



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

“Estudio de los mecanismos de regulación post-transcripcional de los ritmos circadianos”

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

Lic. Daniel Alejandro Careno

Director de tesis: Dr. Marcelo Javier Yanovsky

Consejero de estudios: Dr. Pablo Diego Cerdán

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires

Índice

Resumen.....	5
Abstract	6
Agradecimientos	7
Abreviaturas y anglicismos	8
Introducción.....	9
El reloj biológico: definición y ventajas adaptativas	9
El oscilador central regula múltiples procesos.....	14
Regulación post-transcripcional de los ritmos circadianos.....	16
Estabilidad y degradación del ARN	20
Hipótesis y objetivos	25
Materiales y métodos.....	26
Análisis de vidas media y codones óptimos	26
Plantas y condiciones de crecimiento	27
Ensayo de movimiento de hojas.....	27
Ensayos reporteros con luciferasa	27
Ensayos de floración.....	28
Ensayos de largo de hipocótilos	28
iCLIP.....	28
Procesamiento y análisis de datos de iCLIP	29
Secuenciación masiva de ARN	29
Procesamiento de lecturas de la secuenciación masiva de ARN	30
Análisis de genes diferencialmente expresados.....	30
Secuenciación masiva de ARN pequeños.....	30
Procesamiento de la secuenciación de ARNs pequeños.....	30
Análisis de ARNs pequeños	31
Resultados.....	32
Los transcriptos circadianos son inestables	32
DCP5 es necesaria para el funcionamiento del reloj.....	37
DCP5 se une a múltiples transcriptos del oscilador	42
DCP5 regula más de un 10% del transcriptoma	46

Los transcritos circadianos en <i>dcp5</i> muestran cambio de fase.....	51
DCP5 es necesario para la respuesta a 28 °C.....	60
La vía de auxinas es regulada por DCP5	63
Mutaciones en <i>RDR6</i> revierten el fenotipo de <i>dcp5</i>	69
Discusión.....	75
Un modelo post-transcripcional del reloj	75
Degradación y reprogramación del transcriptoma	78
¿Quién regula a DCP5?	81
La interacción entre DCP5 y la vía de PTGS	84
El futuro del reloj biológico	85
Conclusiones.....	86
Bibliografía	87
Anexo I: Tablas Suplementarias	108
Anexo II: Figuras suplementarias	114

Estudio de los mecanismos de regulación post-transcripcional de los ritmos circadianos

Resumen

Los ritmos circadianos permiten a los organismos anticiparse y ajustar su fisiología a los cambios periódicos en el ambiente. Estos ritmos están controlados por el reloj biológico, que consiste en un conjunto de genes denominados el oscilador central que regulan mutuamente su expresión y, además, la de miles de otros genes. Las oscilaciones circadianas en los niveles de ARN mensajero (ARNm) requieren la regulación tanto de la síntesis como de la degradación de ARNm. Mientras que los genes que controlan la síntesis rítmica han sido exhaustivamente caracterizados en hongos, plantas, insectos y mamíferos, los factores involucrados en la degradación del ARNm asociados al reloj han comenzado a ser identificados más recientemente. Entre ellos, el activador de *decapping* LSM1 y la exorribonucleasa 5'-3' XRN4 han demostrado desempeñar un papel en la regulación circadiana. En este trabajo mostramos que DECAPPING PROTEIN 5 (DCP5), un represor traduccional que canaliza los ARNm hacia la vía de degradación 5'-3', es necesario para el correcto funcionamiento del reloj circadiano en *Arabidopsis thaliana*. Encontramos que la mutante hipomórfica *dcp5* presenta un período circadiano más largo que el de plantas silvestres en la expresión de genes del reloj y en los ritmos de movimiento de hojas. Una caracterización molecular, reveló que DCP5 se une directamente a múltiples transcritos relacionados al reloj y un análisis del transcriptoma reveló que esos mensajeros presentan alteraciones en su fase circadiana de expresión. Los fenotipos alterados asociados al funcionamiento incorrecto del reloj biológico en *dcp5* son rescatados en la doble mutante *dcp5 rdr6* sugiriendo que DCP5 evita que sus transcritos blancos sean convertidos en ARNs de interferencia pequeños por la maquinaria de silenciamiento post-transcripcional. Nuestros datos sugieren que la modulación de la traducción de ARN mensajeros juega un papel importante modulando la expresión rítmica de genes del oscilador central y genes que conectan al oscilador central con múltiples procesos biológicos.

Palabras clave: Ritmos circadianos, regulación post-transcripcional, procesamiento de ARN, *Arabidopsis thaliana*

Study of the post-transcriptional regulatory mechanisms of circadian rhythms

Abstract

Circadian rhythms enable organisms to anticipate and adjust their physiology in response to periodic environmental changes. These rhythms are controlled by the biological clock, which consists of a set of genes known as the central oscillator that mutually regulate each other's expression, as well as that of thousands of other genes. Circadian oscillations in messenger RNA (mRNA) levels require the regulation of both mRNA synthesis and degradation. While genes that control rhythmic synthesis have been well characterized in fungi, plants, insects, and mammals, clock-associated factors involved in mRNA degradation have only recently begun to be identified. Among these, the decapping activator LSM1 and the 5'-3' exoribonuclease XRN4 have been shown to play a role in circadian regulation. In this work, we show that DECAPPING PROTEIN 5 (DCP5), a translational repressor that channels mRNAs into the 5'-3' degradation pathway, is required for proper circadian clock function in *Arabidopsis thaliana*. We found that the hypomorphic mutant *dcp5* exhibits a longer circadian period than wild-type plants, both in clock gene expression and in leaf movement rhythms. A molecular characterization revealed that DCP5 directly binds multiple clock-related transcripts, and a transcriptome analysis showed that these mRNAs display altered circadian phase of expression. The clock-related phenotypes observed in *dcp5* are rescued in the double mutant *dcp5 rdr6*, suggesting that DCP5 prevents its target transcripts from being converted into small interfering RNAs by the post-transcriptional silencing machinery. Our data suggests that translational control of messenger RNAs plays a key role in modulating rhythmic expression of core oscillator genes and of genes linking the oscillator to multiple biological processes.

Key words: Circadian rhythms, post-transcriptional regulation, RNA processing, *Arabidopsis thaliana*

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, de una u otra manera, hicieron posible que hoy esté culminando esta etapa tan significativa de mi vida: la escritura de esta tesis y la finalización de mi doctorado.

En primer lugar, quiero agradecer profundamente a mis padres, por haber hecho siempre todo lo posible para brindarme bienestar, apoyo incondicional y una educación que me abrió puertas y despertó mi curiosidad. Sin su esfuerzo y amor constante, nada de esto hubiera sido posible.

A mi director, Marcelo Yanovsky, le agradezco por su guía, por su paciencia, y por haberme transmitido tanto conocimiento durante estos años. Su acompañamiento fue clave en mi formación como investigador y en mi crecimiento personal.

A María Soledad Pérez Santángelo, por haberme recibido con generosidad en el laboratorio, por su paciencia y dedicación al enseñarme en mis primeros pasos, y por haber sido una guía clave en el trabajo que dio origen a esta tesis. Compartir este camino con ella fue fundamental para mi formación y para el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio —María José de Leone, Abril San Martín, Micaela Shalom, Constanza Assaf, Carlos Steve Hernando, y Julieta Mateos— gracias por el compañerismo, las charlas, las risas, y por compartir este camino con sus desafíos y logros.

También quiero agradecer muy especialmente a Dorothee Staiger, Ariel Bazzini y a todos los integrantes de sus laboratorios por haberme recibido con tanta generosidad y haberme hecho sentir parte de sus equipos, brindándome nuevos aprendizajes y experiencias enriquecedoras.

A Matías Centurión, gracias por haberme acercado al laboratorio Yanovsky y haber sido un puente en este recorrido.

Y a Luciana Bianchimano, gracias por tu presencia constante, por tu apoyo en todos los momentos y por compartir tantas alegrías en este proceso.

Finalmente, quiero dedicar esta tesis con todo mi cariño a mi abuela Aida. Su fuerza, su ternura y su ejemplo de vida me acompañan siempre. Este logro también es para ella.

Abreviaturas y anglicismos

GDE: Gen diferencialmente expresado

GDEi: Gen diferencialmente expresado con interacción significativa entre los factores genotipo y momento del día.

OP: Optimización relativa.

TCR: Transcripto controlado por el reloj.

Para la facilitar la lectura, se adoptan los siguientes anglicismos dada la falta de una traducción *straightforward* al español:

Decapping: proceso de remoción del 7-metilgualinato del extremo 5' de una molécula de ARN.

Evining complex (EC): complejo nocturno, formado por las proteínas ELF3, ELF4 y LUX.

Gating: es el proceso por el cual el reloj biológico regula la respuesta a una señal ambiental de manera tal de que la respuesta a la misma señal varía de acuerdo con el momento del día (Graham et al., 2023).

Individual-nucleotide resolution crossLinking and immunoprecipitation (iCLIP): técnica de entrecruzamiento e inmunoprecipitación con resolución a nivel de nucleótidos.

Outputs: procesos moleculares y fisiológicos rítmicos controlados por el reloj biológico.

Post-transcriptional gene silencing (PTGS): silenciamiento post transcripcional.

Processing bodies (p bodies): cuerpos citoplasmáticos generados por separación de fases que concentran maquinaria de la vía de *decapping* y degradación de ARN.

RNA quality control small interfering RNA (rqc-siRNA): ARN pequeño de interferencia generados en presencia de maquinaria de control de calidad de ARN defectuosa. También se denominan *coding transcript-derived siRNA (ct-siRNA)*.

RNA sequencing (RNA-seq): secuenciación masiva de ARN.

Splicing: empalme, proceso de remoción de intrones del pre-ARN mensajero.

Untranslated Region (UTR): región no traducida del ARN mensajero.

Wild type (WT): organismo silvestre.

Introducción

El reloj biológico: definición y ventajas adaptativas

El reloj biológico es un mecanismo endógeno que provee información temporal aun en ausencia de señales externas y se encuentra en organismos tan diversos como bacterias, plantas y animales (Young & Kay, 2001). El reloj genera oscilaciones biológicas conocidas como ritmos circadianos que regulan muchos aspectos del comportamiento, la fisiología y el desarrollo de un organismo. Aunque hay muchos reportes históricos que describen la presencia de ritmos circadianos (Kuhlman et al., 2018), su abordaje por la biología molecular moderna comenzó en la década de 1970 con el uso del organismo modelo *Drosophila melanogaster* (Konopka & Benzer, 1971). El primer gen descrito responsable de generar oscilaciones circadianas fue *period*, del cual, en un primer estudio, se aislaron tres mutantes: una de periodo de oscilaciones largo, una de periodo corto y una arrítmica. Desde ese momento nació la cronobiología moderna, la cual se expandió con el descubrimiento de relojes en prácticamente todos los organismos estudiados (Kuhlman et al., 2018). En *Arabidopsis thaliana*, los primeros reportes de ritmos circadianos son de la década de 1990. Andrew Millar y Steve Kay encontraron el primer gen controlado por el reloj biológico, *CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN (CAB)*, y el primer gen del reloj biológico, *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)* (Millar et al., 1995; Millar & Kay, 1991). En las décadas que siguieron, se descubrieron y caracterizaron aproximadamente casi cuatro decenas más de genes que junto a *TOC1* son responsables del funcionamiento del reloj (Nohales & Kay, 2016).

El reloj biológico confiere una ventaja adaptativa al permitir adelantarse a cambios ambientales cíclicos y al coordinar múltiples procesos metabólicos internos (Harmer et al., 2000; Krittika & Yadav, 2020). Incluso, animales que habitan en cuevas o viven de manera subterránea en ausencia de señales externas como el pez ciego de las cavernas (*Astyanax mexicanus*) o la rata topo desnuda (*Heterocephalus glaber*), que perdieron pigmentación y la visión a lo largo de la evolución, aun retienen algunos patrones de actividad circadianos, lo que sugiere la importancia del reloj para la supervivencia (Espinasa & Jeffery, 2006; Riccio & Goldman, 2000). En plantas, el reloj biológico permite mayores tasas de fotosíntesis y un crecimiento más rápido (Dodd et al., 2005). También permite el *gating* de la defensa a estreses abióticos y bióticos, de manera de coordinar el gasto en defensa con el resto de la actividad celular minimizando los efectos en el

crecimiento (Seo & Mas, 2015). El periodo de distintas accesiones de *Arabidopsis* correlaciona con el largo del día en la latitud de origen, lo que sugiere que la adaptación local confiere ventajas adaptativas (Michael et al., 2003)

Para facilitar su estudio, el reloj biológico suele dividirse en tres partes (Figura 1):

- *Vías de entrada:* involucra a las vías de señalización que censan ciclos de luz-oscuridad y oscilaciones en la temperatura, y entrenan al reloj biológico al periodo correspondiente. En el proceso intervienen múltiples familias de fotorreceptores: los Fitocromos (Phy) que censan luz roja; los Criptocromos (Cry), ZEITLUPE (ZTL), LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2), FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT y F-BOX 1 (FKF1) que detectan luz azul, y UV RESISTANCE LOCUS8 (UVR8) que responde a la luz UV B (Chen et al., 2004).
- *Oscilador central:* es el conjunto de genes que, una vez entrenados por la vía de entrada, mantienen un ritmo de 24h aun en ausencia de señales externas (Harmer, 2009). En las siguientes secciones se desarrollará como se regula a nivel transcripcional y post-transcripcional.
- *Outputs:* incluye a todos los procesos moleculares y fisiológicos que son regulados rítmicamente por el oscilador central. Entre los procesos más estudiados se encuentran el crecimiento, la floración, la regulación metabólica y las respuestas al estrés (Barak et al., 2000; Greenham & McClung, 2015).

Vale aclarar que esta división es una simplificación para el estudio del reloj. El sistema circadiano es una compleja red génica donde no siempre es trivial asignar a cuál de las partes pertenece un gen, y donde cada una las partes retroalimenta y modula la actividad de las otras (Harmer, 2009).

Regulación transcripcional del oscilador central

El oscilador central de *Arabidopsis* es una red de genes basada en múltiples bucles de retroalimentación interconectados, en los que un conjunto de genes actúa como represores y

activadores transcripcionales que se regulan mutuamente, así como la expresión de miles de genes controlados por el reloj (Nakamichi, 2020) (Figura 2).

Al amanecer, *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* y *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)*, dos factores de transcripción que contienen un dominio MYB, alcanzan su pico de expresión y reprimen su transcripción, así como la de los genes de la tarde y la noche que comprenden la familia *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR (PRR)* y el *Evening Complex (EC)* (Kamioka et al., 2016; Lu et al., 2012; Nagel et al., 2015).

