Staiger D. Pre-mRNA splicing in plants: in vivo functions of RNA-binding proteins implicated in the splicing process. *Biomolecules.* 2015;5(3):1717-40.
97. Sanchez SE, Petrillo E, Beckwith EJ, Zhang X, Rugnone ML, Hernando CE, et al. A methyl transferase links the circadian clock to the regulation of alternative splicing. *Nature.* 2010;468(7320):112-6.
98. Hong S, Song HR, Lutz K, Kerstetter RA, Michael TP, McClung CR. Type II protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) is required for circadian period determination in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 7 de diciembre de 2010;107(49):21211-6.
99. Deng X, Gu L, Liu C, Lu T, Lu F, Lu Z, et al. Arginine methylation mediated by the Arabidopsis homolog of PRMT5 is essential for proper pre-mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2 de noviembre de 2010;107(44):19114-9.
100. Perez-Santángelo S, Mancini E, Francey LJ, Schlaen RG, Chernomoretz A, Hogenesch JB, et al. Role for LSM genes in the regulation of circadian rhythms. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 21 de octubre de 2014;111(42):15166-71.
101. Jones MA, Williams BA, McNicol J, Simpson CG, Brown JW, Harmer SL. Mutation of Arabidopsis spliceosomal timekeeper locus1 causes circadian clock defects. *The Plant Cell.* 2012;24(10):4066-82.
102. Staiger D, Brown JWS. Alternative Splicing at the Intersection of Biological Timing, Development, and Stress Responses. *The Plant Cell.* 1 de octubre de 2013;25(10):3640-56.
103. Lazar G, Goodman HM. The Arabidopsis splicing factor SR1 is regulated by alternative splicing. *Plant Mol Biol.* 1 de marzo de 2000;42(4):571-81.
104. Palusa SG, Ali GS, Reddy ASN. Alternative splicing of pre-mRNAs of Arabidopsis serine/arginine-rich proteins: regulation by hormones and stresses. *The Plant Journal.* marzo de 2007;49(6):1091-107.
105. Filichkin SA, Priest HD, Givan SA, Shen R, Bryant DW, Fox SE, et al. Genome-wide mapping of alternative splicing in Arabidopsis thaliana. *Genome research.* 2010;20(1):45-58.

106. Tanabe N, Yoshimura K, Kimura A, Yabuta Y, Shigeoka S. Differential Expression of Alternatively Spliced mRNAs of Arabidopsis SR Protein Homologs, atSR30 and atSR45a, in Response to Environmental Stress. *Plant and Cell Physiology*. 1 de julio de 2007;48(7):1036-49.
107. James AB, Syed NH, Bordage S, Marshall J, Nimmo GA, Jenkins GI, et al. Alternative splicing mediates responses of the Arabidopsis circadian clock to temperature changes. *The Plant Cell*. 2012;24(3):961-81.
108. James AB, Syed NH, Brown JWS, Nimmo HG. Thermoplasticity in the plant circadian clock: How plants tell the time-perature. *Plant Signaling & Behavior*. octubre de 2012;7(10):1219-23.
109. Filichkin SA, Cumbie JS, Dharmawardhana P, Jaiswal P, Chang JH, Palusa SG, et al. Environmental Stresses Modulate Abundance and Timing of Alternatively Spliced Circadian Transcripts in Arabidopsis. *Molecular Plant*. 2 de febrero de 2015;8(2):207-27.
110. Schlaen RG, Mancini E, Sanchez SE, Perez-Santángelo S, Rugnone ML, Simpson CG, et al. The spliceosome assembly factor GEMIN2 attenuates the effects of temperature on alternative splicing and circadian rhythms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(30):9382-7.
111. Gould PD, Locke JCW, Larue C, Southern MM, Davis SJ, Hanano S, et al. The Molecular Basis of Temperature Compensation in the Arabidopsis Circadian Clock. *Plant Cell*. mayo de 2006;18(5):1177-87.
112. Seo PJ, Park MJ, Lim MH, Kim SG, Lee M, Baldwin IT, et al. A Self-Regulatory Circuit of CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1 Underlies the Circadian Clock Regulation of Temperature Responses in Arabidopsis[W]. *Plant Cell*. junio de 2012;24(6):2427-42.
113. James AB, Calixto CP, Tzioutziou NA, Guo W, Zhang R, Simpson CG, et al. How does temperature affect splicing events? Isoform switching of splicing factors regulates splicing of LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY). *Plant, cell & environment*. 2018;41(7):1539-50.
114. Wang X, Wu F, Xie Q, Wang H, Wang Y, Yue Y, et al. SKIP Is a Component of the Spliceosome Linking Alternative Splicing and the Circadian Clock in Arabidopsis[W]. *Plant Cell*. agosto de 2012;24(8):3278-95.
115. Marshall CM, Tartaglio V, Duarte M, Harmon FG. The Arabidopsis sickle Mutant Exhibits Altered Circadian Clock Responses to Cool Temperatures and Temperature-Dependent Alternative Splicing. *Plant Cell*. octubre de 2016;28(10):2560-75.
116. Schöning JC, Streitner C, Page DR, Hennig S, Uchida K, Wolf E, et al. Auto-regulation of the circadian slave oscillator component AtGRP7 and regulation of its targets is impaired by a single RNA recognition motif point mutation. *The Plant Journal*. 2007;52(6):1119-30.
117. Schöning JC, Streitner C, Meyer IM, Gao Y, Staiger D. Reciprocal regulation of glycine-rich RNA-binding proteins via an interlocked feedback loop coupling alternative splicing to nonsense-mediated decay in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*. 1 de diciembre de 2008;36(22):6977-87.
118. Streitner C, Hennig L, Korneli C, Staiger D. Global transcript profiling of transgenic plants constitutively overexpressing the RNA-binding protein AtGRP7. *BMC Plant Biol*. 14 de octubre de 2010;10(1):221.
119. Streitner C, Köster T, Simpson CG, Shaw P, Danisman S, Brown JWS, et al. An hnRNP-like RNA-binding protein affects alternative splicing by in vivo interaction with transcripts in Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Research*. 1 de diciembre de 2012;40(22):11240-55.
120. Strasser B, Sánchez-Lamas M, Yanovsky MJ, Casal JJ, Cerdán PD. Arabidopsis thaliana life without phytochromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 9 de marzo de 2010;107(10):4776-81.

121. Sánchez-Lamas M, Lorenzo CD, Cerdán PD. Bottom-up Assembly of the Phytochrome Network. *PLOS Genetics*. 7 de noviembre de 2016;12(11):e1006413.
122. Reed JW, Nagatani A, Elich TD, Fagan M, Chory J. Phytochrome A and Phytochrome B Have Overlapping but Distinct Functions in Arabidopsis Development. *Plant Physiology*. 1 de abril de 1994;104(4):1139-49.
123. Reed JW, Nagpal P, Poole DS, Furuya M, Chory J. Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development. *The Plant Cell*. 1 de febrero de 1993;5(2):147-57.
124. Monte E, Alonso JM, Ecker JR, Zhang Y, Li X, Young J, et al. Isolation and Characterization of phyC Mutants in Arabidopsis Reveals Complex Crosstalk between Phytochrome Signaling Pathways. *The Plant Cell*. 2 de septiembre de 2003;15(9):1962-80.
125. Wollenberg AC, Strasser B, Cerdán PD, Amasino RM. Acceleration of Flowering during Shade Avoidance in Arabidopsis Alters the Balance between FLOWERING LOCUS C-Mediated Repression and Photoperiodic Induction of Flowering. *Plant Physiol*. 6 de noviembre de 2008;148(3):1681-94.
126. De Leone MJ, Hernando CE, Romanowski A, García-Hourquet M, Careno D, Casal J, et al. The LNK Gene Family: At the Crossroad between Light Signaling and the Circadian Clock. *Genes*. enero de 2019;10(1):2.
127. Murray MG, Thompson W. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*. 1980;8(19):4321-6.
128. Lamesch P, Berardini TZ, Li D, Swarbreck D, Wilks C, Sasidharan R, et al. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Research*. 1 de enero de 2012;40(D1):D1202-10.
129. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 1 de enero de 2013;29(1):15-21.
130. Ihaka R, Gentleman R. R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics [Internet]*. 1 de septiembre de 1996 [citado 17 de marzo de 2025]; Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10618600.1996.10474713>
131. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*. enero de 2011;29(1):24-6.
132. Mancini E, Rabinovich A, Iserte J, Yanovsky M, Chernomoretz A. ASpli: integrative analysis of splicing landscapes through RNA-Seq assays. *Bioinformatics*. 9 de septiembre de 2021;37(17):2609-16.
133. Anders S, Reyes A, Huber W. Detecting differential usage of exons from RNA-Seq data. *Nat Prec*. 4 de abril de 2012;1-1.
134. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 5 de diciembre de 2014;15(12):550.
135. Mockler TC, Michael TP, Priest HD, Shen R, Sullivan CM, Givan SA, et al. The DIURNAL project: DIURNAL and circadian expression profiling, model-based pattern matching, and promoter analysis. En: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2007. p. 353.
136. Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, et al. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal*. 2006;45(4):616-29.
137. Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The plant journal*. 1998;16(6):735-43.
138. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 1 de diciembre de 2001;25(4):402-8.

139. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nat Methods*. julio de 2012;9(7):671-5.
140. Koornneef M. Isolation of higher plant developmental mutants. En: *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 1991. p. 1-19.
141. Fido RJ, Tatham AS, Shewry PR. Western blotting analysis. *Plant gene transfer and expression protocols*. 1995;423-37.
142. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 26 de agosto de 2021;596(7873):583-9.
143. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*. 2004;25(13):1605-12.
144. Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*. 7 de enero de 2022;50(D1):D439-44.
145. Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, Fankhauser C. Chapter Two - Light-Regulated Plant Growth and Development. En: Timmermans MCP, editor. *Current Topics in Developmental Biology* [Internet]. Academic Press; 2010 [citado 14 de febrero de 2024]. p. 29-66. (Plant Development; vol. 91). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0070215310910028>
146. Casal JJ. Photoreceptor Signaling Networks in Plant Responses to Shade. *Annual Review of Plant Biology*. 2013;64(1):403-27.
147. Song YH, Shim JS, Kinmonth-Schultz HA, Imaizumi T. Photoperiodic Flowering: Time Measurement Mechanisms in Leaves. *Annual Review of Plant Biology*. 2015;66(1):441-64.
148. Schäfer E, Nagy F. Photomorphogenesis in Plants and Bacteria: Function and Signal Transduction Mechanisms. Springer Science & Business Media; 2006. 695 p.
149. Briggs WR. BLUE/UV-A RECEPTORS: HISTORICAL OVERVIEW. En: SCHÁFER E, NAGY F, editores. PHOTOMORPHOGENESIS IN PLANTS AND BACTERIA [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2006 [citado 14 de febrero de 2024]. p. 171-97. Disponible en: https://doi.org/10.1007/1-4020-3811-9_10
150. Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E, et al. Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 Protein. *Science*. abril de 2011;332(6025):103-6.
151. Galvão VC, Fankhauser C. Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps. *Current Opinion in Neurobiology*. 1 de octubre de 2015;34:46-53.
152. Casal JJ, Yanovsky MJ. Regulation of gene expression by light. *The International Journal of Developmental Biology*. 1 de agosto de 2005;49(5-6):501-11.
153. Franklin KA, Quail PH. Phytochrome functions in Arabidopsis development. *Journal of Experimental Botany*. 1 de enero de 2010;61(1):11-24.
154. Legris M, Ince YÇ, Fankhauser C. Molecular mechanisms underlying phytochrome-controlled morphogenesis in plants. *Nat Commun*. 19 de noviembre de 2019;10(1):5219.
155. Yeom M, Kim H, Lim J, Shin AY, Hong S, Kim JI, et al. How Do Phytochromes Transmit the Light Quality Information to the Circadian Clock in Arabidopsis? *Molecular Plant*. noviembre de 2014;7(11):1701-4.
156. Somers DE, Devlin PF, Kay SA. Phytochromes and Cryptochromes in the Entrainment of the Arabidopsis Circadian Clock. *Science*. 20 de noviembre de 1998;282(5393):1488-90.

157. Devlin PF, Kay SA. Cryptochromes Are Required for Phytochrome Signaling to the Circadian Clock but Not for Rhythmicity. *The Plant Cell*. 1 de diciembre de 2000;12(12):2499-509.
158. Halliday KJ, Salter MG, Thingnaes E, Whitelam GC. Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT. *The Plant Journal*. marzo de 2003;33(5):875-85.
159. Johnson E, Bradley M, Harberd NP, Whitelam GC. Photoresponses of Light-Grown phyA Mutants of Arabidopsis (Phytochrome A Is Required for the Perception of Daylength Extensions). *Plant Physiology*. 1 de mayo de 1994;105(1):141-9.
160. Wu SH. Gene Expression Regulation in Photomorphogenesis from the Perspective of the Central Dogma. *Annual Review of Plant Biology*. 2014;65(1):311-33.
161. Zhao Z, Dent C, Liang H, Lv J, Shang G, Liu Y, et al. CRY2 interacts with CIS1 to regulate thermosensory flowering via FLM alternative splicing. *Nat Commun*. 17 de noviembre de 2022;13(1):7045.
162. Shikata H, Hanada K, Ushijima T, Nakashima M, Suzuki Y, Matsushita T. Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 30 de diciembre de 2014;111(52):18781-6.
163. Xin R, Zhu L, Salomé PA, Mancini E, Marshall CM, Harmon FG, et al. SPF45-related splicing factor for phytochrome signaling promotes photomorphogenesis by regulating pre-mRNA splicing in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 15 de agosto de 2017;114(33):E7018-27.
164. Xin R, Kathare PK, Huq E. Coordinated Regulation of Pre-mRNA Splicing by the SFPS-RRC1 Complex to Promote Photomorphogenesis. *The Plant Cell*. 1 de septiembre de 2019;31(9):2052-69.
165. Kathare PK, Xin R, Ganesan AS, June VM, Reddy ASN, Huq E. SWAP1-SFPS-RRC1 splicing factor complex modulates pre-mRNA splicing to promote photomorphogenesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. noviembre de 2022;119(44):e2214565119.
166. Shikata H, Shibata M, Ushijima T, Nakashima M, Kong SG, Matsuoka K, et al. The RS domain of Arabidopsis splicing factor RRC1 is required for phytochrome B signal transduction. *The Plant Journal*. junio de 2012;70(5):727-38.
167. Kim H, Kim J, Choi G. Epidermal PHYB requires RRC1 to promote light responses by activating the circadian rhythm. *New Phytologist*. abril de 2023;238(2):705-23.
168. Hernando CE, García Hourquet M, de Leone MJ, Careno D, Iserte J, Mora Garcia S, et al. A Role for Pre-mRNA-PROCESSING PROTEIN 40C in the Control of Growth, Development, and Stress Tolerance in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2019 [citado 14 de febrero de 2024];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2019.01019>
169. Yan T, Heng Y, Wang W, Li J, Deng XW. SWELLMAP 2, a phyB-Interacting Splicing Factor, Negatively Regulates Seedling Photomorphogenesis in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* [Internet]. 2022 [citado 14 de febrero de 2024];13. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.836519>
170. Petrillo E, Godoy Herz MA, Fuchs A, Reifer D, Fuller J, Yanovsky MJ, et al. A Chloroplast Retrograde Signal Regulates Nuclear Alternative Splicing. *Science*. 25 de abril de 2014;344(6182):427-30.
171. Godoy Herz MA, Kubaczka MG, Brzyżek G, Servi L, Krzyszton M, Simpson C, et al. Light Regulates Plant Alternative Splicing through the Control of Transcriptional Elongation. *Molecular Cell*. 7 de marzo de 2019;73(5):1066-1074.e3.

172. Riegler S, Servi L, Scarpin MR, Godoy Herz MA, Kubaczka MG, Venhuizen P, et al. Light regulates alternative splicing outcomes via the TOR kinase pathway. *Cell Reports*. 7 de septiembre de 2021;36(10):109676.
173. Hu W, Franklin KA, Sharrock RA, Jones MA, Harmer SL, Lagarias JC. Unanticipated regulatory roles for Arabidopsis phytochromes revealed by null mutant analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 22 de enero de 2013;110(4):1542-7.
174. Careno DA, Assaf CH, Eggermont EDC, Canelo M, Cerdán PD, Yanovsky MJ. Role of Phytochromes in Red Light-Regulated Alternative Splicing in Arabidopsis thaliana: Impactful but Not Indispensable. *Cells*. enero de 2023;12(20):2447.
175. Ung H, Karia P, Ebine K, Ueda T, Yoshioka K, Moeder W. Triphosphate Tunnel Metalloenzyme Function in Senescence Highlights a Biological Diversification of This Protein Superfamily. *Plant Physiology*. 1 de septiembre de 2017;175(1):473-85.
176. Elvira-Matelot E, Bardou F, Ariel F, Jauvion V, Bouteiller N, Le Masson I, et al. The Nuclear Ribonucleoprotein SmD1 Interplays with Splicing, RNA Quality Control, and Posttranscriptional Gene Silencing in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 1 de febrero de 2016;28(2):426-38.
177. Wei L, Li Y. Distribution of an Ankyrin-repeat Protein on the Endoplasmic Reticulum in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2009;51(2):140-6.
178. Franklin KA, Praekelt U, Stoddart WM, Billingham OE, Halliday KJ, Whitelam GC. Phytochromes B, D, and E Act Redundantly to Control Multiple Physiological Responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 1 de marzo de 2003;131(3):1340-6.
179. Kaczorowski KA, Quail PH. Arabidopsis PSEUDO-RESPONSE REGULATOR7 Is a Signaling Intermediate in Phytochrome-Regulated Seedling Deetiolation and Phasing of the Circadian Clock. *The Plant Cell*. 1 de noviembre de 2003;15(11):2654-65.
180. Yan Q, Xia X, Sun Z, Fang Y. Depletion of Arabidopsis SC35 and SC35-like serine/arginine-rich proteins affects the transcription and splicing of a subset of genes. *PLOS Genetics*. 8 de marzo de 2017;13(3):e1006663.
181. Nagashima Y, Ohshiro K, Iwase A, Nakata MT, Maekawa S, Horiguchi G. The bRPS6-Family Protein RFC3 Prevents Interference by the Splicing Factor CFM3b during Plastid rRNA Biogenesis in Arabidopsis thaliana. *Plants*. marzo de 2020;9(3):328.
182. Hildreth SB, Littleton ES, Clark LC, Puller GC, Kojima S, Winkel BSJ. Mutations that alter Arabidopsis flavonoid metabolism affect the circadian clock. *The Plant Journal*. mayo de 2022;110(4):932-45.
183. González CV, Ibarra SE, Piccoli PN, Botto JF, Boccalandro HE. Phytochrome B increases drought tolerance by enhancing ABA sensitivity in Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell & Environment*. noviembre de 2012;35(11):1958-68.
184. Wu J, Wang W, Xu P, Pan J, Zhang T, Li Y, et al. phyB Interacts with BES1 to Regulate Brassinosteroid Signaling in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*. 1 de febrero de 2019;60(2):353-66.
185. Harmer SL, Panda S, Kay SA. Molecular Bases of Circadian Rhythms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2001;17(1):215-53.
186. Thines B, Harmon FG. Ambient temperature response establishes ELF3 as a required component of the core Arabidopsis circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 16 de febrero de 2010;107(7):3257-62.
187. Salomé PA, McClung CR. PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 Are Partially Redundant Genes Essential for the Temperature Responsiveness of the Arabidopsis Circadian Clock. *The Plant Cell*. 1 de marzo de 2005;17(3):791-803.

188. Gil KE, Park CM. Thermal adaptation and plasticity of the plant circadian clock. *New Phytologist*. febrero de 2019;221(3):1215-29.
189. Quint M, Delker C, Franklin KA, Wigge PA, Halliday KJ, van Zanten M. Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. *Nature Plants*. 6 de enero de 2016;2(1):1-9.
190. Wenden B, Kozma-Bognár L, Edwards KD, Hall AJW, Locke JCW, Millar AJ. Light inputs shape the *Arabidopsis* circadian system. *The Plant Journal*. mayo de 2011;66(3):480-91.
191. Kolmos E, Chow BY, Pruneda-Paz JL, Kay SA. HsfB2b-mediated repression of PRR7 directs abiotic stress responses of the circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 11 de noviembre de 2014;111(45):16172-7.
192. Zhang LL, Luo A, Davis SJ, Liu JX. Timing to grow: roles of clock in thermomorphogenesis. *Trends in Plant Science*. 1 de diciembre de 2021;26(12):1248-57.
193. Salomé PA, Weigel D, McClung CR. The Role of the *Arabidopsis* Morning Loop Components CCA1, LHY, PRR7, and PRR9 in Temperature Compensation. *The Plant Cell*. 1 de noviembre de 2010;22(11):3650-61.
194. Zhan X, Wang B, Li H, Liu R, Kalia RK, Zhu JK, et al. *Arabidopsis* proline-rich protein important for development and abiotic stress tolerance is involved in microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 30 de octubre de 2012;109(44):18198-203.
195. Sorkin ML, Tzeng SC, King S, Romanowski A, Kahle N, Bindbeutel R, et al. COLD REGULATED GENE 27 and 28 antagonize the transcriptional activity of the RVE8/LNK1/LNK2 circadian complex. *Plant Physiology*. 1 de julio de 2023;192(3):2436-56.
196. Wang P, Cui X, Zhao C, Shi L, Zhang G, Sun F, et al. COR27 and COR28 encode nighttime repressors integrating *Arabidopsis* circadian clock and cold response. *Journal of Integrative Plant Biology*. febrero de 2017;59(2):78-85.
197. Tian YY, Li W, Wang MJ, Li JY, Davis SJ, Liu JX. REVEILLE 7 inhibits the expression of the circadian clock gene EARLY FLOWERING 4 to fine-tune hypocotyl growth in response to warm temperatures. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2022;64(7):1310-24.
198. Li W, Tian YY, Li JY, Yuan L, Zhang LL, Wang ZY, et al. A competition-attenuation mechanism modulates thermoresponsive growth at warm temperatures in plants. *New Phytologist*. 2023;237(1):177-91.
199. Filichkin S, Priest HD, Megraw M, Mockler TC. Alternative splicing in plants: directing traffic at the crossroads of adaptation and environmental stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 1 de abril de 2015;24:125-35.
200. Kwon YJ, Park MJ, Kim SG, Baldwin IT, Park CM. Alternative splicing and nonsense-mediated decay of circadian clock genes under environmental stress conditions in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*. 19 de mayo de 2014;14(1):136.
201. Hughes CL, An Y, Maloof JN, Harmer SL. Light quality-dependent roles of REVEILLE proteins in the circadian system. *Plant Direct*. 2024;8(3):e573.
202. Zhao H, Xu D, Tian T, Kong F, Lin K, Gan S, et al. Molecular and functional dissection of EARLY-FLOWERING 3 (ELF3) and ELF4 in *Arabidopsis*. *Plant Science*. 1 de febrero de 2021;303:110786.
203. Hartmann L, Drewe-Boß P, Wießner T, Wagner G, Geue S, Lee HC, et al. Alternative Splicing Substantially Diversifies the Transcriptome during Early Photomorphogenesis and Correlates with the Energy Availability in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 1 de noviembre de 2016;28(11):2715-34.
204. Saile J, Wießner-Kroh T, Erbstein K, Obermüller DM, Pfeiffer A, Janocha D, et al. SNF1-RELATED KINASE 1 and TARGET OF RAPAMYCIN control light-responsive splicing events and developmental

- characteristics in etiolated *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Cell*. 1 de septiembre de 2023;35(9):3413-28.
205. Scarpin MR, Leiboff S, Brunkard JO. Parallel global profiling of plant TOR dynamics reveals a conserved role for LARP1 in translation. *Manley JL, Sonenberg N, Meyuhas O, editores. eLife*. 15 de octubre de 2020;9:e58795.
206. Kathare PK, Huq E. Light-regulated pre-mRNA splicing in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 1 de octubre de 2021;63:102037.
207. Ding Y, Shi Y, Yang S. Molecular Regulation of Plant Responses to Environmental Temperatures. *Molecular Plant*. 6 de abril de 2020;13(4):544-64.
208. Graeber K, Nakabayashi K, Miatton E, Leubner-Metzger G, Soppe WJJ. Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant, Cell & Environment*. 2012;35(10):1769-86.
209. Avello PA, Davis SJ, Ronald J, Pitchford JW. Heat the Clock: Entrainment and Compensation in *Arabidopsis* Circadian Rhythms. *J Circadian Rhythms*. 17:5.
210. Kerbler SM, Wigge PA. Temperature Sensing in Plants. *Annual Review of Plant Biology*. 22 de mayo de 2023;74(Volume 74, 2023):341-66.
211. Laloum T, Martín G, Duque P. Alternative Splicing Control of Abiotic Stress Responses. *Trends in Plant Science*. 1 de febrero de 2018;23(2):140-50.
212. Dikaya V, El Arbi N, Rojas-Murcia N, Nardeli SM, Goretti D, Schmid M. Insights into the role of alternative splicing in plant temperature response. *Journal of Experimental Botany*. 20 de noviembre de 2021;72(21):7384-403.
213. Kervestin S, Jacobson A. NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nat Rev Mol Cell Biol*. noviembre de 2012;13(11):700-12.
214. Soy J, Leivar P, González-Schain N, Sentandreu M, Prat S, Quail PH, et al. Phytochrome-imposed oscillations in PIF3 protein abundance regulate hypocotyl growth under diurnal light/dark conditions in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 2012;71(3):390-401.
215. Soy J, Leivar P, Monte E. PIF1 promotes phytochrome-regulated growth under photoperiodic conditions in *Arabidopsis* together with PIF3, PIF4, and PIF5. *Journal of Experimental Botany*. 1 de junio de 2014;65(11):2925-36.
216. Kunihiro A, Yamashino T, Nakamichi N, Niwa Y, Nakanishi H, Mizuno T. PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 and 5 (PIF4 and PIF5) Activate the Homeobox ATHB2 and Auxin-Inducible IAA29 Genes in the Coincidence Mechanism Underlying Photoperiodic Control of Plant Growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. 1 de agosto de 2011;52(8):1315-29.
217. Bieniawska Z, Espinoza C, Schlereth A, Sulpice R, Hinch DK, Hannah MA. Disruption of the *Arabidopsis* Circadian Clock Is Responsible for Extensive Variation in the Cold-Responsive Transcriptome. *Plant Physiology*. 1 de mayo de 2008;147(1):263-79.
218. Nakamichi N, Takao S, Kudo T, Kiba T, Wang Y, Kinoshita T, et al. Improvement of *Arabidopsis* Biomass and Cold, Drought and Salinity Stress Tolerance by Modified Circadian Clock-Associated PSEUDO-RESPONSE REGULATORS. *Plant and Cell Physiology*. 1 de mayo de 2016;57(5):1085-97.
219. Nakamichi N, Kusano M, Fukushima A, Kita M, Ito S, Yamashino T, et al. Transcript Profiling of an *Arabidopsis* PSEUDO RESPONSE REGULATOR Arrhythmic Triple Mutant Reveals a Role for the Circadian Clock in Cold Stress Response. *Plant and Cell Physiology*. 1 de marzo de 2009;50(3):447-62.
220. Wang Q, Zuo Z, Wang X, Gu L, Yoshizumi T, Yang Z, et al. Photoactivation and inactivation of *Arabidopsis* cryptochrome 2. *Science*. 21 de octubre de 2016;354(6310):343-7.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

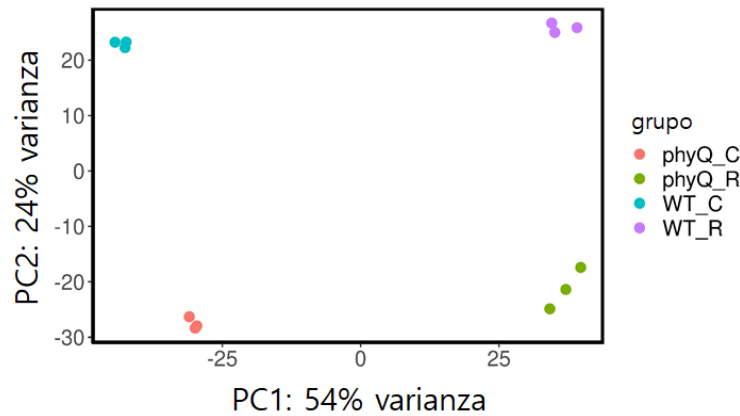


Figura suplementaria S1 Análisis de componentes principales de todas las réplicas biológicas secuenciadas para el experimento de tratamiento nocturno. El análisis se realizó utilizando los recuentos de lecturas normalizados. phyQ_C: control en oscuridad de *phyQ*; phyQ_R: tratamiento con luz R de *phyQ*; WT_C: control en oscuridad de WT (Col-0); WT_R: tratamiento con luz R de WT (Col-0). La primera coordenada principal (PC1) representa la variabilidad entre tratamientos, y PC2 explica la variabilidad entre genotipos.

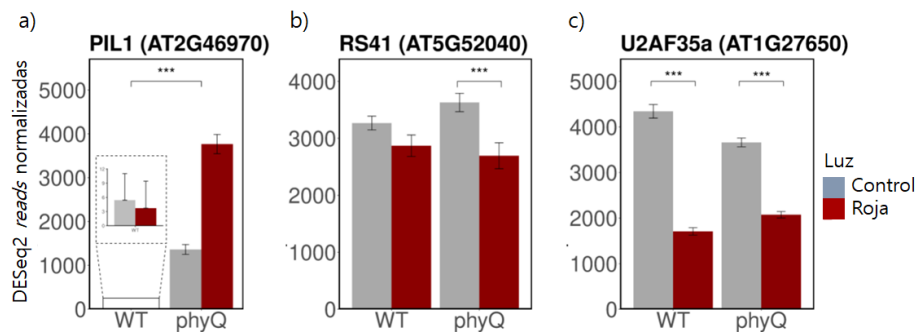


Figura suplementaria S2 Genes que exhiben patrones de expresión alterados en la mutante *phyQ*. Valores de recuento de lecturas normalizados de (a) *PIL1* (AT2G46970), (b) *U2AF35a* (AT1G27650) y (c) *RS41* (AT5G52040). El análisis estadístico se realizó utilizando ASpli. Para *PIL1* se muestra la significancia estadística del efecto del genotipo. Para *RS41* y *U2AF35a* se muestra la significancia estadística del contraste entre tratamientos. Se muestran la media y la desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes. ***: FDR < 0,001.