Más tarde durante la mañana, los co-activadores *NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED GENE 1 (LNK1)* y *LNK2* interactúan con los activadores de transcripción de MYB único *REVEILLE 8 (RVE8)*, *RVE6* y *RVE4* (Pérez-García et al., 2015; Xie et al., 2014), y promueven

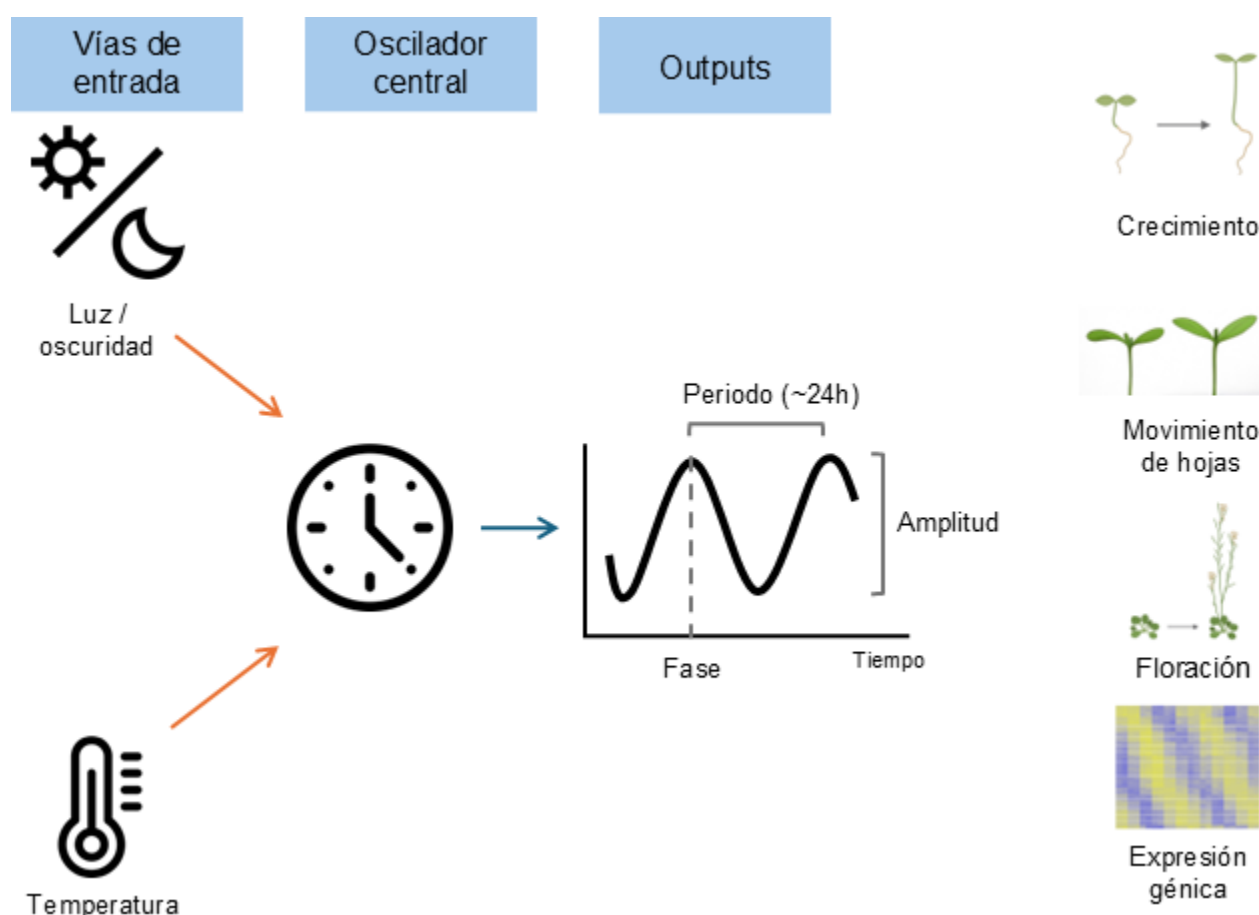


Figura 1. El reloj biológico se separa en vías de entrada, oscilador central y outputs. Las vías de entrada entrenan al oscilador central a un periodo determinado por los ciclos de luz-oscuridad y de temperatura ambiente, que en condiciones normales es de 24h. El oscilador central es una red génica que se autorregula y que luego de ser entrenado es capaz de mantener oscilaciones circadianas en sus niveles de expresión aun en ausencia de señales externas. De manera similar, regula las oscilaciones de múltiples genes involucrados en distintos procesos fisiológicos. Es así como el reloj controla múltiples *outputs*, como el crecimiento, el movimiento de hojas, la expresión génica y la floración. Cada output tiene un periodo, fase y amplitud.

la expresión de *PRR5*, *TOC1* (también conocido como *PRR1*) y el miembro del *evening complex* (EC) *EARLY FLOWERING 4* (ELF4) (Ma et al., 2018). *LIGHT-REGULATED WD 1* (LWD1) y LWD2 integran otra familia de activadores. LWD1 se une a los promotores de *CCA1*, *PRR9*, *PRR5* y *TOC1* promoviendo su expresión (Y. Wang et al., 2011; J. F. Wu et al., 2016).

A lo largo del día, los miembros de la familia PRR, comenzando con *PRR9* y terminando con *PRR1/TOC1*, alcanzan su pico de expresión respectivo y suprimen secuencialmente la expresión de *LHY* y *CCA1*. A su vez, los PRR se reprimen entre si (Huang et al., 2012; Nakamichi et al., 2010).

GIGANTEA (GI) es otro componente del reloj biológico cuyo pico de expresión es aproximadamente 8h después del amanecer. La proteína carece de dominios bien definidos, pero es necesaria para el funcionamiento del reloj (Martin-Tryon et al., 2007). GI activa la expresión de *CCA1* y *LHY*, cuyas proteínas, junto con *TOC1*, reprimen a *GI* (Huang et al., 2012; Lu et al., 2012; Mizuno et al., 2014). *PRR9*, *PRR7* y *GI* han sido caracterizado no solo en su rol dentro del oscilador central, sino que también como parte de las vías que incorporan información lumínica y térmica al reloj (Gould et al., 2006; Kolmos et al., 2014; Nagel et al., 2014; Salomé et al., 2005).

Por la noche, *EARLY FLOWERING 3* (ELF3), ELF4 y *LUX ARRHYTMO* (LUX) se asocian formando el EC. El EC mantiene la represión de *PRR9*, *PRR7*, *PRR5*, *GI* y del propio *LUX* (Chow et al., 2012; Dixon et al., 2011; Helfer et al., 2011; Herrero et al., 2012; Mizuno et al., 2014). La represión de los *PRR* activa indirectamente la expresión de *CCA1* y *LHY*, que, hacia el final de la noche reprimen el EC y el ciclo comienza de nuevo.

Una cantidad creciente de evidencia indica que, además del control transcripcional de la red de genes del reloj, los mecanismos post-transcripcionales también juegan un papel clave en la modulación de la función de los genes centrales del reloj (Beckwith & Yanovsky, 2014). Sin embargo, aunque conocemos en detalle los factores que regulan la red circadiana a nivel transcripcional, apenas estamos comenzando a identificar y caracterizar los factores y vías que controlan esta red a nivel post-transcripcional.

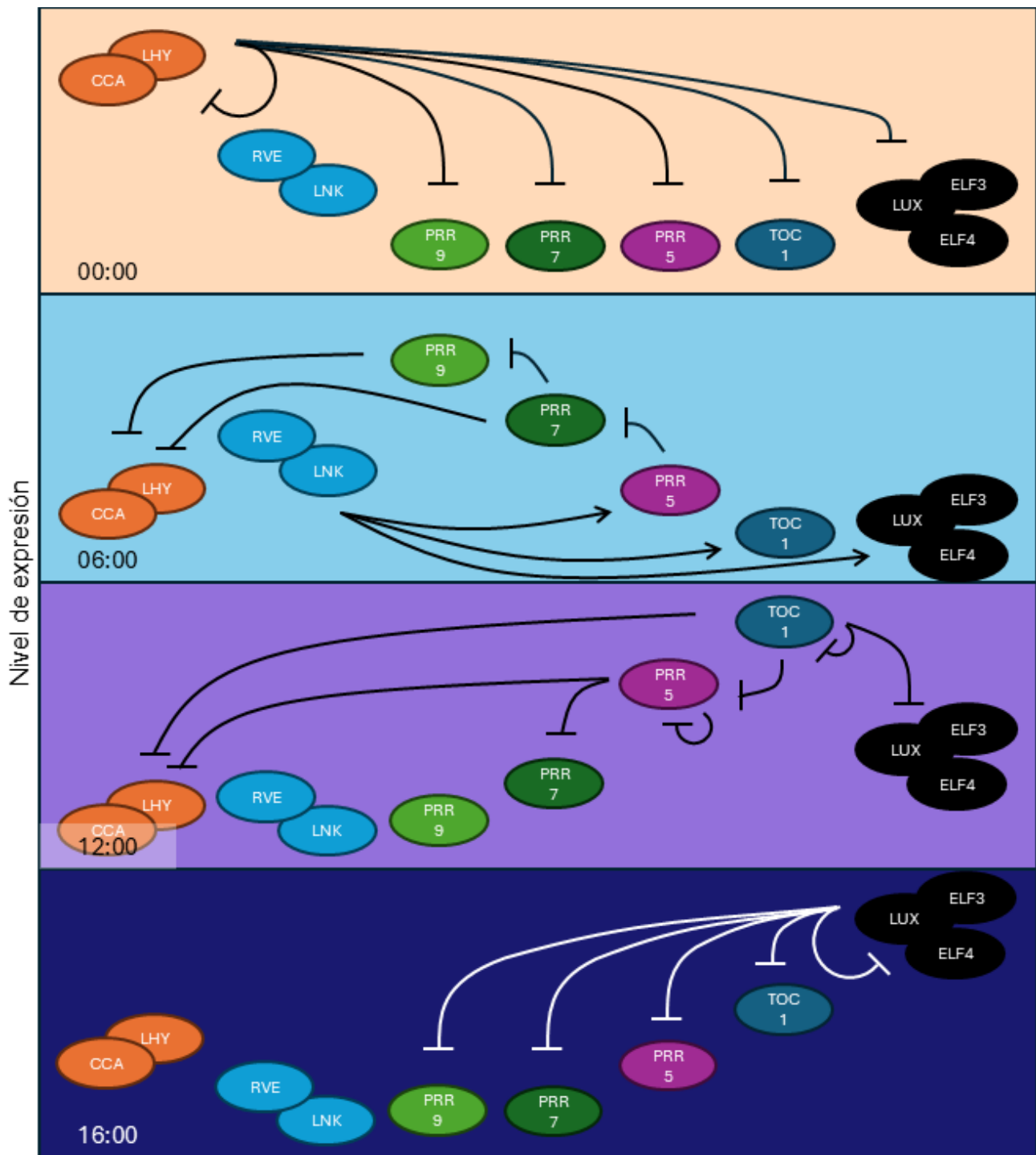


Figura 2. Los genes del oscilador central se regulan mutuamente manteniendo un periodo de 24h. Se muestran los genes más relevantes del oscilador central. Al amanecer, CCA1 y LHY se encuentran en su pico máximo de expresión, y reprimen a los PRR, al EC y a sí mismos. A lo largo del día, los PRR se desreprimen y alcanzan su expresión máxima secuencialmente empezando por PRR9, PRR7, PRR5, y por último TOC1. Esto es en parte promovido por los genes RVE, que en asociación con los genes LNK, activan la transcripción de PRR5, TOC1 y miembros del EC. Durante la noche, el EC alcanza su pico máximo de expresión y reprime a los PRR, pero no a CCA1 y LHY. Por esto, la expresión de CCA1 y LHY comienza a aumentar hacia el final de la noche, y el ciclo vuelve a empezar. En cada recuadro se indican las horas desde el amanecer.

El oscilador central regula múltiples procesos

La cantidad de procesos fisiológicos influenciados por el reloj biológico muestran su importancia. Existen procesos regulados diariamente, como la fotosíntesis, el crecimiento y la liberación de compuesto volátiles, y estacionalmente, como la transición del crecimiento vegetativo al reproductivo y el comienzo de la dormancia en la semilla (Harmer, 2009).

A nivel molecular, uno de los principales procesos que controla el reloj es la expresión génica. El 89% del transcriptoma de *Arabidopsis* es capaz de oscilar circadianamente en respuesta al reloj biológico, fotoperiodos y/o termoperiodos (Michael et al., 2008). A diferencia de los ciclos de luz y oscuridad o ciclos de temperaturas, el reloj biológico es una señal endógena. Para distinguir que transcriptos oscilan específicamente debido al reloj biológico, las plantas son entrenadas bajo fotoperiodos y luego transferidas a condiciones de luz y temperatura constantes. Una vez en condiciones ambientales constantes, se toman muestras cada un dado intervalo del tiempo durante al menos un día, y en esas muestras se miden que transcriptos oscilan aun en condiciones ambientales constantes. En *Arabidopsis*, ~37% del transcriptoma oscila circadianamente (Romanowski et al., 2020).

Dos procesos regulados por el reloj biológico que cobran particular importancia en el contexto actual de cambio climático son la floración y la termomorfogénesis. La floración es la transición de la etapa de crecimiento vegetativo a la de crecimiento reproductivo. Este es un paso irreversible en la vida de las plantas anuales como *Arabidopsis*, por lo que es clave controlar cuando ocurre para garantizar su éxito reproductivo. Existen al menos seis vías que regulan la floración: la vía fotoperiódica, la de vernalización, la de giberelinas, la autónoma, la de la temperatura ambiente, y la de la edad (Mouradov et al., 2002). De todas ellas, la vía fotoperiódica es controlada por el reloj biológico.

Como su nombre lo indica, la vía fotoperiódica regula la floración según la cantidad de horas de luz que tienen los días. En condiciones naturales, el fotoperiodo alcanza su mínimo durante el solsticio de invierno, y de ahí comienza a alargarse diariamente hasta alcanzar su máximo en el solsticio de verano. La vía fotoperiódica evita que la planta florezca prematuramente limitando el crecimiento vegetativo y la acumulación de suficientes nutrientes, y que florezca demasiado tarde, poniendo las semillas en situación ambientales adversas (Johansson & Staiger, 2015). Las plantas se clasifican en plantas de día largo, día corto o neutrales dependiendo de si florecen cuando el fotoperiodo supera, está por debajo o no depende de un umbral específico (Andrés & Coupland, 2012).

CONSTANS (CO) es un gen maestro de la vía fotoperiódica que, en plantas de día largo, como *Arabidopsis*, activa la transcripción del florígeno *FLOWERING LOCUS T (FT)*. El ARNm de *CO* está bajo el control del reloj biológico y oscila circadianamente con un pico hacia el anochecer. Su proteína es estable en luz y se degrada rápidamente en la oscuridad. En días cortos, el pico máximo del ARNm de *CO* se da durante la noche, por lo que la proteína de *CO* no se acumula lo suficiente para activar la transcripción de *FT*. En cambio, en días largos el anochecer se retrasa por lo que *CO* se puede acumular y activar la transcripción de *FT* (Greenham & McClung, 2015).

El largo del fotoperiodo y su variación diaria cambia según la latitud. Cerca del ecuador el fotoperiodo es de alrededor de 12h de luz y 12h de oscuridad a lo largo del año, mientras que al acercarse a los polos la diferencia entre el fotoperiodo de invierno y de verano es más grande. Este proceso es particularmente importante para los cultivos. Múltiples cultivos fueron llevados fuera de su rango originales de latitudes durante la domesticación, lo que favoreció la selección de variantes alélicas de genes de reloj que optimizaron el rendimiento en sus nuevas latitudes (Steed et al., 2021).

Otro de los procesos regulados por el reloj biológico es la termomorfogénesis. Este término refiere a los cambios en el desarrollo y la morfología de la planta provocado por un rango de temperaturas cálidas no estresantes, que, en *Arabidopsis*, se encuentra alrededor de los 28 °C (Casal & Balasubramanian, 2019). La planta despliega un conjunto de cambios morfológicos que involucra la elongación de hipocótilos, tallos, peciolo y raíces, hiponastia foliar¹ y la reducción del tamaño de la lámina foliar (Casal & Balasubramanian, 2019). Estos cambios permiten que las plantas aumenten su tasa de evaporación de agua disminuyendo su temperatura (Crawford et al., 2012). En *Arabidopsis* se han descrito tres termosensores: ELF3, PhyB y PYTOCHROME INTERACTING FACTOR 7 (PIF7) (Casal et al., 2025). Los tres están estrechamente ligados con el reloj biológico. PhyB es parte de la vía de entrada, ELF3 integra el oscilador central, y el transcritto de PIF7 es un *output* que oscila circadianamente. Otro actor importante es PIF4, un regulador maestro de la termomorfogénesis, cuyos niveles de expresión también oscilan circadianamente y son activados por la temperatura. PIF4 activa la biosíntesis de auxinas, lo que causa los cambios morfológicos observados.

Al amanecer, CCA1 se une al promotor de *PIF4* y activa su transcripción, mientras que durante la tarde y la noche los PRR reprimen la expresión de *PIF4* (Nakamichi et al., 2012; Q. Sun et al., 2019). A su vez, TOC1 interacciona físicamente con PIF4, inactivándolo y evitando la

¹ Respuesta adaptativa de las plantas que consiste en curvar las hojas hacia arriba, alejándose del suelo.

respuesta de termomorfogénesis (J. Y. Zhu et al., 2016). Durante la noche bajo temperaturas templadas, ELF3 se une al promotor de *PIF4* inhibiendo su transcripción (Box et al., 2015). Pero, si la planta se encuentra en el rango de temperaturas termomorfogénicas, ELF3 forma agregados insolubles que no son capaces de unirse al ADN, lo que desreprime a *PIF4* (Jung et al., 2020).

Por su lado, *PIF7* es, al igual que *PIF4*, un factor de transcripción que regula la respuesta termomorfogénica (Fiorucci et al., 2020). El ARNm de *PIF7* forma una estructura secundaria de horquilla en su 5'UTR que impide que se traduzca eficientemente a temperatura ambiente, pero que a 28 °C relaja su estructura, aumentando su traducción y desencadenando la respuesta termomorfogénica (Chung et al., 2020).

El caso de *PIF7* es un ejemplo de regulación post-transcripcional de un *output* transcripcional del reloj biológico. Los niveles y oscilaciones circadianas del transcrito de *PIF7* prácticamente no varían entre 22 °C y 28 °C, por lo que presumiblemente todo su efecto en la regulación de la termomorfogénesis se deben a variaciones en la eficiencia traduccional. De manera similar, múltiples componentes asociados al oscilador central son regulados a nivel transcripcional y post-transcripcional para garantizar las oscilaciones circadianas y el funcionamiento del reloj.

Regulación post-transcripcional de los ritmos circadianos

La regulación transcripcional es probablemente la capa más y mejor estudiada del funcionamiento molecular del reloj biológico. Sin embargo, en los últimos 15 años se reportaron múltiples mecanismos post-transcripcionales necesarios para mantener el reloj en hora. Entre estos mecanismos se encuentran el *splicing* alternativo (SA), la poliadenilación alternativa (PAA), la degradación mediada por codones sin sentido (NMD por sus siglas en inglés, *non-sense mediated decay*), la modificación de N6-metiladenosina (m6A) y la exportación nuclear de ARNm (Beckwith & Yanovsky, 2014) (Figura 3).

Luego de ser sintetizados, los ARNm son exportados del núcleo hacia el citoplasma. Mutantes de distintos componentes involucrados en el transporte de ARN muestran una variedad de fenotipos asociados al crecimiento, desarrollo, inmunidad, y resistencia al estrés biológico (Ehrnsberger et al., 2019). El componente del nucleoporo NUCLEOPORIN205 (NUP205) es necesario para que los ARNm de genes del reloj no queden retenidos en el núcleo, y la mutante *nup205* presenta fenotipo de reloj (de Leone et al., 2020). Plantas mutantes de

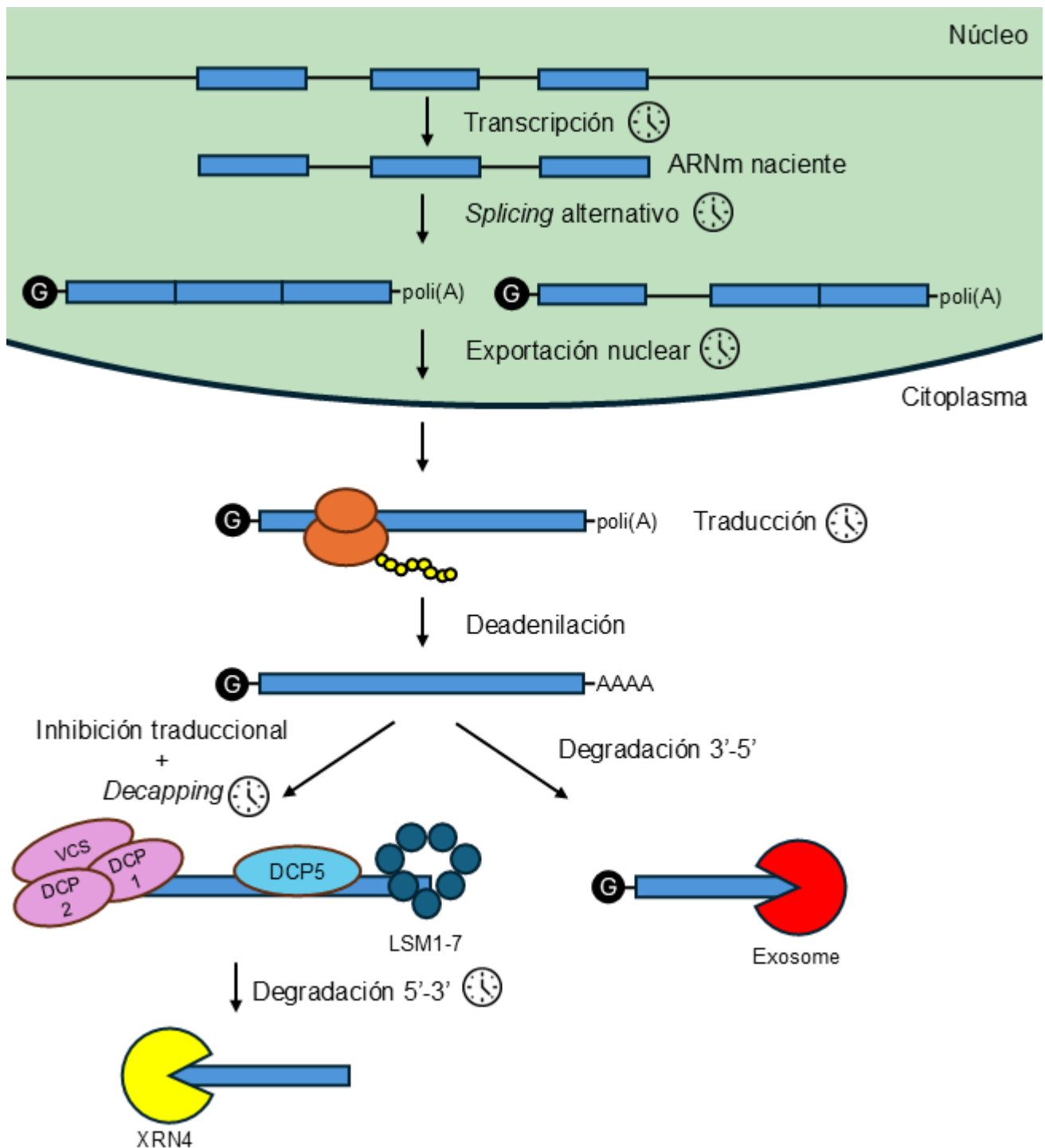


Figura 3. **Capas de regulación de ARNm circadianos.** Las oscilaciones circadianas en los niveles de expresión de los ARNm pueden ser el resultado de alguno de los pasos o una combinación de los pasos esquematizados. La síntesis de ARNm puede ser oscilar circadianamente debido a la presencia de distintos activadores y represores de la transcripción. Mediante *splicing* alternativo se pueden generar distintas isoformas que varíen en su funcionalidad y/o estabilidad. Una vez en el citoplasma, la traducción del ARNm está generalmente en fase a los niveles de ARNm, aunque no necesariamente. Por último, los ARNm son conducidos a la vía de degradación. Defectos tanto en el *decapping* como en la degradación 5'-3' producen alteraciones en el funcionamiento del reloj biológico. El símbolo del reloj indica procesos donde hay evidencia de regulación circadiana sobre transcritos del reloj en *Arabidopsis*.

expresión nula del gen *HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES1 (HOS1)*, que codifica una E3 ubiquitina ligasa, también acumula en el núcleo transcritos de genes del reloj biológico (MacGregor et al., 2013). Los mecanismos precisos que regulan la maquinaria de exportación de ARN aún se desconocen (Ehrnsberger et al., 2019).

A su vez, los ARNs interaccionan con múltiples proteínas que pueden regular su disponibilidad y estabilidad. Por ejemplo, GLYCINE RICH PROTEIN 7 (GRP7), una proteína de unión al ARN cuya expresión es controlada por el reloj, se une al ARNm de *LIGHT HARVESTING CHLOROPHYLL A/B-BINDING PROTEIN 1.1 (LHCB1.1)*, también controlado por el reloj, modulando su tasa de degradación (Lewinski, Steffen, et al., 2024). Otras proteínas pueden unirse al ARN y alterar su estructura química, afectando su estabilidad. Este es el caso del receptor de luz azul Cry2, que interactúa con metiltransferasas de ARN y que, en conjunto, metilan aproximadamente el 10% del transcriptoma —donde están sobre-representados transcritos del reloj biológico— brindándoles mayor estabilidad (X. Wang et al., 2021).

También hay ejemplos de regulación post-traducciona. Los factores de transcripción ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5) y HY5 HOMOLOG (HYH) forman parte de la vía de entrada del reloj biológico, y sus niveles de proteína son regulados post-traduccionalmente por mecanismos desconocidos según la longitud de onda de la luz que recibe la planta (Hajdu et al., 2018). De manera similar, los niveles de proteína de CCA1 y LHY son regulados por la temperatura, degradándose rápidamente frente a estrés por frío (Kidokoro et al., 2021).

A nivel co-transcripcional se pueden generar distintas isoformas con distintas funcionalidades y/o vidas medias mediante los mecanismos de PAA y SA. En Arabidopsis, al menos 70% de los genes tienen distintas isoformas generadas por PAA y la luz regula la PAA en el ~30% del transcriptoma (Kubaczka et al., 2024; S. Zhu et al., 2020). También se reportó 3765 genes poseen dos o más isoformas generadas por PAA que oscilan en distintas fases bajo un fotoperiodo de 12h de luz – 12h de oscuridad, y que al menos 597 genes tienen eventos de PAA que oscilan circadianamente (Hou et al., 2021; Yang et al., 2020). Algunas mutantes de ciertos factores de corte y poliadenilación muestran defectos en sus oscilaciones circadianas de ARN (Lin et al., 2021; Xing et al., 2013). Sin embargo, la funcionalidad y relevancia biológica de las distintas isoformas producidas por PAA no han sido extensamente investigadas.

Probablemente el SA es la capa de regulación post-transcripcional más estudiada hasta el momento. Los transcritos de *CCA1*, *LHY*, *RVE8*, *PRR9*, *PRR7*, *PRR5*, *TOC1* y *ELF3* experimentan SA regulado por la temperatura, y las isoformas alternativas están sujetas a NMD a fin de controlar los niveles de expresión (James et al., 2012; Kwon et al., 2014). También se han

caracterizado factores de *splicing* o moduladores que impactan en la expresión y función de los genes del reloj. El factor de *splicing* SKI-INTERACTING PROTEIN (SKIP), involucrado en el reconocimiento de los sitios donores y aceptores de *splicing*, es necesario para la regulación del SA de los transcritos de *PRR7* y *PRR9* (X. Wang et al., 2012). Plantas mutantes para *SPLICEOSOMAL TIMEKEEPER LOCUS1 (STILP)* presentan a defectos en el *splicing* de intrones de *CCA1*, *LHY*, *PRR9*, *TOC1* y *GI* (Jones et al., 2012). PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE 5 (PRMT5), una metil-transferasa de argininas cuyos blancos de metilación incluyen proteínas del espliceosoma, es necesaria para el correcto *splicing* del ARNm de *PRR9* (Deng et al., 2010; Sanchez et al., 2010). GEMIN2, involucrada en el ensamblado del espliceosoma, y Sm-like 4 (LSM4) y LSM5, dos componentes del espliceosoma, son metiladas por PRMT5, y también regulan los patrones de *splicing* de múltiples transcritos del reloj biológico como *TOC1*, *CCA1* y *PRR9* (Perez-Santángelo et al., 2014; Schlaen et al., 2015).

Todas las mutantes de expresión nula *hos1*, *nup205*, *skip*, *stilp*, *prmt5*, *gemin2*, *lsm4*, y *lsm5* presentan periodos de oscilación circadiano más largo que el de plantas silvestres. Esto es llamativo, dado que entre las plantas mutantes de componentes del oscilador central no se observa la misma tendencia. Por ejemplo, la mutante *toc1* tiene periodo corto, mientras que *elf3* es arrítmica y *lnk1 lnk2* tiene periodo largo. El caso de XAP5 CIRCADIAN TIMEKEEPER (XCT), una proteína de función molecular desconocida es paradójico. La mutante *xct* tiene periodo circadiano corto y presenta además defectos en el *splicing* (Martin-Tryon & Harmer, 2008). Sin embargo, los defectos en el reloj y en el control del *splicing* parecieran no estar relacionados (H. Zhang et al., 2023). Aun no queda claro si este patrón es mera coincidencia o si hay alguna razón por la que las mutantes de reguladores post-transcripcionales presentan periodos de oscilación largos.

Las antes mencionadas *LSM4* y *LSM5* no solo están involucradas en el proceso de *splicing*. Estas proteínas forman dos complejos heptaméricos con funciones distintas. Por un lado, son miembros del complejo nuclear LSM2-8, que forma parte del complejo ribonucleoproteico nuclear pequeño U6, que es el centro catalítico del espliceosoma (Perea-Resa et al., 2012). Por otro lado, integran el complejo citoplasmático LSM1-7, involucrado en la *decapping* de ARNm (Montemayor et al., 2020). El genoma de *Arabidopsis* presenta duplicaciones de los genes *LSM1*, *LSM3* y *LSM6* (B. B. Wang & Brendel, 2004). Las mutaciones en *LSM4* y *LSM5* alargan el período de los ritmos circadianos en *Arabidopsis* debido a defectos en el *splicing* de un subconjunto de genes del oscilador central (Perez-Santángelo et al., 2014). Pero parte de su fenotipo también podría deberse a defectos en el *decapping*. En línea con esto, la doble mutante *lsm1a lsm1b*

también presenta un fenotipo alterado de los ritmos circadianos, indicando que el control sobre el *decapping* de ARNm es necesario para el funcionamiento reloj biológico (Careno et al., 2022).