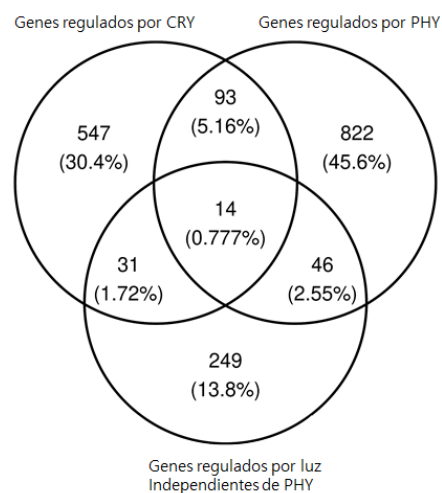


Figura suplementaria S3 Comparación de patrones de *splicing* en distintos conjuntos de datos. Superposición entre genes regulados a nivel de *splicing* por criptocromos, fitocromos y cloroplastos (independientes de PHY). Los genes

regulados por CRY se obtuvieron de la unión de genes con *splicing* diferencial (DSGs) en WT, pero no en la doble mutante *cry1 cry2*, tras un tratamiento con luz azul, en los análisis de datos de Wang et al. (2016) (220) y Zhao et al. (2022) (161). Los genes regulados por PHY se obtuvieron de la unión de los DSGs entre WT y la doble mutante *phyA phyB* reportados por (162), y los DSGs entre WT y *phyB* y entre WT y *phyA phyB* obtenidos del reanálisis del conjunto de datos de Wu et al. (2019) (184). Los DSGs en la mutante *phyQ* obtenidos en este trabajo se etiquetaron como independientes de PHY.

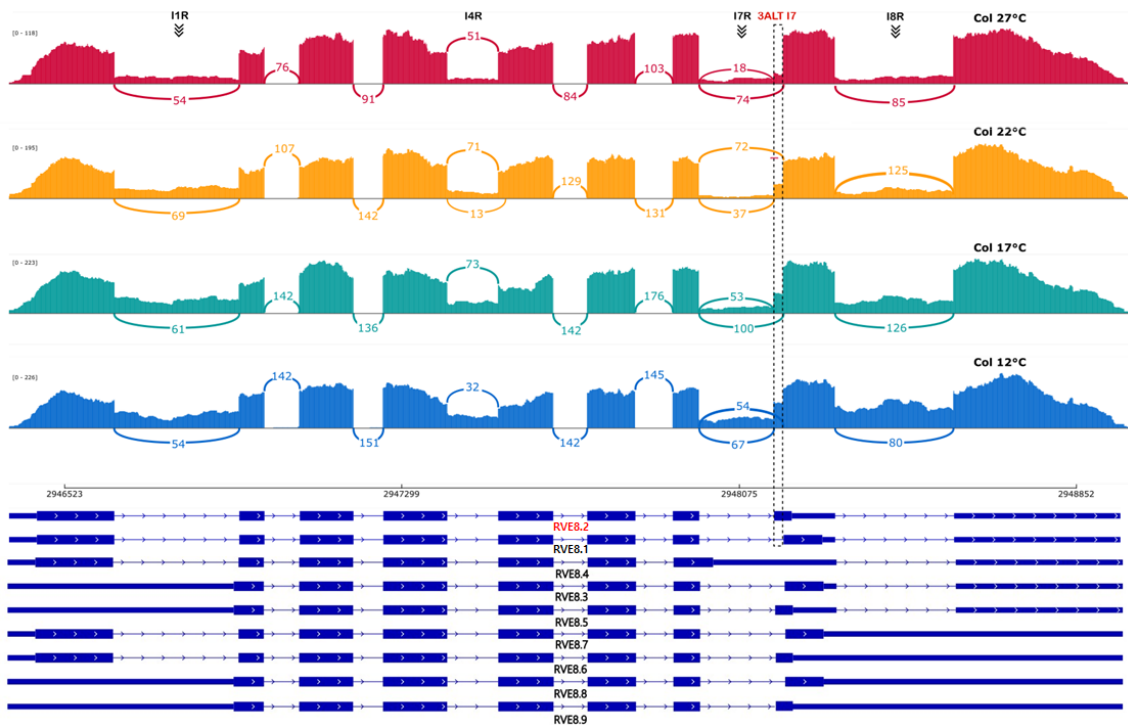


Figura suplementaria S4 Análisis de *splicing* alternativo de *RVE8* en respuesta a diferentes temperaturas. Se muestran los resultados de RNA-seq en plantas expuestas a 27 °C (rojo), 22 °C (amarillo), 17 °C (verde) y 12 °C (azul). Los Sashimi plots destacan el número de lecturas y la información de las juntas para los eventos detectados. Los modelos de las isoformas asociadas a cada evento se encuentran representados debajo. Se destaca en rojo la isoforma producto del evento ss 3'alt del intrón 7. Las líneas de puntos indican la región diferencial.

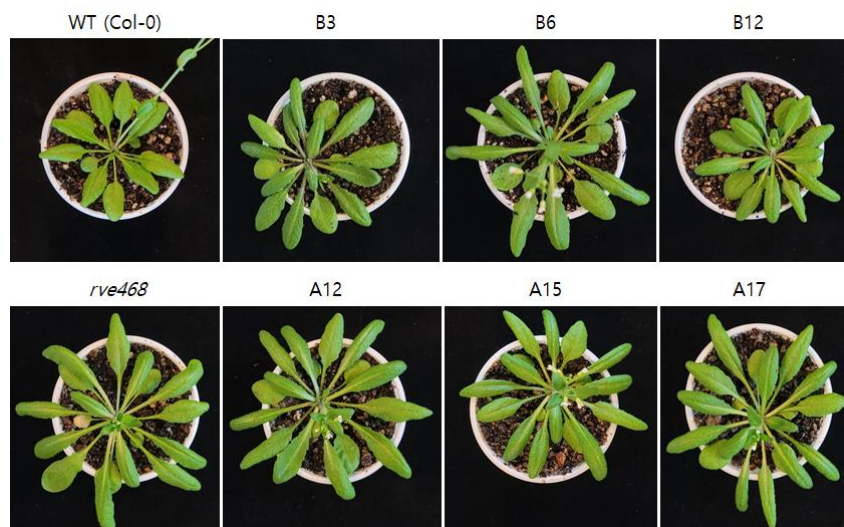


Figura suplementaria S5 Fenotipos de plantas transgénicas sobreexpresantes de las isoformas de RVE8, WT y la triple mutante *rve*. Las plantas fueron crecidas durante 4 semanas en LD (16:8) con luz blanca a una intensidad de

80 mol $\mu\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ antes de ser fotografiadas. En la parte superior, se muestra WT (col-0) junto a las líneas 35S::RVE8-FL:GFP (B3, B6 y B12). Debajo, se observa la mutante *rve468* junto a las líneas 35S::RVE8-AS:GFP (A12, A15, 17).

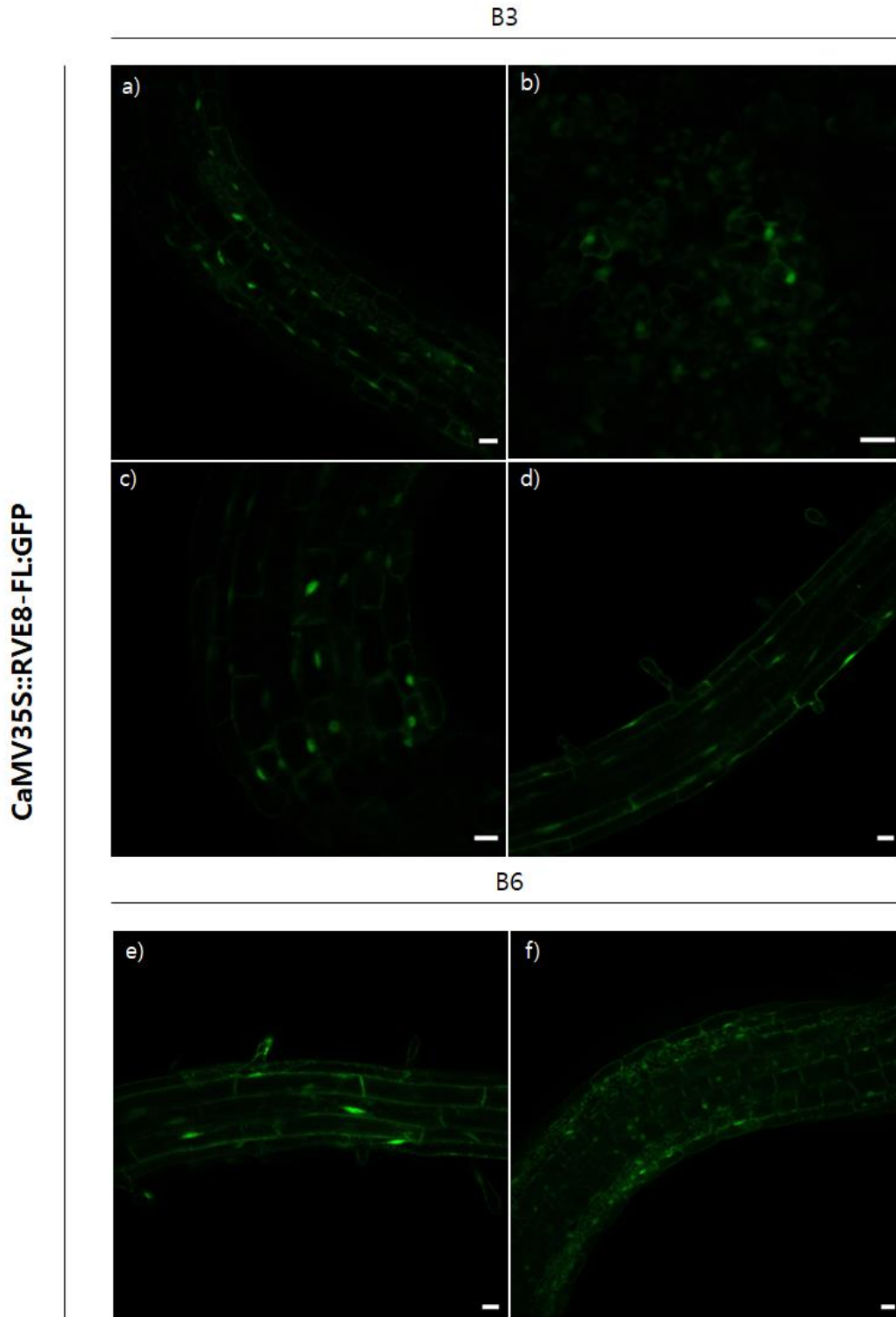


Figura suplementaria S6 Fluorescencia de GFP y localización subcelular de RVE8-FL. a-f) Fluorescencia de GFP en líneas transgénicas sobreexpresando la isoforma RVE8-FL fusionada a GFP, bajo el control del promotor CaMV 35S. Las plántulas fueron crecidas por 4 días en LD (16:8) a 22°C antes de ser visualizadas. Se observan imágenes de células de raíz (a, c, f), hoja (b) e hipocotilo (d, e) en las líneas B3 (a-d) y B6 (e-f), (barras de escala, 20 μm).