Los fenotipos de las mutantes *lsm1*, *lsm4* y *lsm5* sugieren también un rol de la estabilidad del ARN en la regulación de los ritmos circadianos. En un estudio que buscaba identificar ARNm inestables mediante el uso de microarreglos, se observó que los genes controlados por el reloj circadiano son particularmente inestables (Gutierrez et al., 2002). Además, los transcritos controlados por el reloj, *CCR-LIKE (CCL)* y *SENESCENCE ASSOCIATED GENE 1 (SEN1)*, son regulados de manera diferencial en cuanto a la estabilidad de ARNm en distintos momentos del día (Lidder et al., 2005). Asimismo, la luz modula la estabilidad del ARNm de *CCA1*, lo que contribuye al ajuste del reloj (X. Wang et al., 2021; Yakir et al., 2007). Para analizar las bases moleculares de la regulación de la estabilidad de los transcritos circadianos es conveniente investigar en mayor profundidad la maquinaria de degradación de ARN.

Estabilidad y degradación del ARN

La estabilidad del ARN varía mucho entre genes e isoformas, y, para una misma isoforma puede cambiar abruptamente frente a señales internas o externas (Dowdle & Lykke-Andersen, 2025). La maquinaria de degradación de ARN consiste en cinco complejos con distintas actividades ribonucleolíticas: *decapping*, de-adenilación, cortes endonucleolíticos, degradación exonucleolítica en el sentido 5'-3', y en el sentido 3'-5' (Schoenberg & Maquat, 2012) (Figura 3). La combinación y el orden específico de estas cinco actividades depende del ARN sustrato y de las condiciones ambientales y celulares, aunque los mecanismos específicos que la regulan no son del todo entendidos. La modulación de la estabilidad de un ARN puede ser provocada por microARNs, proteínas de unión al ARN que reconocen secuencias nucleotídicas específicas o que interaccionan con proteínas que recubren el ARN (Dowdle & Lykke-Andersen, 2025).

La estabilidad de un transcrito también está dada en parte por los codones que lo componen. Dos codones sinónimos pueden conferir distintos niveles de estabilidad a un ARNm. Por ejemplo, los codones CGN, AGA y AGG codifican para arginina, y, en *Xenopus*, CGU y CGC confieren estabilidad al ARNm, mientras que AGA lo desestabiliza (Bazzini et al., 2016). Los codones son clasificados en óptimos y no-óptimos según estabilicen o desestabilicen a los mensajeros (Q. Wu & Bazzini, 2024). Los codones no-óptimos disminuyen la velocidad de la traducción, lo que favorece la degradación del ARNm siendo traducido (Presnyak et al., 2015;

Yan et al., 2016; Yu et al., 2015). El principal motivo por el cual un codón no-óptimo disminuye la velocidad de traducción es la baja abundancia del ARN de transferencia (ARNt) con el anticodón respectivo (Bazzini et al., 2016; Presnyak et al., 2015; Q. Wu et al., 2019). Otros motivos que influyen son la relación entre ARNt cargados y no cargados, y modificaciones post transcripcionales sobre el ARNt (Gingold et al., 2014; Goodarzi et al., 2016; Orellana et al., 2021; Passarelli et al., 2022). Aún se desconocen los mecanismos encargados de detectar la baja de la velocidad del ribosoma y activar la degradación del ARNm en cuestión, aunque hay evidencia que sugieren una competencia por unirse al ribosoma entre ARNt y factores de degradación (Q. Wu & Bazzini, 2024). Frente a un ARNt poco abundante, el ribosoma disminuiría su velocidad lo que podría facilitar la unión de factores de degradación. Finalmente, en levaduras, los ARNm son deadenilados, *decapeados* y degradados por la vía 5'—3', mientras que en otros eucariotas distintas vías de degradación actuarían según el ARNm (Buschauer et al., 2020; Mishima & Tomari, 2017; Richter & Collier, 2015). Además de la estabilidad del ARNm, la composición específica de codones influye también el estado de la cromatina y consecuentemente la transcripción, la eficiencia de traducción, la localización celular de los ARNm y el plegado de las proteínas (Bazzini et al., 2016; Courel et al., 2019; Yu et al., 2015; Z. Zhou et al., 2016).

Dos vías principales de degradación de ARNm moldean la estabilidad de los transcritos. Estas vías comienzan con la conversión de un ARNm poliadenilado en oligoadenilado mediante el acortamiento de la cola poli(A). Luego, los ARNm pueden ser sustrato de la vía de degradación 3'-5' y ser degradados por el complejo de múltiples subunidades llamado exosoma o, alternativamente, se puede eliminar el *cap* 5' m⁷G por el complejo de *decapping* y los transcritos decapados pueden ser degradados por exorribonucleasas 5'-3' (XRNs) (X. Zhang & Guo, 2017). En *Arabidopsis*, el complejo de *decapping* consiste en DECAPPING 1 (DCP1), DCP2 y VARICOSE (VCS), de los cuales solo DCP2 posee actividad de *decapping* (Iwasaki et al., 2007; J. Xu et al., 2007). El genoma de *Arabidopsis* codifica tres XRNs: XRN2 y XRN3 de localización nuclear, y la citoplasmática XRN4, que es el homólogo funcional de XRN1 en levaduras y mamíferos, y ortólogo de XRN2 y XRN3 (Kastenmayer & Green, 2000). El papel principal de XRN4 es la degradación de ARNm, la cual debe estar precedida por el *decapping* o un corte endonucleolítico. Hay evidencia de que ambas vías de degradación controlan la función del reloj en organismos eucariotas. Se ha descrito un rol para el componente catalítico del exosoma en el control de los ritmos circadianos en *Neurospora* (Guo et al., 2009), y para XRN4 en *Arabidopsis* (Careno et al., 2022; Prasetyaningrum et al., 2023).

Previo a la remoción del *cap* 5' y degradación, los ARNm pueden ser reprimidos traduccionalmente y transportados hacia *processing bodies* (*p bodies*). En Arabidopsis se han caracterizado los represores traduccionales RNA HELICASE 6 (RH6), RH8, RH12, PROTEIN ASSOCIATED WITH TOPOISOMERASE 1 (PAT1) y DCP5 (Chantarachot et al., 2020; Roux et al., 2015; J. Xu & Chua, 2009). Todas estas proteínas son necesarias para la formación de *p bodies*, los cuales se generan por separación de fases y se caracterizan por contener a la maquinaria de *decapping* y degradación del ARNm (Maldonado-Bonilla, 2014). La tasa de degradación de ARNm es mucho más alta dentro de *p bodies* que fuera (Blake et al., 2024).

Defectos en regular la vida media del transcriptoma y la acumulación de transcritos con *cap* puede conducir a severos defectos en el desarrollo. Mutaciones en *DCP1*, *DCP2*, *VCS* y *LSM1* son letales en homocigosis (Careno et al., 2022; J. Xu et al., 2006). El fenotipo de letalidad se revierte en las dobles mutantes *dcp2 rdr6* y *vcs rdr6* (De Alba et al., 2015). Del mismo modo, la doble mutante *xrn4 ski2* que presentan mutaciones en componentes de ambas vías de degradación de ARN —la 5'-3' y la 3'-5'— es letal embrionaria, pero no así la triple mutante *xrn4 ski2 rdr6* (X. Zhang et al., 2015). Esto se debe a que estas mutantes acumulan niveles excesivos de ARNs endógenos que terminan por entrar a la vía de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS, por sus siglas en inglés) (Gregory et al., 2008; Krzyszton & Kufel, 2022). El PTGS es un mecanismo por el cuál ARNs presentes en altos niveles son convertidos en ARN doble cadena por RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE (RDR6), los cuales son procesados por DICER-LIKE ENZYME (DCL4) dando como resultado ARN de interferencia pequeños de 21nt (siRNA por sus siglas en inglés), que cuando se originan a partir de ARNm endógenos se denominan rqc-siRNAs o ct-siRNAs (Kim, 2023). No todos los ARN son capaces de generar rqc-siRNAs. Características como la función, el largo y el contenido de GC determinan la capacidad de un dado ARNm de generar rqc-siRNAs (Feng et al., 2024).

Las mutantes *dcp5* y *lsm1* son menos susceptibles a infecciones virales que plantas silvestres, pero el fenotipo se revierte en las dobles mutantes *dcp5 rdr6* y *lsm1 rdr6* (Hoffmann et al., 2022). Esto probablemente se deba a que DCP5 y LSM1 protegen al ARN viral, evitando que sea sustrato de RDR6 y que entre en la vía de PTGS. En condiciones no infectivas, se ha observado que en la mutante *lsm1* hay un aumento en la producción de rqc-siRNAs (Krzyszton & Kufel, 2022), y, aunque aún no se ha estudiado, esto también podría ocurrir en *dcp5*. DCP5 es una proteína de dominio LSM que regula indirectamente el *decapping* de ARNm a través de la formación de *p bodies*. DCP5 no tiene actividad de *decapping* ni modula la de DCP2, pero interactúa con DCP1, DCP2 y VCS, y conduce a la formación del complejo de *decapping* y su

ensamblaje en *p bodies* donde ocurre la degradación de ARNm (J. Xu & Chua, 2009). DCP5 tiene homólogos en todos los eucariotas, y sus mecanismos de acción molecular fueron extensamente estudiados en su homólogo en levaduras, Suppressor of Clathrin Deficiency 6 (Scd6). Scd6 forma sobre los ARNm un complejo ribonucleoproteico en conjunto con eIF4E/G, lo que evita que se reclute el complejo de pre-iniciación de la traducción 43S (Rajyaguru et al., 2012). Scd6 afecta tanto los niveles de ARNm como de proteína (Zeidan et al., 2018). Para regular los niveles de proteína es necesaria la presencia de DCP2, mientras que para regular los niveles de ARNm son necesarios tanto DCP2 como la helicasa de ARN Dhh1 (Zeidan et al., 2018). Tanto DCP5 como sus homólogos poseen tres dominios distintos: un dominio Lsm hacia el N-terminal, y, en el extremo C terminal, un dominio FDF flanqueado por dos dominios RGG (arginina-glicina-glicina) (D. Roy & Rajyaguru, 2018). Los tres dominios tienen el potencial de unirse al ARN. Los motivos RGG están intercalados con aminoácidos aromáticos, los cuales también pueden contribuir a la interacción entre ARN y proteínas. El dominio FDF puede interaccionar tanto con ARN como con residuos cargados y, en Arabidopsis, es esencial para su interacción con DCP1 y DCP2 (J. Xu & Chua, 2009) Por su parte, el dominio Lsm es capaz de unirse al ARN, aunque en el homólogo humano de DCP5 participa en la interacción con otras proteínas del complejo de silenciamiento de ARNm (Brandmann et al., 2018).

La traducción y la degradación de ARNm son dos procesos altamente interconectados que forman una intrincada red regulatoria en la cual DCP5 es un actor clave. Estos procesos son particularmente relevantes en condiciones en las cuales las plantas deben reprogramar rápidamente una proporción alta su transcriptoma, por ejemplo, frente a señales externas como cambios abruptos en las condiciones lumínicas o de temperatura ambiente, o cambios en el desarrollo, como la germinación (Bonnot & Nagel, 2021; Careno et al., 2023; Matsui et al., 2017; Tognacca et al., 2019). Normalmente estos procesos se encuentran afectados en plantas mutantes para componentes de las vías de degradación de ARN (Basbouss-Serhal et al., 2017; G. J. Jang et al., 2019; Merret et al., 2013). Otro caso donde la regulación de la estabilidad y disponibilidad del ARN parece ser importante es el de los transcriptos controlados por el reloj biológico, los cuales exhiben grandes fluctuaciones en sus niveles de expresión (Heck & Wilusz, 2018; Mills et al., 2018). Los niveles de expresión de estos transcriptos oscilan a lo largo de un día y existen casos extremos de ARNm que diariamente aumentan su expresión más de 100 veces para luego descender nuevamente a sus niveles basales. Estas oscilaciones de gran amplitud sugieren un rol activo de la maquinaria de degradación de ARN en la regulación, como efectivamente se ve en las alteraciones en el funcionamiento del reloj en las mutantes *xrn4*, *lsm1*,

lsm4 y *lsm5* (Careno et al., 2022; Perez-Santángelo et al., 2014). En la presente tesis se describe como DCP5 es necesaria para el funcionamiento del reloj, reforzando la idea que las oscilaciones circadianas están fuertemente reguladas a nivel post-transcripcional.

Hipótesis y objetivos

La presente tesis parte de la hipótesis de que las oscilaciones de los niveles de ARNm controladas por el reloj biológico dependen de una fina coordinación entre los procesos de síntesis y de degradación, y que perturbaciones en la regulación de la estabilidad del ARNm alteran el funcionamiento del reloj biológico.

Dado que los mecanismos que controlan la estabilidad del ARNm han sido menos explorados en comparación con aquellos que regulan su síntesis, el objetivo general de este trabajo es profundizar en el conocimiento de los mecanismos post-transcripcionales que aseguran el correcto funcionamiento del reloj biológico en *Arabidopsis thaliana*.

Para ello, se propone el estudio de diversos factores reguladores, tanto elementos en *cis* como factores en *trans*, que determinan dicha estabilidad. En particular, se plantean los siguientes objetivos específicos: (i) analizar comparativamente la estabilidad de transcriptos que exhiben oscilaciones circadianas con respecto al resto del transcriptoma; (ii) investigar la influencia de elementos reguladores en *cis* y factores proteicos en *trans* sobre la estabilidad de ARNm específicos; y (iii) caracterizar, a nivel molecular y fisiológico, la función de los factores en *trans* relevantes para la regulación circadiana de la estabilidad del ARNm.

Materiales y métodos

Análisis de vidas media y codones óptimos

Los transcriptos controlados por el reloj (TCR) fueron tomados de Romanowski et al., (2020). Brevemente, Romanowski et al., 2020 realizó una secuenciación masiva de ARN (RNA-seq, por sus siglas en inglés) de muestras tomadas cada 4h durante 2 días. Aquellos transcriptos que muestran oscilaciones estadísticamente significativas con un periodo de ~24h son considerados TCR. En esta tesis definimos los TCR de alta amplitud como aquellos transcriptos con una amplitud relativa mayor a 4, es decir, transcriptos cuyo pico máximo de expresión es al menos 4 veces más alto que su mínimo.

Las vidas medias calculadas a partir de los datos de Sorenson et al., (2018) y Chantarachot et al., (2020). En ambos trabajos, se realizó un experimento de inhibición de la transcripción con cordicepina para medir tasas de degradación del ARN. Luego del tratamiento, toman muestras en múltiples puntos temporales durante 8h (Sorenson et al.) o 2h (Chantarachot et al.). Con las muestras realizaron RNA-seq y a partir de los datos estimaron la tasa de decaimiento (α) para cada transcripto. En el presente trabajo se calcularon las vidas medias de los transcriptos como $\ln(2) / \alpha$.

Para calcular el coeficiente de estabilización (CE) de cada codón, se calculó la frecuencia de cada codón para cada transcripto utilizando la secuencia codificante de todos los transcriptos de Arabidopsis proporcionada por Ensembl Plants. Para los genes con múltiples isoformas anotadas, se escogió la isoforma 1. Luego el CE es estimado como el coeficiente de correlación de Pearson entre la vida media y la frecuencia de un dado codón para todos los transcriptos (Bazzini et al., 2016). Se estimó el CE como el promedio del CE estimado con los datos de Sorenson et al. (2018) y el CE con los datos de Chantarachot et al., (2020). Se consideraron codones óptimos a aquellos con un CE positivo, y no-óptimos a aquellos con un CE negativo.

Para calcular el *ratio* entre codones optimos y no-optimos, se contó para cada secuencia codificante la cantidad de codones de cada tipo, y luego se calculó el *ratio*.

Para calcular la optimización relativa (OR) se tomaron tres versiones de cada transcripto: la versión anotada, la versión optimizada y la versión de-optimizadas. Las versiones optimizadas y de-optimizadas se consiguieron sustituyendo cada codón presente en la secuencia codificante por el codón sinónimo con mayor o menor valor de CE, respectivamente. Luego, se calcula un

valor de optimización (O) como la sumatoria de todos los CE de los codones que componen un transcripto. Finalmente, se relativiza el valor de optimización de transcripto original entre 0 y 1, con $OR = (O_{original} - O_{de-optimizado}) / (O_{optimizado} - O_{de-optimizado})$.

Plantas y condiciones de crecimiento

Las plantas se cultivaron en macetas que contenían una mezcla de sustrato orgánico, vermiculita y perlita [0.5:1:1 (vol/vol)] a 22 °C bajo condiciones de días largos (LD; ciclos de 16 h de luz/8 h de oscuridad; 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 12:12 (ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad; 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), día corto (SD; ciclos de 8 h de luz/16 h de oscuridad; 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), o luz continua (LL; 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dependiendo del experimento. Los mutantes utilizados, incluyendo *dcp5-1* (SALK_106536) y *rdr6-11* (CS67870) fueron obtenidos del Centro de Recursos Biológicos de Arabidopsis (ABRC).

Ensayo de movimiento de hojas

Para el análisis del movimiento de las hojas, las plantas fueron sincronizadas bajo un fotoperiodo de días largos (ciclos de 16 h de luz/8 h de oscuridad), transferidas a luz blanca continua, y el ángulo del primer par de hojas se registró cada 1h durante 5–6 días usando el software Image J (imagej.nih.gov/ij/) o con LeafTion (gitlab.com/javieriserte/leaftion). Las estimaciones de los períodos se calcularon utilizando el software BioDare2 (biodare2.ed.ac.uk) y se analizaron mediante FFT-NLLS. El análisis estadístico se realizó usando una prueba t de Student de dos colas o un ANOVA de una vía, dependiendo del caso.

Ensayos reporteros con luciferasa

Las plántulas se cultivaron directamente en medio Murashige y Skoog ágar 0.8% suplementado con 1% de sacarosa en una placa de 96 pocillos. Se colocó una semilla por pocillo, y la placa se mantuvo en oscuridad a 4 °C durante 3 días. Luego, las plántulas se sincronizaron bajo un ciclo de días largos (16 h de luz/8 h de oscuridad). Después de 7 días, se le agregó luciferina a cada planta, se transfirió la placa a condiciones de luz y temperatura constantes (22 °C) y se colocó en un luminómetro para medir la bioluminiscencia emitida por cada plántula cada 2 h. Después de 5–6 días, se realizó el análisis de los datos utilizando el software Mikrowin 2000

(versión 4.29) (Mikrotek Laborsysteme). El modelo de luminómetro utilizado fue el lector de microplacas Centro LB-960 (Berthold Technologies). Las estimaciones de los períodos se calcularon con el software BioDare2 (biodare2.ed.ac.uk) y se analizaron mediante FFT-NLLS. El análisis estadístico se realizó utilizando una prueba t de Student de dos colas.

Ensayos de floración

Para el análisis del tiempo de floración, las plantas se cultivaron bajo condiciones de días largos (16 h de luz/8 h de oscuridad) o día corto (8 h de luz/16 h de oscuridad) a una temperatura constante de 22 °C. El tiempo de floración se estimó contando el número de hojas de la roseta en el momento de la floración. El análisis estadístico se realizó utilizando una prueba t de Student de dos colas o un ANOVA de una vía, dependiendo del caso.

Ensayos de largo de hipocótilos

Para el análisis de largo de hipocótilos las plantas fueron sembradas en tierra, estratificadas 3 días en oscuridad a 4 °C, y luego transferidas a una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 12:12 (ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad) a 22 °C. Al cabo de 2 días la mitad de las plantas permanecieron en las mismas condiciones y la otra mitad fue transferida a otra cámara de crecimiento con el mismo fotoperiodo, pero con 28 °C durante el día y 22 °C durante la noche. Las plantas fueron fotografiadas cada 3h durante 1 semana y el largo del hipocótilo fue medido utilizando Image J (imagej.nih.gov/ij/). El análisis estadístico se realizó utilizando una prueba t de Student de dos colas o un ANOVA de dos vías, dependiendo del caso.

iCLIP

Para el experimento de iCLIP se siguió el protocolo de (Lewinski, Brüggemann, et al., 2024). Se crecieron plantas expresando una copia de DCP5 fusionada a YFP o GFP como control negativo bajo un fotoperiodo de 12:12 (ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad). Al cabo de dos semanas, fueron transferidas a condiciones de luz continua. Se recolectaron tres réplicas biológicas de DCP5-YFP y dos de GFP por punto temporal, a las 12 y 24 horas posteriores a la transferencia.. Las muestras fueron tratadas con un pulso de luz UV (2000 mJ/cm²) para unir covalentemente

proteínas con ARN y luego congeladas de inmediato en nitrógeno líquido. Luego de la lisis celular del tejido, se inmunoprecipitó DCP5-YFP con GFP-Trap agarose beads (Proteintech, cat. no. gta-20). Se realizó un tratamiento con Turbo DNase (Invitrogen) y RNase I (Invitrogen) para eliminar ADN. Se marcó el ARN con γ - ^{32}P , se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, y se realizó un autorradiograma. De la membrana de nitrocelulosa se recuperó ARN del peso adecuado con el cual se armaron librerías para su secuenciación. Se secuenció en la plataforma Illumina NextSeq2000 en el Institute of Molecular Biology de Mainz, Alemania.

Procesamiento y análisis de datos de iCLIP

Para el procesamiento de las lecturas y la búsqueda de picos de unión se siguió el protocolo bioinformático de Lewinski et al., (2024). Brevemente, las lecturas de la secuenciación del experimento del iCLIP fueron clasificadas por replica biológica y condición y luego se removió la secuencia de los adaptadores de Illumina utilizando el paquete Flexbar (Roehr et al., 2017). Las lecturas procesadas fueron alineadas contra el genoma TAIR10 usando la anotación arRTD3 usando STAR (Dobin et al., 2013; Lamesch et al., 2012). Se removieron los duplicados de PCR utilizando el programa umi_tools (Smith et al., 2017). Los picos de unión se determinaron utilizando PureCLIP (Krakau et al., 2017). El 2% de los picos con el peor puntaje de PureCLIP global fueron descartados y de los resultantes picos se descartó el 30% de los picos con peor puntaje dentro de cada gen. Finalmente, se determinó el ancho de los sitios de unión utilizando el paquete de R BindingSiteFinder (Busch et al., 2020).

Secuenciación masiva de ARN

Para la secuenciación masiva de ARN se crecieron plantas silvestres y *dcp5-1* bajo un fotoperiodo de 12:12 (ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad). Al cabo de dos semanas, las plantas fueron transferidas a condiciones de luz continua (22 °C) y se cosecharon dos replicas biológicas a las 12, 16, 20, 24, 28, 32 36h en luz continua, donde la mitad de las muestras fueron tratadas con un pulso de 4h a 28 °C previo a la cosecha. Se extrajo ARN total con TRIzol (Invitrogen) y se armaron librerías con mRNA Library Prep Kit (Watchmaker). Las librerías se secuenciaron en la plataforma Avati (Element Bioscience) en el Stowers Institute for Medical Research.

Procesamiento de lecturas de la secuenciación masiva de ARN

Las lecturas de la secuenciación masiva de ARN fueron mapeados al genoma de *Arabidopsis thaliana* TAIR10 (Lamesch et al., 2012) usando STAR 2.7.0 (Dobin et al., 2013) con los siguientes parametros: `--twopassMode Basic --outFilterMultimapNmax 2 --outFilterType BySJout --outSJfilterReads Unique --sjdbOverhang 149 --alignSJoverhangMin 6 --alignSJDBoverhangMin 3 --alignIntronMin 20 --alignIntronMax 5000`.

Análisis de genes diferencialmente expresados

Antes del análisis de expresión diferencial, descartamos todos los genes con un promedio de lecturas entre replicas biológicas menor a 10. Al análisis de expresión diferencial se realizó usando DESeq2 (Love et al., 2014). Los p-valores fueron ajustados usando el criterio de FDR (Benjamini & Hochberg, 1995). Genes con un FDR menor a 0.05 y un valor absoluto de log2FC mayor a 1 fueron considerados como diferencialmente expresados.

Secuenciación masiva de ARN pequeños

Para la secuenciación masiva de ARN se crecieron plantas silvestres, *dcp5-1* y *rdr6-11* bajo un fotoperiodo de 12:12 (ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad). Al cabo de dos semanas, las plantas fueron transferidas a condiciones de luz continua y se cosecharon muestras a las 12 y 24h en luz continua (una réplica biológica por punto temporal). Se extrajo ARN total con NucleoZol (Macherey Nagel) y se armaron librerías con NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina (New England Biolabs). Las librerías se secuenciaron en la plataforma Avati (Element Bioscience) en el Stowers Institute for Medical Research.

Procesamiento de la secuenciación de ARNs pequeños

A las lecturas provenientes del experimento de secuenciación masiva de ARNs pequeños se les quitaron los adaptadores y se filtraron utilizando el paquete Flexbar con los parámetros `-q WIN -qf sanger -qt 24 --min-read-length 21` (Roehr et al., 2017). Luego, con código propio se eliminaron todas las lecturas que no tuvieran 21nt o 22nt. Las lecturas resultantes se alinearon

al genoma de Arabidopsis TAIR10 con bowtie (versión 1.2.3) con los siguientes parámetros -v 1 -k 10 -S (Lamesch et al., 2012; Langmead, 2010). Finalmente, se contaron las lecturas mapeadas a cada *locus* con HTSeq (Anders et al., 2015) con los parámetros -m union --nonunique all.

Análisis de ARNs pequeños

Para encontrar potenciales genes fuentes de rqc-siRNAs se filtraron todos los genes con menos de 10 lecturas y se normalizaron las lecturas utilizando el paquete de R DESeq2 (Love et al., 2014). Luego se filtraron los genes cuya expresión sea menor o igual en la mutante *rdr6-11* que en plantas silvestres y que la expresión en *dcp5-1* sea 50% mayor que en plantas silvestres. El análisis de ontogenias génicas se realizó en con la herramienta online the The Gene Ontology Resource (<https://geneontology.org/>).

Resultados

Los transcriptos circadianos son inestables

Los transcriptos circadianos muestran cambios bruscos en sus niveles de expresión a lo largo de un día, por lo que hipotetizamos que estos transcriptos están sujetos a una precisa coordinación temporal de sus tasas de transcripción y degradación de ARNm. La estabilidad de los ARNm que oscilan circadianamente con gran amplitud debería ser menor que la de aquellos ARNm con una expresión estable. Una vez alcanzado el pico máximo de expresión, la estabilidad del mensajero debe ser lo suficientemente baja para llegar al mínimo de expresión en ~ 12 h. Si ciertos transcriptos, en partículas los del oscilador central, no decaen con la suficiente velocidad, el funcionamiento del reloj se vería comprometido. El caso extremo es la expresión constitutiva de estos genes mediante el uso de promotores fuertes. En estos casos se suele ver pérdida de la ritmicidad (Alabadí et al., 2001; Gendron et al., 2012).

Para poner a prueba esta hipótesis se compararon la vida media de los transcriptos controlados por el reloj (TCR) en función de su amplitud. Las vidas medias se extrajeron de los

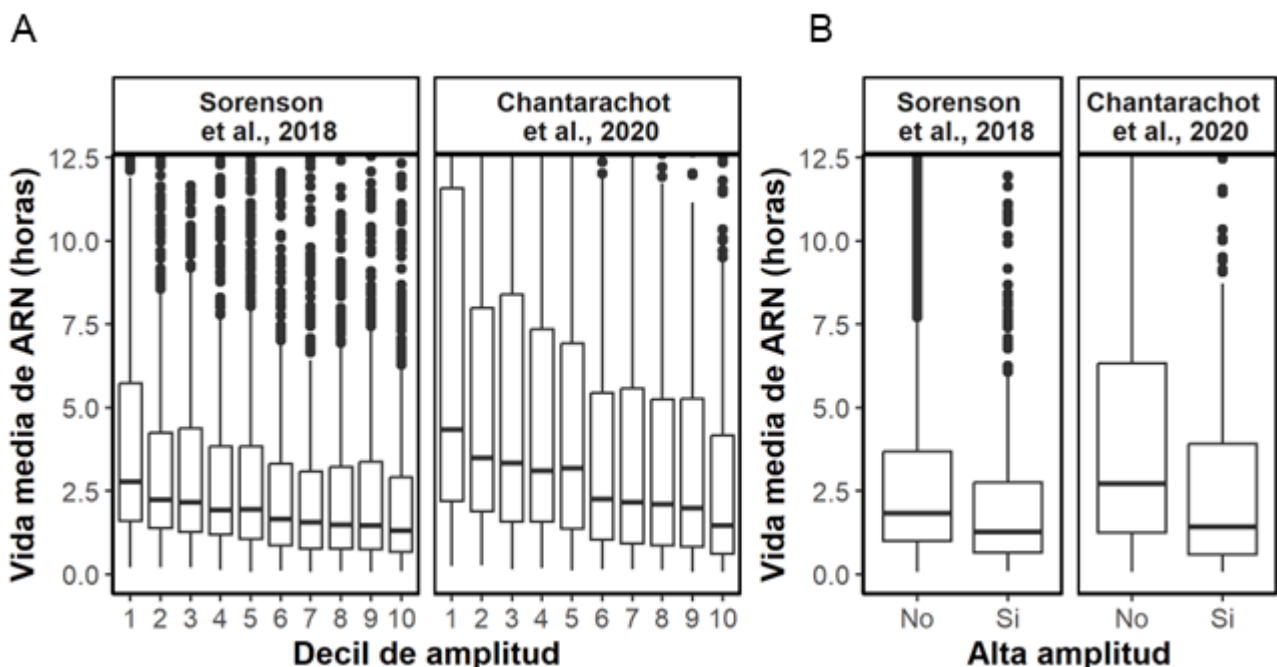
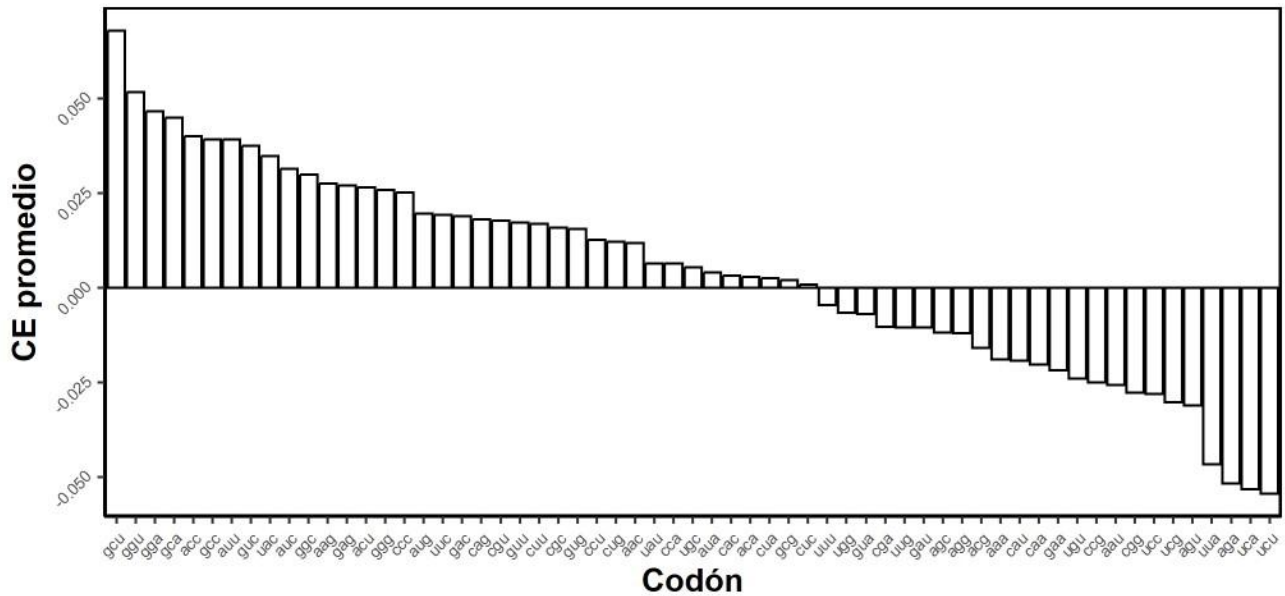