CaMV35S::RVE8-AS:GFP

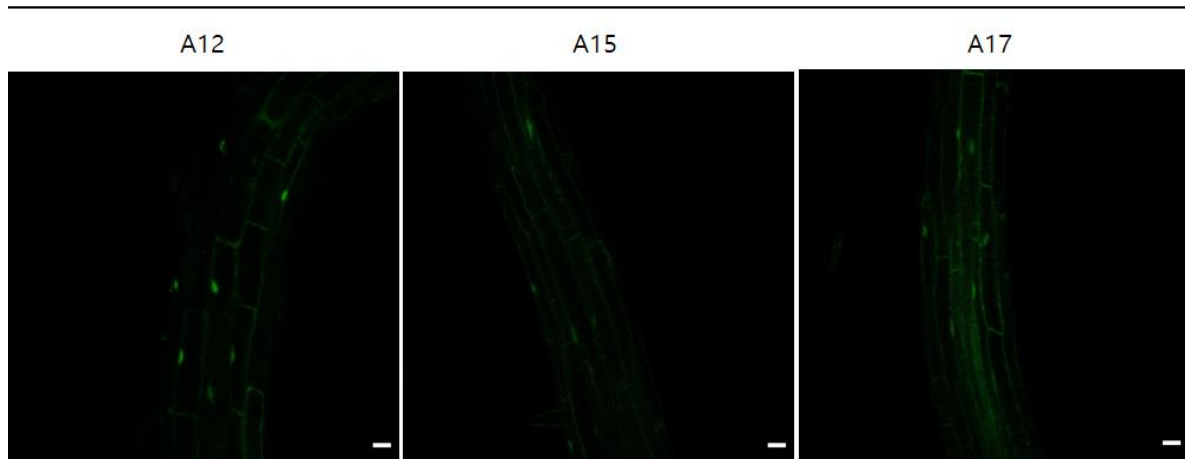


Figura suplementaria S7 Fluorescencia de GFP y localización subcelular de RVE8-AS. Líneas transgénicas sobreexpresando la isoforma RVE8-AS fusionada a GFP, bajo el control del promotor CaMV 35S. Las plántulas fueron crecidas por 4 días en LD (16:8) a 22°C antes de ser visualizadas. Se observan imágenes de células de hipocotilos en las líneas A12, A15, A17, (barras de escala, 20 μ m).

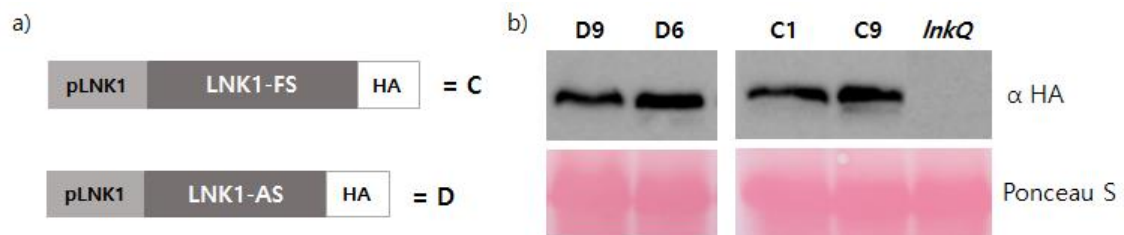


Figura suplementaria S8 Líneas transgénicas de las isoformas SA de LNK1. a) Diagrama esquemático que representa las construcciones con el ADNc de la versión *full length* de *LNK1* (LNK1-FL) y una versión truncada o *alternatively spliced* (LNK1-AS) fusionadas a HA, y bajo el control de un promotor de su promotor endógeno. Las letras indican de qué isoforma se trata. b) Acumulación de proteínas en líneas transgénicas con expresión endógena de la isoforma canónica (C1, C9) y la isoforma alternativa (D6, D9) de LNK1 observada por western blot. Los análisis fueron realizados en líneas transgénicas crecidas en ciclos de 16 h luz/ 8 h oscuridad por 10 días y cosechadas 6 horas después del amanecer (ZT6). Las isoformas fueron detectadas con anticuerpo α HA. La tinción de Ponceau S se muestra como control de carga. La mutante *InkQ* se utilizó como control negativo.

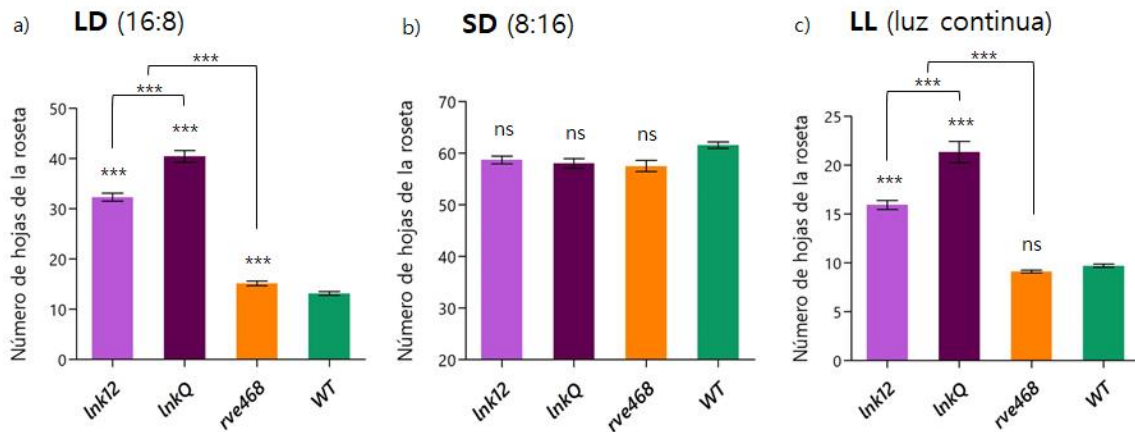


Figura suplementaria S9 Rol de las familias de activadores y co-activadores, RVE y LNK, en el control fotoperiódico de la floración. Medición del tiempo de floración representado como el número de hojas de la roseta al momento de la floración en fotoperiodos de a) día largo (LD; 16:8), b) día corto (SD; 8:16) y en c) luz continua (LL) (n=12). Las barras de error indican SEM. Se realizó ANOVA de un factor seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey entre mutantes y WT (*: significativamente diferente, $p \leq 0,05$; **: significativamente diferente, $p \leq 0,01$; ***: significativamente diferente, $p \leq 0,001$; ns: no significativo). Los datos expuestos corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

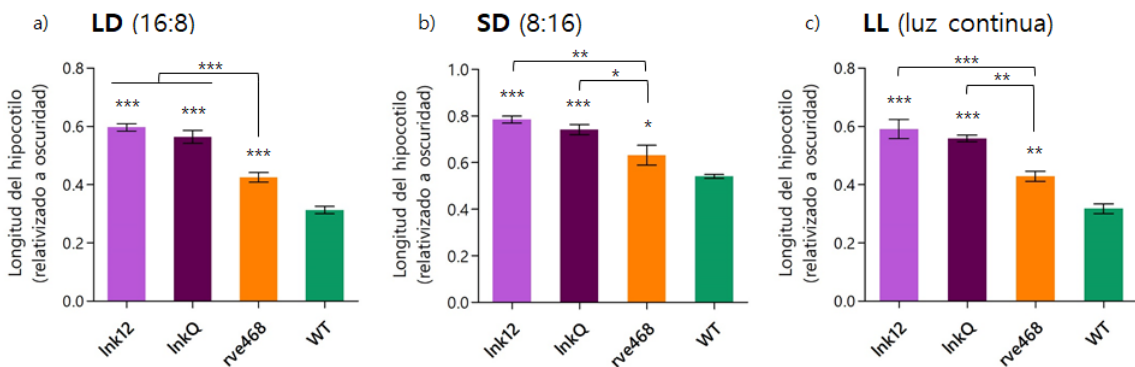


Figura suplementaria S10 Rol de las familias de activadores y co-activadores, RVE y LNK, en el control de la fotomorfogénesis. Longitud de hipocotilos de plantas WT y mutantes *Ink* y *rve* crecidos bajo diferentes fotoperiodos y en condiciones de oscuridad (control). Las mediciones se expresan relativizadas al control en oscuridad para cada genotipo, n=6 réplicas de 10 plántulas. a) Fotoperiodo de día largo en luz blanca ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; LD; 16:8), b) Fotoperiodo de día corto en luz blanca ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; SD; 8:16) y c) Luz blanca continua ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Las barras de error indican SEM. Se realizó ANOVA de un factor seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey entre las mutantes y WT (*: significativamente diferente, $p \leq 0,05$; **: significativamente diferente, $p \leq 0,01$; ***: significativamente diferente, $p \leq 0,001$). Los datos expuestos corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

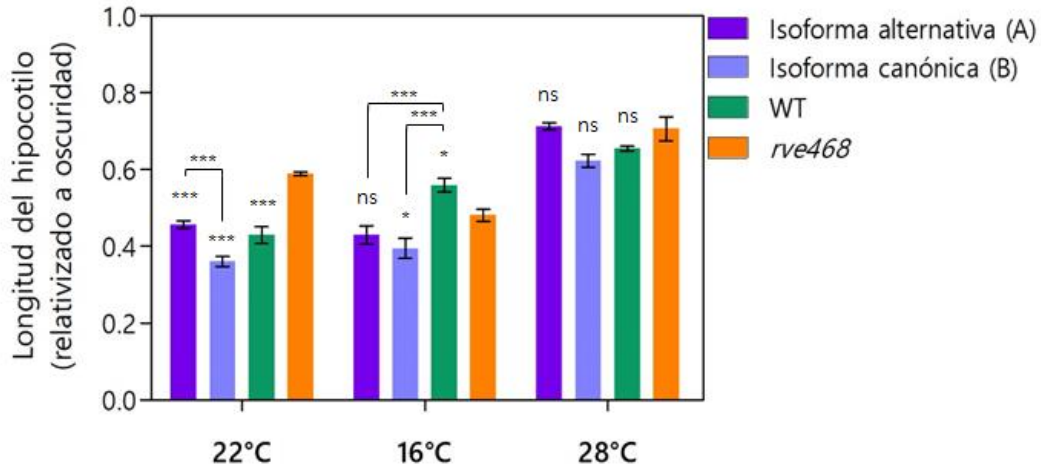


Figura suplementaria S11 Inhibición de la elongación de hipocotilos en líneas transgénicas sobreexpresantes de las isoformas RVE8-FL y AS bajo diferentes temperaturas. Promedio de la longitud de hipocotilos por grupos de líneas sobreexpresantes de RVE8-FL (B3, B6, B12, "isoforma canónica B"), líneas sobreexpresantes de RVE8-AS (A12, A15, A17, "isoforma alternativa A"), WT y mutantes *rve468* crecidas en fotoperiodos de día largo (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$; LD; 16:8) a 22°C, 16°C o 28°C, (n=6 réplicas de 10 plántulas cada una). Los resultados se expresan relativizados al control en oscuridad para cada genotipo. Se realizó ANOVA de dos factores seguido de pruebas de Bonferroni entre grupos (*: significativamente diferente, $p \leq 0,05$; **: significativamente diferente, $p \leq 0,01$; ***: significativamente diferente, $p \leq 0,001$; ns: no significativo). Las barras de error indican el SEM. Los datos son ilustrativos de al menos dos experimentos independientes.