Figura 4. **Los transcriptos controlados por el reloj son inestables.** (A) *Box plot* de vidas medias de los transcriptos circadianos por decil de amplitud ordenados de menor amplitud (decil 1) a mayor amplitud (decil 10). (B) *Box plot* de vidas media de transcriptos circadianos según sean o no de alta amplitud (amplitud relativa > 4).

trabajos de Sorenson et al., (2018) y Chantarachot et al., (2020), mientras que los TCR se tomaron de Romanowski et al., (2020). Al agrupar los TCR en deciles según amplitud, la tendencia indica que la amplitud aumenta al mismo tiempo que la vida media disminuye (Figura 4 A). Así, para los datos de Sorenson *et al.* (2018), en el decil 1 (amplitud relativa entre 0.2 y 0.5) la mediana de vida media es de 2.78h, mientras que en el decil 10 (amplitud relativa entre 3 y

A



B

Primer letra	Segunda letra							
	U		C		A		G	
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
	UUA		UCA		UAA		UGA	
	UUC	Leu	UCC		UAC	Stop	UGC	Stop
	UUG		UCG		UAG	Stop	UGG	Trp
C	CUU		CCU	Pro	CAU	His	CGU	
	CUA	Leu	CCA		CAA		CGA	Arg
	CUC		CCC		CAC	Gln	CGC	
	CUG		CCG		CAG		CGG	
A	AUU		ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
	AUA	Ile	ACA		AAA		AGA	
	AUC		ACC		AAC	Lys	AGC	Arg
	AUG	Met	ACG		AAG		AGG	
G	GUU		GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	
	GUA	Val	GCA		GAA		GGA	Gly
	GUC		GCC		GAC	Glu	GGC	
	GUG		GCG		GAG		GGG	

No óptimo Óptimo

C

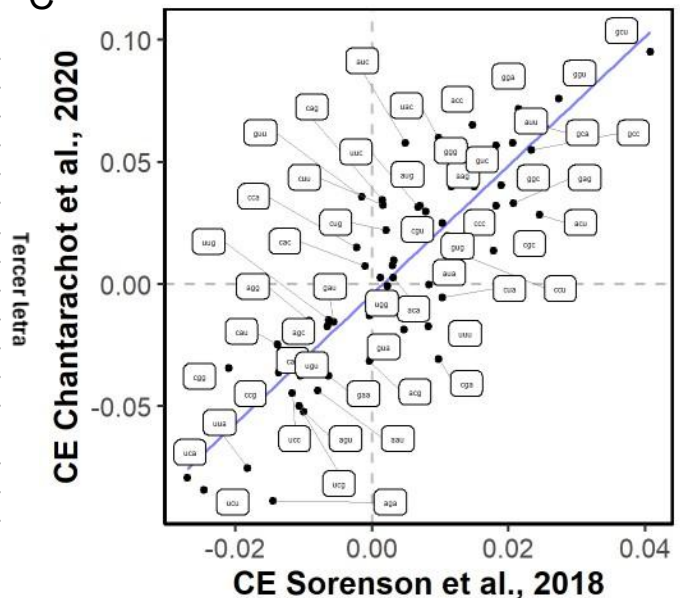


Figura 5. **Determinación de codones óptimos en Arabidopsis.** (A) Codones ordenados según coeficiente de estabilización. (B) Código genético con mapa de calor de CE de cada codón. (C) Correlación entre los valores de CE obtenidos a partir de los datos de Sorenson et al., (2018) y Chantarachot et al., (2020) ($R^2 = 0.89$).

167.3) es de 1.31h. De manera similar, se observa que los TCR de alta amplitud (amplitud relativa > 4) tienen una vida media menor a la del resto de los transcritos (Prueba U de Mann-Whitney, $p < 0.001$) (Figura 4 B). Esta diferenciade medianas es de 0.56h con los datos de Sorenson et al. (2018) (1.26 vs 1.82), y de 1.3h con los datos de Chantarachot et al. (2020) (1.42h vs 2.71h).

La baja estabilidad que muestran los TCR puede deberse a diversos factores en *cis* y en *trans*. Una de las posibles causas en *cis* es la composición de codones de los transcritos. Es posible que, durante la evolución, los TCR hayan fijado codones no-óptimos que favorezcan vidas medias cortas. El código de codones óptimos es el conjunto de valores de optimización asignado a cada uno de los codones del código genético y se ha calculado para múltiples especies: *Xenopus*, *Danio rerio*, células humanas, *Drosophila melanogaster*, *Trypanosoma brucei* y ratones (Bazzini et al., 2016; Burow et al., 2018; Jeacock et al., 2018; Shu et al., 2020; Q. Wu et al., 2019). En *Arabidopsis*, por su parte, no hay reportes donde se establezcan codones óptimos y no-óptimos. Existen varias métricas para evaluar que tan óptimo es un codón (Gillen, Waldron and Bushell, 2021). Una de las más populares es el coeficiente de estabilización (CE), que es el coeficiente de correlación de Pearson entre la vida media y la frecuencia de un dado codón.

Se calculó el CE para cada codón con los datos de vida media provenientes de los trabajos de Sorenson et al. (2018) y Chantarachot et al. (2020) (Figura 5 A). A grandes rasgos, el código de codones óptimos es similar a lo observado previamente en *D. rerio* y *Xenopus* (Bazzini et al., 2016; Q. Wu et al., 2019). Por ejemplo, los codones que codifican para serina e histidina son poco óptimos, mientras que los que codifican para glicina y glutamato son óptimos (Figura 5 B). Aunque el rango de valores absolutos de CE que surgen de cada conjunto de datos es ligeramente distinto, los CE muestran una alta correlación ($R^2 = 0.89$) (Figura 5 C).

Para evaluar que tan óptimo es un transcritos se tomaron dos estrategias: (1) calcular el *ratio* entre codones óptimos y codones no óptimos, donde *ratios* mayores a 1 indican que la secuencia codificante tiene más codones óptimos que no-óptimos; y (2) calcular la optimización relativa (OR), un valor entre 0 y 1 que indica que tan óptimo es un transcritos teniendo en cuenta su composición aminoacídica (ver Materiales y métodos). Luego, se agruparon a los genes según su cuartil de ratio de codones óptimos / no-óptimos y de OR, y se contaron cuantos TCR de alta amplitud había en cada cuartil. Sorprendentemente, los TCR parecen estar homogéneamente distribuidos en todos los cuartiles, con un leve sesgo hacia el Q4 (cuartil con transcritos más optimizados), indistintamente de la estrategia que se utilice (Figura 6 A y B). Esto sugiere que

no es la composición de codones la responsable de la baja vida media de estos transcritos, y que otros mecanismos deben controlar su estabilidad.

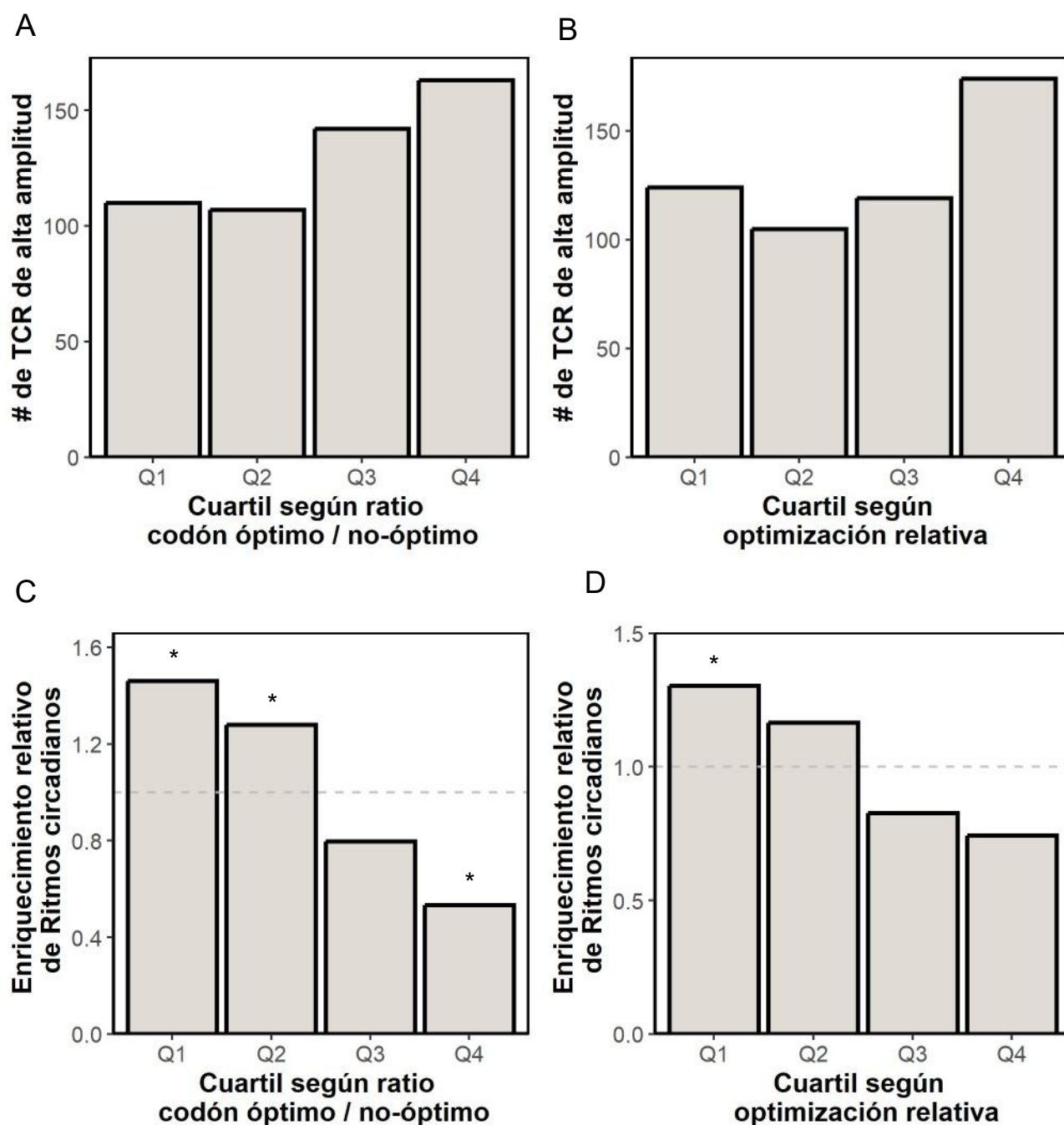


Figura 6. **Los TCR de alta amplitud tienden a estar compuestos por codones óptimos.** (A y B) Cantidad de TCR de alta amplitud en cada uno de los cuartiles del (A) ratio entre codones y no óptimos, y (B) de optimización relativa. (C y D) Enriquecimiento relativo de la categoría de OG Ritmos Circadianos por cuartil de (C) ratio entre codones óptimos y no óptimos, y (D) de optimización relativa (*, p-valor < 0.05).

Sin embargo, un análisis de ontologías génicas mostró que los transcritos menos óptimos (Q1) estaban enriquecidos en la categoría de Ritmos Circadianos (Figura 6 C y D). Es más, utilizando la estrategia de ratio de codón optimo / no-optimo, entre los transcritos más optimizados (Q4) hay una subrepresentación de la categoría Ritmos Circadianos (Figura 6 C). Además, los genes del oscilador central se reparten entre los cuartiles de menor optimización. En Q1 se encuentra *ELF3*, *CCA1*, *LNK1* y *LNK2*; en Q2, *LHY*, *RVE8*, *PRR5*, *PRR7*, *PRR9*; y en Q3, *TOC1*. La aparente discrepancia entre el ligero sesgo hacia mayores optimizaciones de los TCR de alta amplitud (Figura 6 A y B) y el enriquecimiento de la categoría Ritmos Circadianos entre los transcritos de menor optimización (Figura 6 C y D) se puede explicar por el hecho de que el ~70% de los transcritos de la categoría Ritmos Circadianos no son de TCR de alta amplitud (Figura 7). Vale aclarar que prácticamente todos los componentes del oscilador central son TCR de alta amplitud, mientras que los TCR de baja amplitud de la categoría Ritmos Circadianos son principalmente factores accesorios de las vías de entrada y *outputs* (Tabla Suplementaria 1).

En resumen, los TCR, y en especial los de alta amplitud, muestran una vida media menor a la del resto del transcriptoma. La menor vida media de algunos TCR, como los componentes del oscilador central, se puede explicar por su composición de codones. Pero, en términos generales, los TCR de alta amplitud no muestran una composición de codones no-óptima que pueda explicar su vida media. Esto da lugar a buscar otros factores en *cis* y en *trans* que regulen la estabilidad de los TCR en su conjunto.

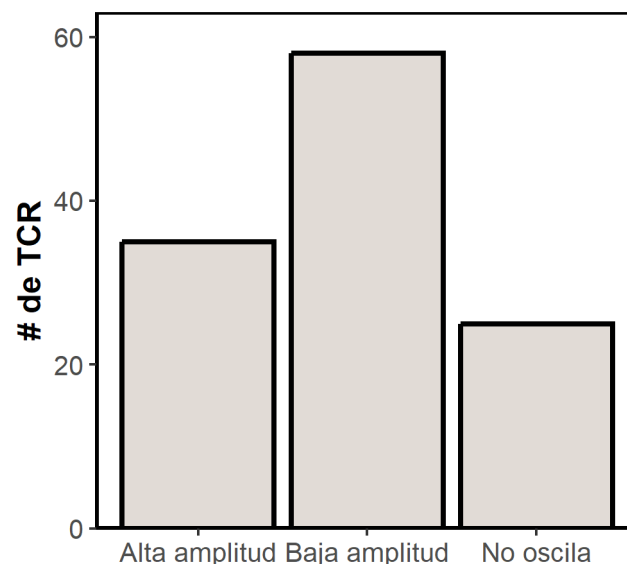


Figura 7. Amplitud de los genes que conforman la categoría de OG Ritmos Circadianos. Alta amplitud: transcritos con una amplitud relativa mayor a 4, baja amplitud: transcritos con amplitud relativa mayor a 0 y menor a 4. No oscila: transcritos donde no se detectan oscilaciones circadianas significativas.