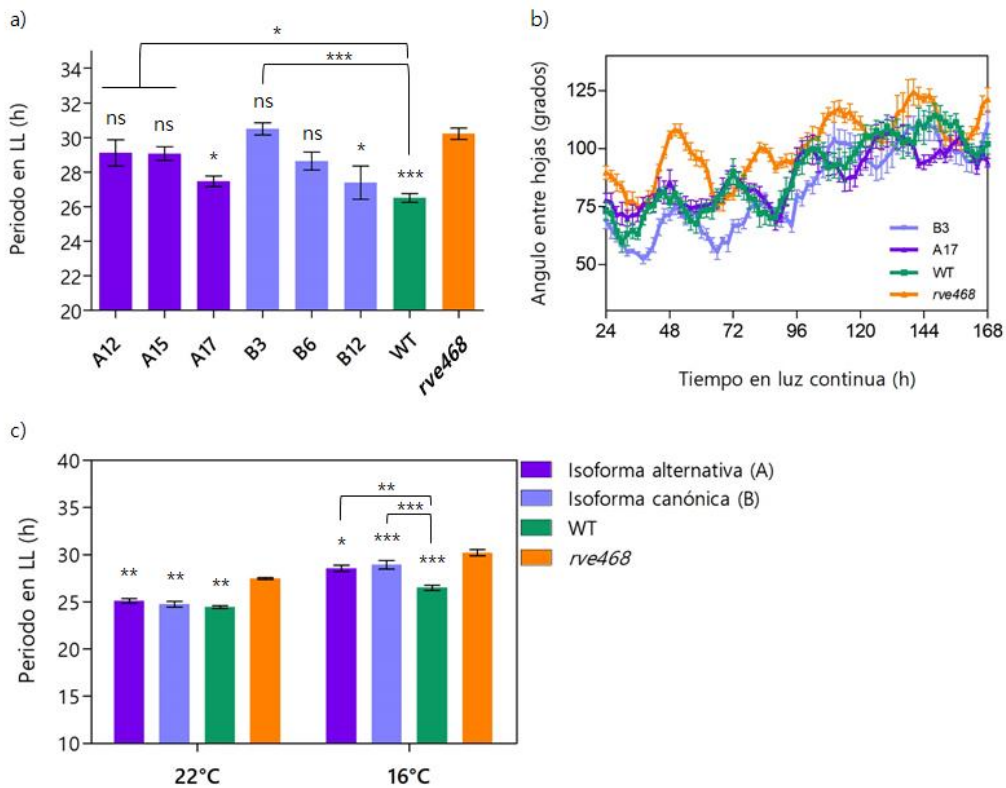


Figura suplementaria S12 Ritmos circadianos del movimiento de hojas en líneas transgénicas sobreexpresantes de las isoformas RVE8-FL y AS a distintas temperaturas. a, b) Luego de un entrenamiento de 10 días en condiciones de día largo (LD) a 16°C, se midió el ángulo entre el primer par de hojas verdaderas (b) en plántulas sobreexpresantes

de RVE8-FL (B3, B6, B12) y RVE8-AS (A12, A15, A17), plantas WT y mutantes *rve468* en luz blanca continua (LL) por un periodo de tiempo (n=5). El período asociado a los ritmos circadianos (a) fue estimado por FFT-NLLS con el software BioDare2. c) Promedio del periodo por grupos de líneas sobreexpresantes (B3, B6, B12, "isoforma canónica B"; A12, A15, A17, "isoforma alternativa A"), WT y mutantes *rve468*. Se realizó ANOVA de uno (a) y dos (b) factores seguido de pruebas de comparación múltiple de Tukey entre las líneas y los controles, y pruebas de Bonferroni entre grupos (*: significativamente diferente, $p \leq 0,05$; **: significativamente diferente, $p \leq 0,01$; ***: significativamente diferente, $p \leq 0,001$; ns: no significativo). Las barras de error indican el SEM. Los datos son ilustrativos de al menos dos experimentos independientes.

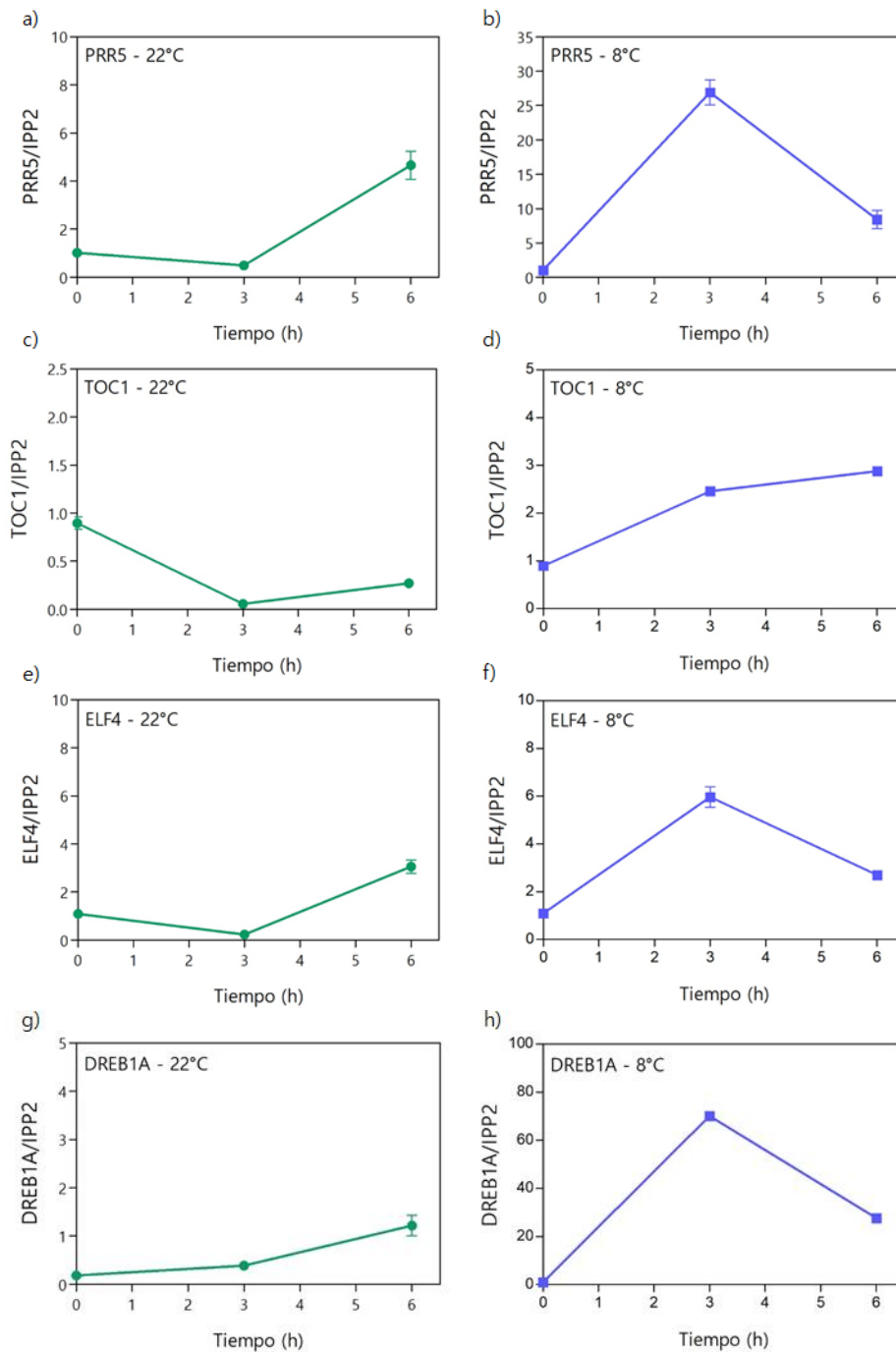


Figura suplementaria S13 Expresión relativa de genes regulados por RVE8 bajo condiciones normales de temperatura y estrés por frío. a-h) Niveles de expresión de los genes circadianos *PRR5* (a, b), *TOC1* (c, d), *ELF4* (e, f) y el FT de

respuesta al frío *DREB1A* (g, h), medidos por qPCR en plántulas WT a 22°C y 8°C según se indica. Se recolectó tejido cada 3 horas de plantas de 10 días crecidas en condiciones de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad a 22°C y luego transferidas, o no, a 8°C hasta 25 horas desde ZT0. Se muestran los valores correspondientes a los 3 puntos temporales iniciales del experimento. Los datos son el promedio de 3 réplicas biológicas relativizadas al gen constitutivo *IPP2* y normalizados a un valor de referencia (ZT0) (a, c, e, g) o a WT 22°C en cada punto temporal (b, d, f, h). Las barras de error representan el SEM. h: horas.