DCP5 es necesaria para el funcionamiento del reloj

XRN4, la única exorribonucleasa 5'-3' citoplasmática en *Arabidopsis*, al igual que el complejo promotor del *decapping* LSM1-7 son necesarios para que el reloj biológico funcione correctamente (Careno et al., 2022; Perez-Santángelo et al., 2014). Esto refuerza la idea de que la estabilidad de los TCR debe ser meticulosamente controlada para el mantenimiento de los ritmos circadianos. Plantas mutantes para estos genes no son arrítmicas, sino que presentan periodos más largos que plantas silvestres, por lo que se puede presumir que los TCR se degradan por la vía 3'-5' pero no con la eficiencia necesaria para mantener un periodo de 24h. Así, la vía de degradación de ARN 5'-3' surge como clave en el control de la estabilidad de TCR.

Previo a la eliminación de la *cap* 7-mG en el extremo 5' del ARNm por el complejo de *decapping* y a la de degradación del ARNm por XRN4, los ARNm tienen que ser seleccionados de alguna manera. DCP5, es una proteína conservada a través de todos los eucariotas, cuya función es inhibir la traducción de ARNm y secuestrarlos en *p bodies*. Dado que DCP5 es un actor necesario para que los ARNm lleguen a la maquinaria de degradación, hipotetizamos que también tiene un rol en la regulación de los ritmos circadianos.

Para estudiar el efecto de DCP5 en el reloj biológico se utilizó una estrategia de genética inversa, con la mutante de expresión hipomórfica *dcp5-1* (J. Xu & Chua, 2009). Se encontró que *dcp5-1* presenta un fenotipo de período circadiano largo para el ritmo de movimiento de hojas en comparación con las plantas silvestres (26.64 ± 0.71 h frente a 23.92 ± 0.43 h, respectivamente) (Figura 8 A). Apoyando la idea de que el fenotipo circadiano observado en esta mutante se debe a la mutación en *DCP5*, este fenotipo fue completamente rescatado cuando complementamos las plantas *dcp5-1* con una versión silvestre del gen *DCP5* (Figura 8 A). Luego, analizamos los ritmos circadianos en la expresión génica evaluando los ritmos de bioluminiscencia impulsados por los genes reporteros *pCCR2:LUC* y *pTOC1:LUC*, y también observamos un fuerte fenotipo circadiano en las plantas mutantes *dcp5-1*. De hecho, el ritmo de expresión de ambos reporteros se alargó casi 2h en los mutantes *dcp5* en comparación con las plantas silvestres (25.59 ± 0.50 h frente a 23.65 ± 0.48 h, respectivamente para *pCCR2*, y 26.28 ± 0.34 h frente a 24.18 ± 0.57 h, respectivamente para *pTOC1*) (Figura 8 B-C).

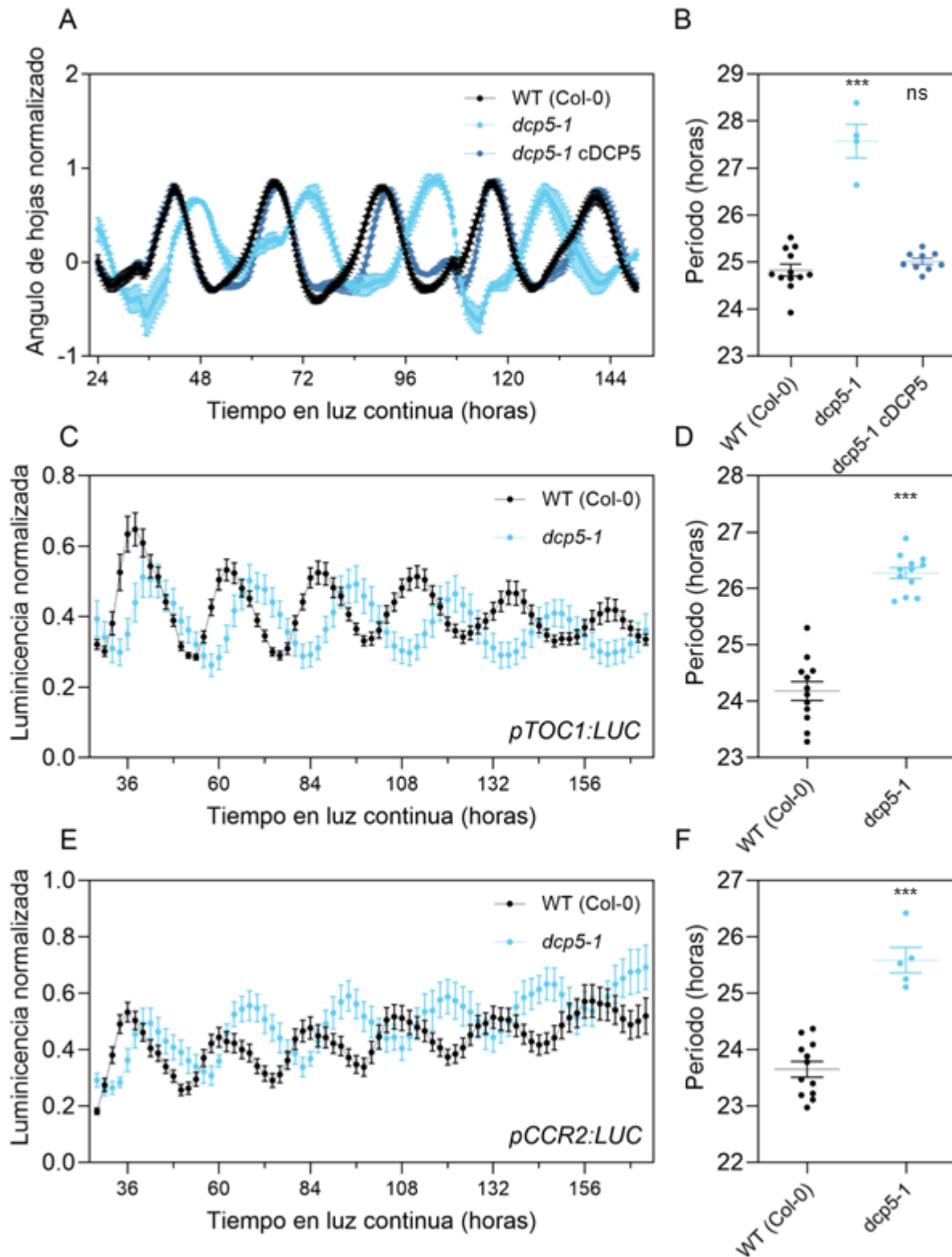


Figura 8. DCP5 es necesario para el correcto funcionamiento del reloj biológico. Se midió (A-B) el ángulo del primer par de hojas y la expresión del reportero central nocturno del reloj TOC1 (C-D) y del reportero del *output* del reloj CCR2 (E-F) durante 7 días en luz continua después de la sincronización bajo condiciones de días largos (LD). El ángulo de las hojas y la bioluminiscencia se registraron cada 2h durante los 7 días y se analizó mediante FFT-NLLS. (B,D,F) Se graficaron los valores del período; las barras de error representan el promedio con el rango. ***, $p < 0,001$; ns, no significativo [prueba de ANOVA (B) o t de Student (D y F)].

Los transcritos de DCP5, LSM1a, LSM1b, y XRN4 no oscilan circadianamente (Figura 9 A). Datos de TRAP-seq muestran que la ocupación por ribosomas de estos transcritos tampoco oscila circadianamente (Figura 9 B). Esto sugiere que los niveles de la maquinaria de degradación y de DCP5 son constantes a lo largo del día, y que su efecto circadiano está modulado por cambios en su actividad o por otros elementos en *cis* o en *trans*.

Luego, estudiamos si el tiempo de floración, un *output* del reloj circadiano, se ve afectado en las plantas mutantes *dcp5-1* en condiciones fotoperiódicas inductivas (días largos, 16 h de luz y 8 h de oscuridad). Efectivamente, se observa un retraso en la floración de *dcp5* (10 ± 0.27 hojas en plantas silvestres contra 14.82 ± 0.61 en *dcp5-1*) (Figura 10 A y C), consistente con resultados

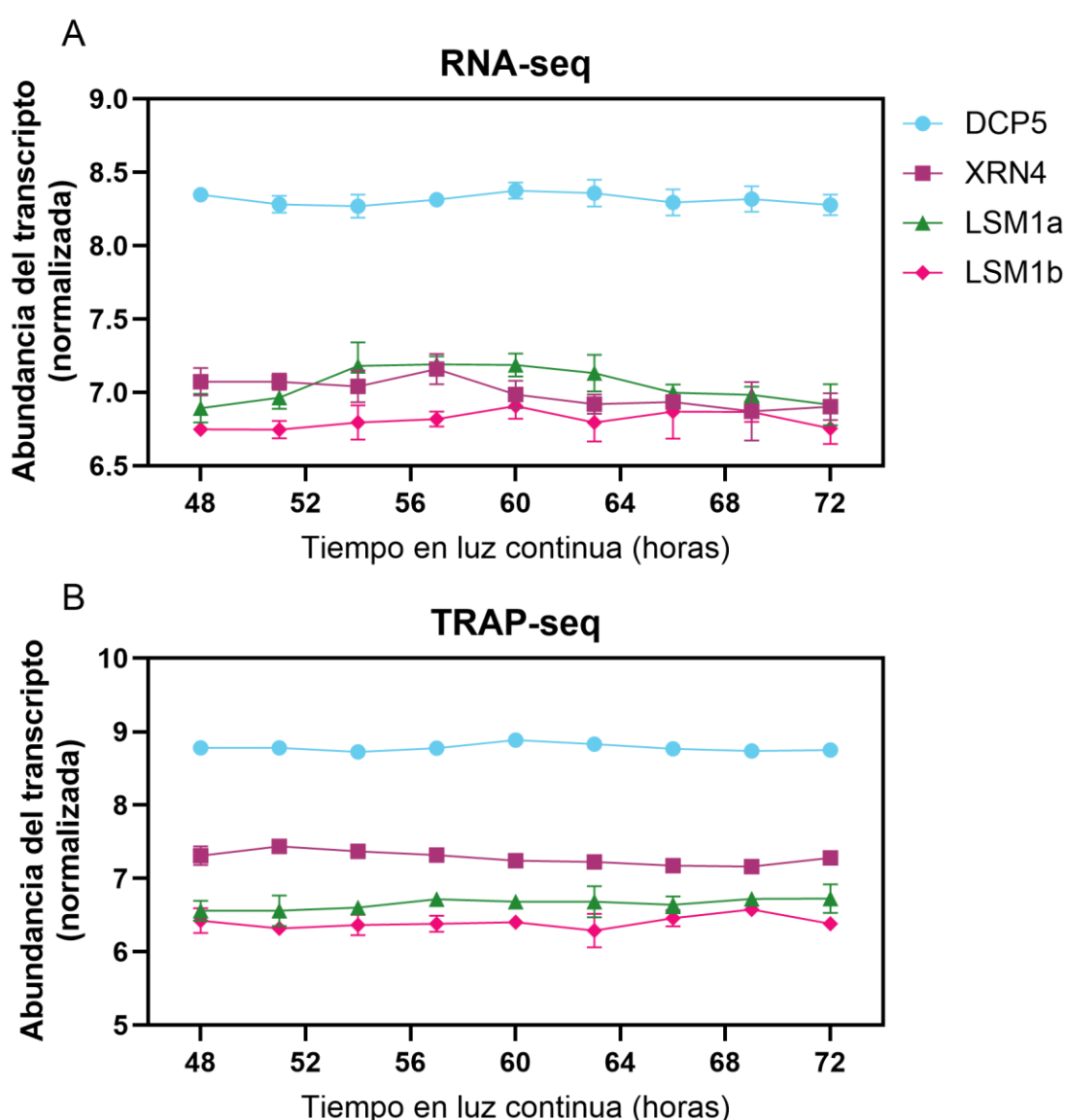


Figura 9. **La expresión de DCP5 no oscila circadianamente** en (A) datos de RNA-seq y (B) TRAP-seq mostrando la expresión de ARNm y su ocupación por ribosomas de los genes DCP5, XRN4, LSM1a y LSM1b. Datos tomados de CAST-R (Bonnot et al., 2022).

recientemente publicados (W. Wang et al., 2023). En cambio, en condiciones fotoperiódicas no inductivas (días cortos, 8h de luz y 16h de oscuridad), no se observan diferencias significativas en el tiempo de floración (65.18 ± 5.19 hojas en plantas silvestres frente a 68.10 ± 3.73 en *dcp5*) (Figura 10 B). Esto sugiere que DCP5 afecta específicamente a la vía fotoperiódica de la floración. El fenotipo de floración tardía observado en estos mutantes bajo condiciones de día largo es consistente con que este defecto sea, al menos en parte, el resultado de un período circadiano más largo en los mutantes, aunque no se pueden descartar algunos efectos parciales independientes del reloj.

Otra respuesta mediada por el reloj biológico es la respuesta a la temperatura. La termomorfogénesis es el conjunto de cambios morfológicos, como la elongación exacerbada del hipocótilo, que una planta realiza en respuesta a temperaturas altas no estresantes, que en *Arabidopsis* es alrededor de 28 °C (Casal & Balasubramanian, 2019). Para evaluar el rol de DCP5 en la termomorfogénesis, estudiamos la elongación del hipocótilo. A 22 °C, la mutante *dcp5* crece su hipocótilo de manera similar a plantas silvestres (Figura 11 A). Sin embargo, si en lugar de crecer a 22 °C, las plantas se crecen a 28 °C durante el día, la mutante *dcp5* no responde con mayor elongación del hipocótilo como si ocurre en plantas salvajes (Figura 11 B).

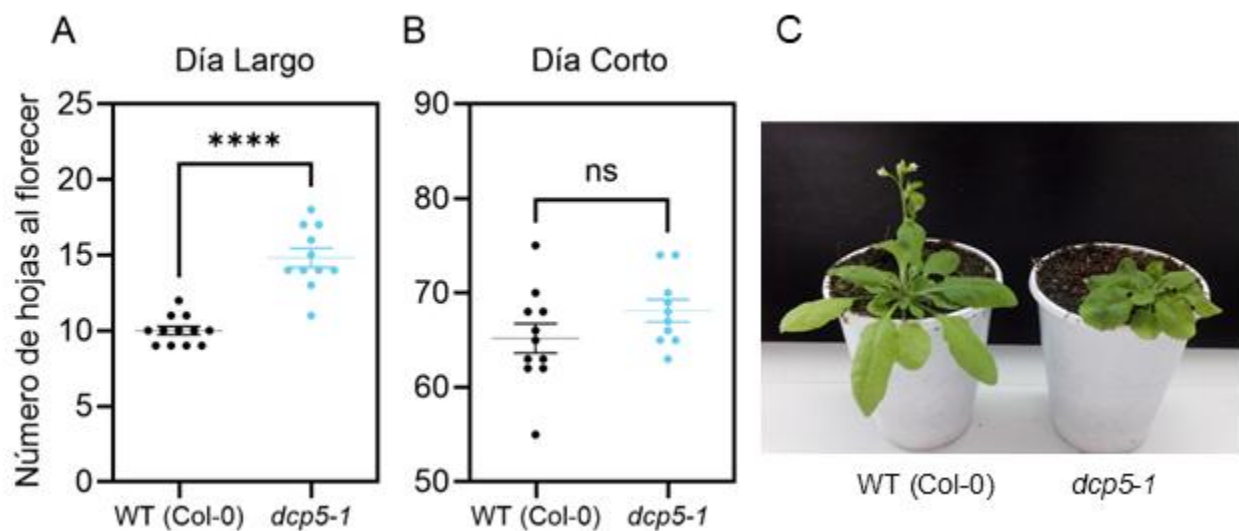


Figura 10. **La mutante *dcp5-1* florece tarde.** (A-B) Tiempo de floración evaluado como el número de hojas de la roseta en el momento de la floración bajo condiciones de (A) día largo y (B) día corto. Las barras de error representan el promedio con el desvío estándar. ****, $p < 0,0001$; ns, no significativo (prueba t de Student). (C) Imágenes representativas de plantas de la misma edad de ambos genotipos.