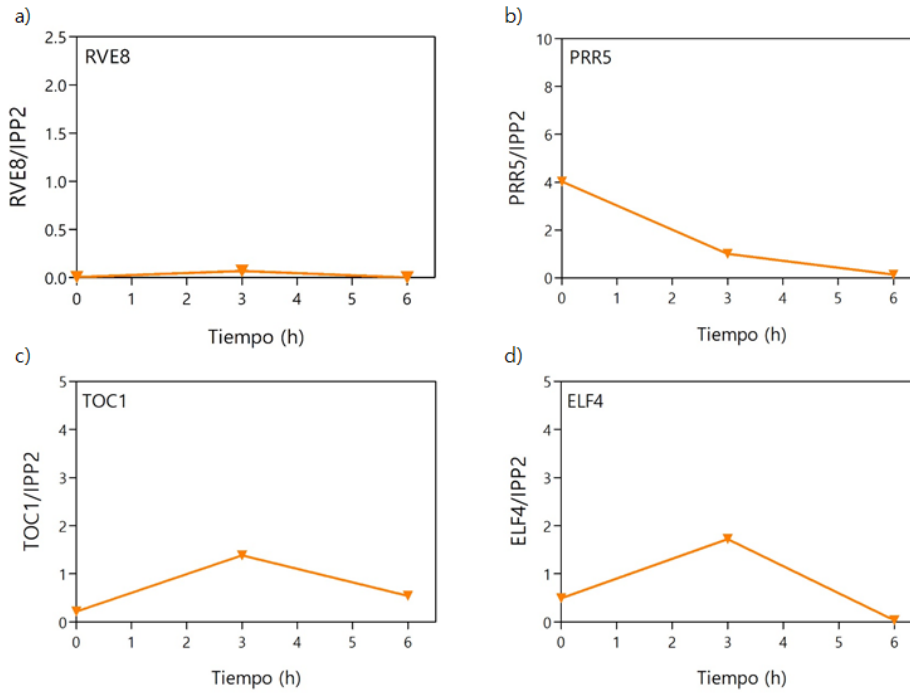


Figura suplementaria S14 Expresión relativa de genes del reloj circadiano en la triple mutante *rve*. a-d) Niveles de expresión de los genes *RVE8* (a), *PRR5* (b), *TOC1* (c) y *ELF4* (d) medidos por qPCR en plántulas mutantes *rve468*. Se recolectó tejido cada 3 horas de plantas de 10 días crecidas en condiciones de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad a 22°C y luego mantenidas en luz continua (LL) hasta 25 horas desde ZT0. Se muestran los valores correspondientes a los 3 puntos temporales iniciales del experimento. Los datos son el promedio de 2 réplicas biológicas relativizadas al gen constitutivo *IPP2* y normalizados a WT en cada punto temporal.

>AT3G09600.1 RVE8 Isoforma canónica (Q8RWU3-1)

```

MSSSPSRNPTNAEAPPPPTSTDAVAEGSSKKVRKPYITITKSRESWTEEEHDKFLEALQLFDRDWKKIEDFVGSKTVIQIRSHAQKYFL
KVKQKNGTLAHVPPPRKRKAAHPYPQKASKNAQMPLQVSTSFTRTRNGDMPGYASWDDASMLLNRVISQPHELATLRGAEADIG
SKGLLNVSPTSSTSGMGSSRTVSGSEIVRKAKQPPVLHGVPDFAEVYNFIGSVFDPETRGRHVEKLEKEMDPINFETVLLLMRNLTVNLS
NPDLESTRKVLVLSYDNVTTTELPSVSVLVKNSTSDKSA
    
```

>AT3G09600.2 RVE8 Isoforma alternativa (Q8RWU3-2)

```

MSSSPSRNPTNAEAPPPPTSTDAVAEGSSKKVRKPYITITKSRESWTEEEHDKFLEALQLFDRDWKKIEDFVGSKTVIQIRSHAQKYFL
KVKQKNGTLAHVPPPRKRKAAHPYPQKASKNAQMPLQVSTSFTRTRNGDMPGYASWDDASMLLNRVISQPHELATLRGAEADIG
SKGLLNVSPTSSTSGMGSSRTVSGSEIVRKAKQPPVLHGVPDFAEVYNFIGSVFDPETRGRHVEKLEKEMDPINFETVLLLMRNLTVNLS
NPDLESTSDCNDAEESPLII
    
```

Figura suplementaria S15 Secuencias de las proteínas canónica y alternativa de RVE8. Los recuadros punteados indican las regiones del dominio conservado MYB y los recuadros con líneas continuas corresponden al dominio LCL

(LHY/CCA1-Like domain), propio de la familia RVE. En amarillo se destacan los aminoácidos modificados y en letras rojas la región faltante en la isoforma alternativa. En distintos tonos de azul: exones codificantes (CDS) que fueron traducidos.

>AT5G64170.2 LNK1 Isoforma canónica (A8MQN2-1)

MSDLYIH~~EL~~GDYLSDEFHGNDDGIVPDSAYEDGGQFPILVSNRKKRRNDDMGSGTNHLKSNTFIKREANMLGKNPWPEKDSGGSS
VSRDTGTGKDVQDMTLEDTNTSDHGFNGGHVDVVENFSTGDPMLCDTSAATNDGVYNYSLNSIPDAENDLSFFDNGDKEKNDLF
YGWGDIGNFEDVDNMLRSCDSTFGLDSLNNEGDLGWFSSAQPNEETAGAMTDDLKPKMLENQRTAMLQVEDFLNNSEPNHA
VEDEYGYTIEDDSAQKSSQNVFDTSLQKKDILMLDVEANLEKKQTDHLHLDGKSDGFSENSFTLQHGSI~~REIM~~DTNQYPPSAF
QQRDVPYSHFNCEQPSVQVSACESKSGIKSENKPS~~SSAS~~NESYTSNHAQSIESLQGPTVDDRFRKVFETRANLLPGQDMPPSFAAN
TKKSSKTDSMVFPDAAPIQKIGLENDHRKAATELETSNMQGSSCVSSVDDISLEAT~~SFRQLQ~~QVIEQLDVRTKLCIRDSLYRLAKSAE
QRHHGGNRPEKGAGSHLVTGEADKYAGFMDIETDTNPIDRSIAHLLFHRPSDSSLSDNNVLSYKSHPMIPQPNSSPSLRIEKQEETT
ELRPEAEVVTSDNN

>AT5G64170.1 LNK1 Isoforma alternativa (A8MQN2-2)

MGSGTNHLKSNTFIKREANMLGKNPWPEKDSGGSSVSRDTGTGKDVQDMTLEDTNTSDHGFNGGHVDVVENFSTGDPMLCDTS
AATNDGVYNYSLNSIPDAENDLSFFDNGDKEKNDLFYGWGDIGNFEDVDNMLRSCDSTFGLDSLNNEGDLGWFSSAQPNEETAG
AMTDDLKPKMLENQRTAMLQVEDFLNNSEPNHAVEDEYGYTIEDDSAQKSSQNVFDTSLQKKDILMLDVEANLEKKQTDHLH
HLDGKSDGFSENSFTLQHGSI~~REIM~~DTNQYPPSAFQQRDVPYSHFNCEQPSVQVSACESKSGIKSENKPS~~SSAS~~NESYTSNHAQ
SIESLQGPTVDDRFRKVFETRANLLPGQDMPPSFAANTKKSSKTDSMVFPDAAPIQKIGLENDHRKAATELETSNMQGSSCVSSVDD
DISLEAT~~SFRQLQ~~QVIEQLDVRTKLCIRDSLYRLAKSAEQRHHGGNRPEKGAGSHLVTGEADKYAGFMDIETDTNPIDRSIAHLLFHRP
SDSSLSDNNVLSYKSHPMIPQPNSSPSLRIEKQEETTEL RPEAEVVTSDNN

Figura suplementaria S16 Secuencias de las proteínas canónica y alternativa de LNK1. Los recuadros indican las regiones del dominio "Extra N-tail" (ENT) en el extremo N-terminal, propio de LNK1/LNK2. En letras rojas se destaca la región faltante en la isoforma alternativa. En distintos tonos de azul: exones codificantes (CDS) que fueron traducidos.

Nombre del <i>primer</i>	Secuencia (5'-3')	Uso
phyB-9 1	AGCTAGTGGGAAGAAGCTCGATGAGGCCTTG	Genotipo
phyB-9 2	ACCGTCACATTTCACTAAGTCCATGGTACT	Genotipo
T-DNA	GGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG	Genotipo
phyC-2 1	TCAGCTGCGATTATCCTCAAGAAGTTTCATC	Genotipo
phyC-2 4	TGTGAGGATCACAAAGGCTGACATTTCAGA	Genotipo
27956-1 (phyD-201)	GCTCGCAAAGTCGAACCCACCAAGCATATA	Genotipo
27956-2 (phyD-201)	CGCGATTCTCCACAGGGTTGATGTTGGAAT	Genotipo
27336-1 (phyD-2)	GTGCTTAACCCGGTAGAATCAGAATGGTTA	Genotipo
27336-2 (phyD-2)	TAACATGGGCTCTATTGCGTCTTAGCTAT	Genotipo
40131-1 (phyE-201)	ATATCGACAACAAGGTCTGCGTCCGCATA	Genotipo
40131-2 (phyE-201)	CAGATATTCCTCAGGCTGCTCGGTTCTTGT	Genotipo
rve4-1_Fw	GCAAGCGAAGCGTCTCCAC	Genotipo
rve4-1_Rv	GCAGTAAATCAAACAGGCACAGG	Genotipo
rve6-1_Fw	CGAGAGTTGGATTTAGGCAGATGG	Genotipo
rve6-1_Rv	GAGGAGGAGGGAGATGTTACC	Genotipo
rve8-1_Fw	GCCATGTGGACTTTTCTTTTC	Genotipo
rve8-1_Rv	TGAAACGTCCTTTGATGGAAC	Genotipo
T-DNA	CGCTTGCTGCAACTCTCTCAGG	Genotipo
Ink1-1_Fw	AGGTGACTTAGGGTGGTTCTCTTC	Genotipo
Ink1-1_Rv	CTGGCGAAAACCTTGTGCTTCC	Genotipo
Ink2-1_Fw	TGCTGAGACAGGCGACCATATTG	Genotipo
Ink2-1_Rv	GGGACACTTTGGGATGACAGACC	Genotipo
Ink3-1_Fw	GGAGGATGTTCCAGAGGATGATGG	Genotipo
Ink3-1_Rv	TTGAATGTGAGGTTTGCACAGC	Genotipo
Ink4-1_Fw	AAGGAGTCGGATAATAACAACAGC	Genotipo
Ink4-1_Rv	TCTCTTCGGTGGAGGCATATTTTC	Genotipo
U2AF64-Fw	CTGTGGTGTGTCTGACTCAAGTTG	Validación de eventos SA
U2AF64-Rv	CGGAATCACAAACATTGGTCAAAGC	Validación de eventos SA
SR30-Fw	GATCTTGATTTTGATCTTGATTGG	Validación de eventos SA
SR30-Rv	GTCACCTGCTAGATCCATTTCC	Validación de eventos SA
KH29-Fw	CCATTCCTGCCTGTGCTTCC	Validación de eventos SA
KH29-Rv	GTAATTGCTTCAACTCGCTTCAG	Validación de eventos SA
TTM1-Fw	GAATAGGTTACAGAACGCTTGAGG	Validación de eventos SA
TTM1-Rv	TCAGGTTCAATAAACGCCTTGATC	Validación de eventos SA
SMD1A-Fw	TGTGTCTATCGAGCTGAAGAATGG	Validación de eventos SA
SMD1A-Rv	CCTTCAGGCTCATCTTCACTGTC	Validación de eventos SA
ANK1-Fw	ACGGAAATCTACAGGTTCTTGATG	Validación de eventos SA
ANK1-Rv	GCCACTCTACTGACTTCACAATAC	Validación de eventos SA
RVE8-3'Alt_Fw	GAGTGTCTTTGATCCTGAAACGAG	Validación de eventos SA
RVE8-3'Alt_Rv	AAGGGAAACAACGCTTGGG	Validación de eventos SA
LNK1-EE_Fw	GTCTTCTGCCGAACATCTCTAG	Validación de eventos SA
LNK1-EE_Rv	ACTGACCTCCATCCTCATACG	Validación de eventos SA
RVE8-CDS_Fw	ATGAGCTCGTCGCCGTCAG	Clonados

RVE8-CDS(FL)_Rv	TGCTGATTTGTCGCTTGTTGAGTTC	Clonados
RVE8-CDS(AS)_Rv	TATGATAAGAGGACTTTCCTCTGC	Clonados
LNK1-CDS(FL)_Fw	ATGTCGGACTTGTACATTCATG	Clonados
LNK1-CDS(AS)_Fw	ATGGGTAGTGAACAACCATC	Clonados
LNK1-CDS_Rv	GAAGTTGTAACAAGTGACAACAATTA	Clonados
PromRVE8_Fw	AACCACTCGGACATATCGACT	Clonados
PromRVE8_Rv	TTATTTTTCAGATAAAGACAGG	Clonados
PromLNK1_Fw	GATCAAAGGATCTCTCC	Clonados
PromLNK1(FL)_Rv	ATCATCATTTCTTCGTTTC	Clonados
PromLNK1(AS)_Rv	CCTCCCAACTTCAGACTC	Clonados
RVE8-FL_Fw	AAACCTGATTTAGAATCCACTAG	qPCR
RVE8-FL_Rv	TGATTTGTCGCTTGTTGAGTTC	qPCR
RVE8-AS_Fw	CTCTTCGTGGAGCAGAAGCTG	qPCR
RVE8-AS_Rv	CAGGAACACCGTGAAGCACTG	qPCR
IPP2_Fw	GTATGAGTTGCTTCTCCAGCAAAG	qPCR
IPP2_Rv	GAGGATGGCTGCAACAAGTGT	qPCR
PRR5_Fw	CGAGAAGCCGCTTTAACCAA	qPCR
PRR5_Rv	CGGCTCTCGTAACGAACCTT	qPCR
TOC1_Fw	AACACCAAACAAGCACGCAGAG	qPCR
TOC1_Rv	TGAGCCATTTCCATTGACAAGAGG	qPCR
ELF4_Fw	AGTTTCTCGTCGGGCTTTCA	qPCR
ELF4_Rv	TAAGCTCTAGTCCGGCAGC	qPCR
DREB1A_Fw	CGCTGACTCGGCTTGGA	qPCR
DREB1A_Rv	GCATCACACATCTCATCCTGAAAC	qPCR

Tabla suplementaria S1. Secuencias de primers empleados para genotipo de líneas mutantes, validación de eventos de *splicing* alternativo por RT-PCR, construcción de vectores de clonación y análisis de expresión por qPCR.

a)

Comparación	Δ Media	Significancia	IC 95%
A12 vs A15	0,01106	ns	[-0.08455, 0.1067]
A12 vs A17	-0,04189	ns	[-0.1375, 0.05372]
A12 vs B3	0,05653	ns	[-0.03908, 0.1521]
A12 vs B6	0,1044	*	[0.008757, 0.2000]
A12 vs B12	0,1557	***	[0.04876, 0.2626]
A15 vs A17	-0,05295	ns	[-0.1486, 0.04266]
A15 vs B3	0,04547	ns	[-0.05014, 0.1411]
A15 vs B6	0,09331	ns	[-0.002304, 0.1889]
A15 vs B12	0,1446	**	[0.03770, 0.2515]
A17 vs B3	0,09842	*	[0.002809, 0.1940]
A17 vs B6	0,1463	***	[0.05065, 0.2419]
A17 vs B12	0,1976	***	[0.09065, 0.3045]
B3 vs B6	0,04784	ns	[-0.04777, 0.1435]
B3 vs B12	0,09913	ns	[-0.007771, 0.2060]
B6 vs B12	0,05129	ns	[-0.05561 to 0.1582]

b)

Comparación	Δ Media	Significancia	IC 95%
A12 vs A15	0,003453	ns	[-0.06923, 0.07614]
A12 vs A17	0,004359	ns	[-0.06832, 0.07704]
A12 vs B3	0,04697	ns	[-0.02571, 0.1197]
A12 vs B6	0,1391	***	[0.06644, 0.2118]
A12 vs B12	0,1171	**	[0.03585, 0.1984]
A15 vs A17	0,0009063	ns	[-0.07178, 0.07359]
A15 vs B3	0,04352	ns	[-0.02916, 0.1162]
A15 vs B6	0,1357	***	[0.06299, 0.2084]
A15 vs B12	0,1137	**	[0.03240, 0.1949]
A17 vs B3	0,04261	ns	[-0.03007, 0.1153]
A17 vs B6	0,1348	***	[0.06208, 0.2074]
A17 vs B12	0,1128	**	[0.03150, 0.1940]
B3 vs B6	0,09215	**	[0.01947, 0.1648]
B3 vs B12	0,07014	ns	[-0.01112, 0.1514]
B6 vs B12	-0,02201	ns	[-0.1033, 0.05925]

c)

Comparación	Δ Media	Significancia	IC 95%
A12 vs A15	0,02019	ns	[-0.04481, 0.08519]
A12 vs A17	0,02560	ns	[-0.03940, 0.09060]
A12 vs B3	0,06753	*	[0.002534, 0.1325]
A12 vs B6	0,1318	***	[0.06678, 0.1968]
A12 vs B12	0,08980	**	[0.02480, 0.1548]
A15 vs A17	0,005409	ns	[-0.05959, 0.07041]
A15 vs B3	0,04735	ns	[-0.01765, 0.1123]
A15 vs B6	0,1116	***	[0.04660, 0.1766]
A15 vs B12	0,06961	*	[0.004610, 0.1346]
A17 vs B3	0,04194	ns	[-0.02306, 0.1069]
A17 vs B6	0,1062	***	[0.04119, 0.1712]
A17 vs B12	0,06420	ns	[-0.0007992, 0.1292]
B3 vs B6	0,06425	ns	[-0.0007492, 0.1293]
B3 vs B12	0,02226	ns	[-0.04274, 0.08726]
B6 vs B12	-0,04199	ns	[-0.1070, 0.02301]

Tabla suplementaria S2 Comparaciones múltiples de Tukey, post hoc al ANOVA, entre líneas RVE8-FL y RVE8-AS en los experimentos de inhibición de la elongación de hipocotilos bajo distintos fotoperiodos. Se indica la diferencia de medias entre pares de grupos, el nivel de significancia (*: significativamente diferente, $p \leq 0,05$; ***: significativamente diferente, $p \leq 0,01$; ****: significativamente diferente, $p \leq 0,001$; ns: no significativo) y el intervalo de confianza del 95% en condiciones de LL (a), LD (b) y SD (c).

a)

Comparación	Δ Media	Significancia	IC 95%
A12 vs A15	0,03205	ns	[-0.07587 to 0.1400]
A12 vs A17	-0,003672	ns	[-0.1116, 0.1042]
A12 vs B3	0,06793	ns	[-0.03999, 0.1759]
A12 vs B6	0,08287	ns	[-0.02505, 0.1908]
A12 vs B12	0,1437	**	[0.03580, 0.2516]
A15 vs A17	-0,03572	ns	[-0.1436, 0.07220]
A15 vs B3	0,03588	ns	[-0.07204, 0.1438]
A15 vs B6	0,05082	ns	[-0.05710, 0.1587]
A15 vs B12	0,1117	*	[0.003752, 0.2196]
A17 vs B3	0,07160	ns	[-0.03632, 0.1795]
A17 vs B6	0,08654	ns	[-0.02138, 0.1945]
A17 vs B12	0,1474	**	[0.03948, 0.2553]
B3 vs B6	0,01494	ns	[-0.09298, 0.1229]
B3 vs B12	0,07579	ns	[-0.03213, 0.1837]
B6 vs B12	0,06086	ns	[-0.04706, 0.1688]

b)

Comparación	Δ Media	Significancia	IC 95%
A12 vs A15	-0,008519	ns	[-0.06773, 0.05069]
A12 vs A17	0,0002320	ns	[-0.05898, 0.05944]
A12 vs B3	0,04428	ns	[-0.01493, 0.1035]
A12 vs B6	0,08192	**	[0.02271, 0.1411]
A12 vs B12	0,09095	**	[0.03174, 0.1502]
A15 vs A17	0,008751	ns	[-0.05046, 0.06796]
A15 vs B3	0,05280	ns	[-0.006408, 0.1120]
A15 vs B6	0,09044	**	[0.03123, 0.1497]
A15 vs B12	0,09947	**	[0.04026, 0.1587]
A17 vs B3	0,04405	ns	[-0.01516, 0.1033]
A17 vs B6	0,08169	**	[0.02248, 0.1409]
A17 vs B12	0,09072	**	[0.03151, 0.1499]
B3 vs B6	0,03764	ns	[-0.02157, 0.09685]
B3 vs B12	0,04667	ns	[-0.01254, 0.1059]
B6 vs B12	0,009031	ns	[-0.05018, 0.06824]

Tabla suplementaria S3 Comparaciones múltiples de Tukey, post hoc al ANOVA, entre líneas RVE8-FL y RVE8-AS en los experimentos de inhibición de la elongación de hipocotilos a 28°C. Se indica la diferencia de medias entre pares de grupos, el nivel de significancia (*: significativamente diferente, $p \leq 0,05$; **: significativamente diferente, $p \leq 0,01$; ***: significativamente diferente, $p \leq 0,001$; ns: no significativo) y el intervalo de confianza del 95% en condiciones de LD a 1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ (a) o 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ (b).