Todos estos resultados muestran que DCP5 es necesaria para el correcto funcionamiento del reloj biológico y de sus *outputs*. Para comprender las causas a nivel molecular de estos fenotipos, estudiamos a continuación los ARN blanco de DCP5 y como su ausencia altera el transcriptoma.

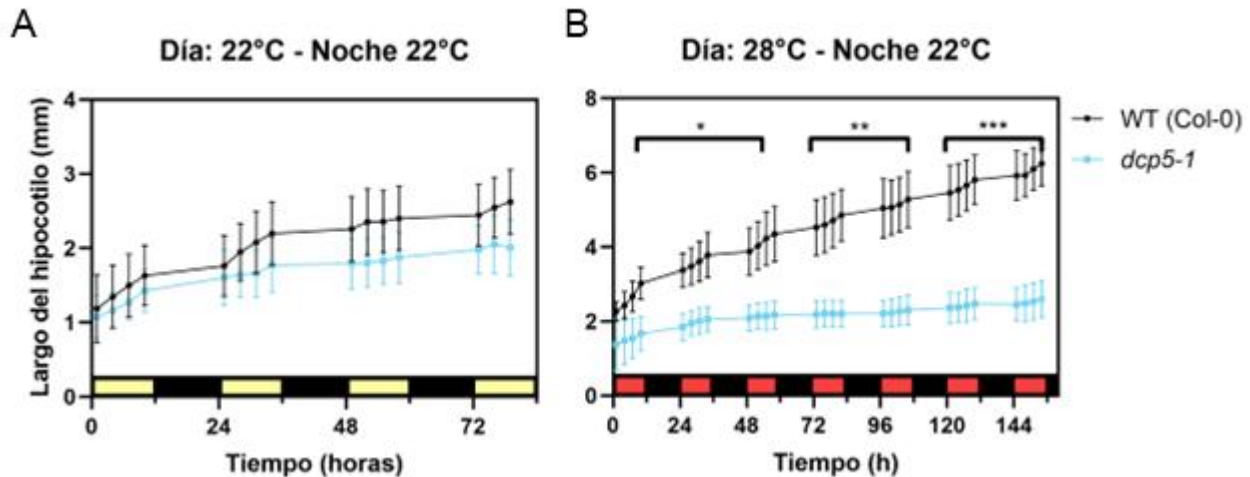


Figura 11. **La mutante *dcp5-1* tiene alterada la respuesta de termomorfogénesis.** Largo del hipocótilo en función del tiempo de plantas crecidas bajo un fotoperiodo de 12:12 a (A) 22 °C o a (B) 28 °C de durante el día y 22 °C durante la noche. Las barras de error representan el promedio con el desvío estándar. *p < 0,05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 (prueba de ANOVA de dos vías).

DCP5 se une a múltiples transcritos del oscilador

Para investigar el mecanismo molecular por el cual DCP5 regula los ritmos circadianos y el transcriptoma, se llevó a cabo un experimento de iCLIP (del inglés, *Individual-nucleotide resolution UV crosslinking and immunoprecipitation*), una técnica que permite identificar los ARNs blanco a los que se une de manera directa una dada proteína. Se tomaron muestras en los dos momentos del día con mayor abundancia de transcritos circadianos (CT12 y CT24), con el objetivo de incluir todos aquellos transcritos que podrían no ser detectables en uno de los dos puntos temporales (Figura 12 A) (Romanowski et al., 2020).

De una lista de 51 genes reportados como pertenecientes o asociados al oscilador central (Tabla Suplementaria 2), 33 (70%) generan transcritos con sitios de unión a DCP5 (Figura 12 B) (prueba hipergeométrica, p -valor < 0.0001). Asimismo, de 229 genes involucrados en la vía de auxinas, que regulan el crecimiento durante la termomorfogénesis, 89 (39%) presentan sitios

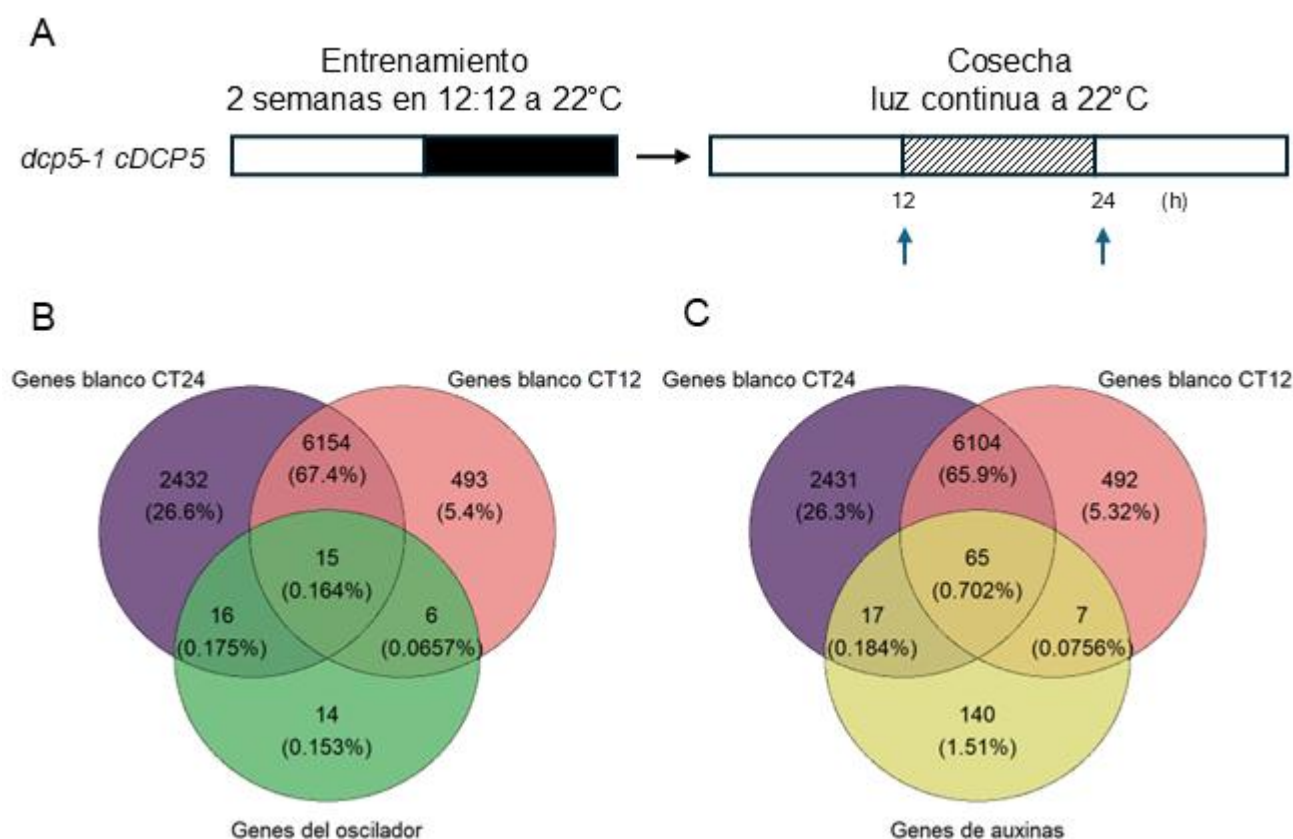


Figura 12. **DCP5 se une a miles de transcritos** (A) Diseño experimental. Se crecieron plantas *dcp5-1 DCP5* durante dos semanas en un fotoperiodo de 12:12 a 22 °C, luego de las cuales se pasaron a luz continua. Se cosecharon muestras expuestas 12h (CT12, anochecer subjetivo) y 24h (CT24, amanecer subjetivo) a luz continua. (B-C) Diagramas de Venn mostrando la intersección entre transcritos blanco de DCP5 reconocidos en las en muestras de CT12, CT24 y (B) genes del oscilador central o (C) genes de las vías de auxinas.

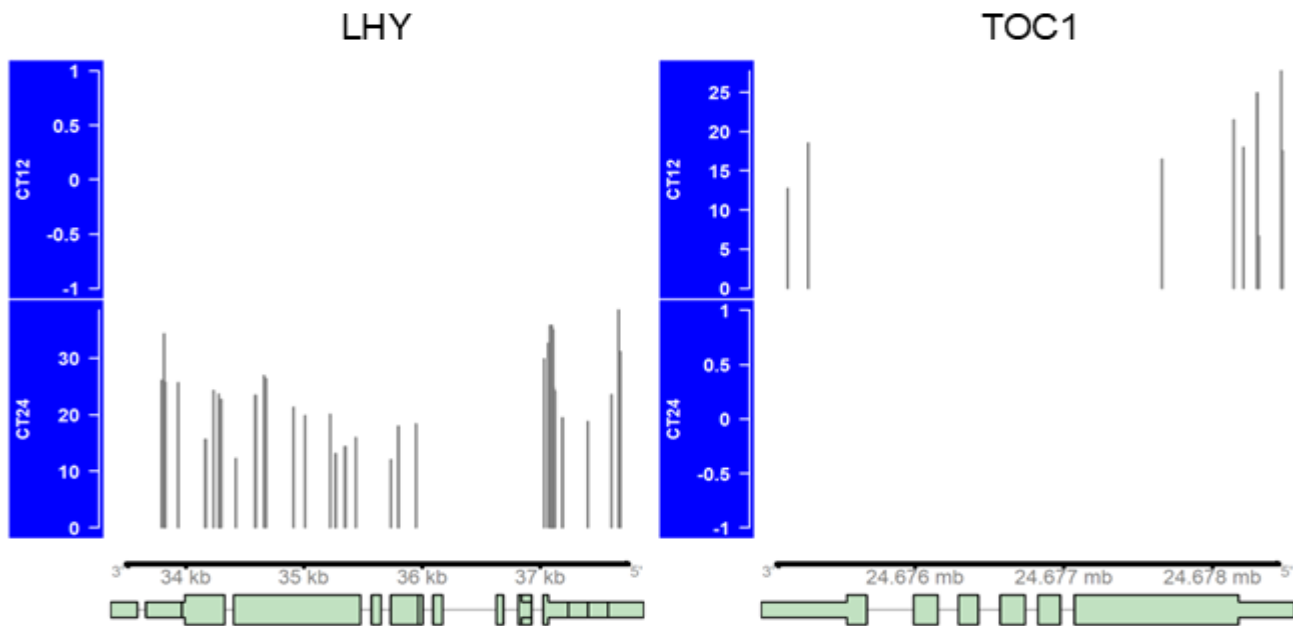


Figura 13. Sitios de unión a DCP5 de los transcritos de *LHY* y *TOC1* en anochecer subjetivo (CT12, arriba) y amanecer subjetivo (CT24, abajo). Cada pico representa un sitio de unión.

de unión a DCP5 (Figura 12 C) (prueba hipergeométrica, p -valor < 0.05). Aunque la intersección de los genes blancos entre CT12 y CT24 es alta (Figura 12 B-C) (prueba hipergeométrica, p -valor < 0.0001), en los genes del oscilador central se observa especificidad temporal. Por ejemplo, en *LHY*, un gen de expresión matutina, la unión a DCP5 solo se detecta en el CT24 (Figura 13). De manera similar, *TOC1*, cuya máxima expresión ocurre al anochecer, se une a DCP5 exclusivamente en el CT12 (Figura 13). En ambos ejemplos, *TOC1* y *LHY*, pareciera haber un sesgo de los sitios de unión hacia la región 3' no traducibles (3'UTR por sus siglas en inglés). Al analizar la localización de los sitios de unión de DCP5 de manera global, se encuentra un enriquecimiento en la 3'UTR, independientemente del tiempo de muestreo (Figura 14). Las 3'UTR son las regiones que suelen contar con elementos que regulan la estabilidad de los ARNm, lo que sugiere que DCP5 podría interaccionar con dichos elementos (Frederick & Heinemann, 2021).

El 78% de los transcritos que oscilan circadianamente con alta amplitud son blanco de DCP5 (prueba hipergeométrica, p -valor < 0.0001), mientras que solamente el 40% del resto del transcriptoma se une a DCP5 (prueba hipergeométrica, p -valor > 0.05) (Figura 15 A). Esto sugiere un rol clave y directo de DCP5 en el control tanto del oscilador central como de los ritmos circadianos. Además, hay una ligera tendencia a que haya más transcritos blanco de DCP5 en los deciles de mayor amplitud relativa de las oscilaciones de expresión (Figura 15 B). La técnica de iCLIP presenta un sesgo hacia la detección de transcritos de alta expresión (Figura Suplementaria 1 A) (Prueba U de Mann-Whitney, $p < 0.001$). Sin embargo, hay una baja

correlación entre amplitud y niveles de expresión por lo que descartamos que la mayor afinidad de DCP5 por transcritos de alta amplitud sea un sesgo de la técnica ($R^2 = 0.12$) (Figura Suplementaria 1 B).

En resumen, DCP5 se une a una alta proporción del transcriptoma, y preferentemente en la 3'UTR. El próximo paso es entender el efecto específico que DCP5 causa directamente sobre sus transcritos blancos, e, indirectamente, sobre el resto del transcriptoma.

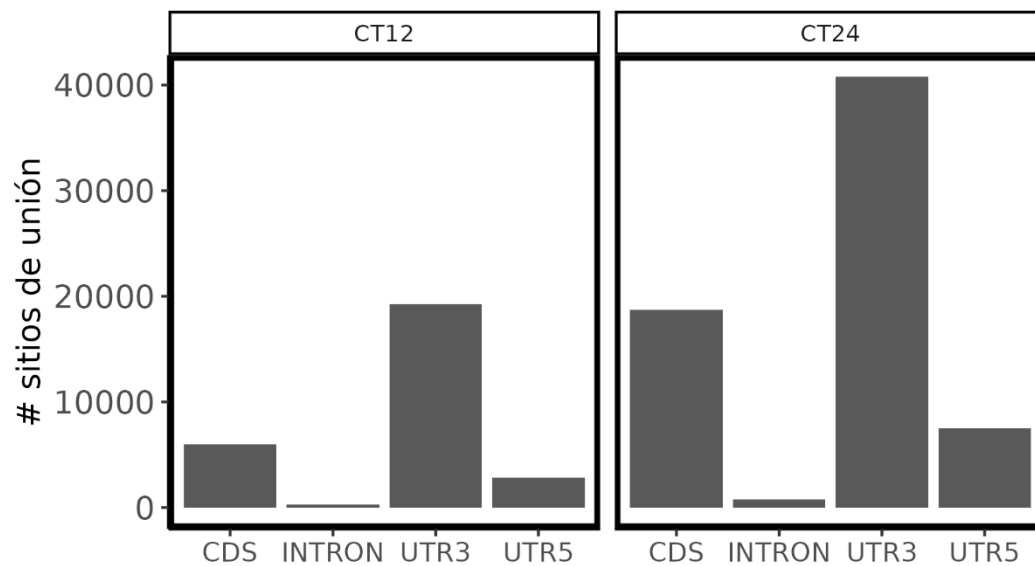


Figura 14. Región dentro de los ARNm donde se une DCP5, para cada punto temporal (izquierda, CT12; derecha, CT24).

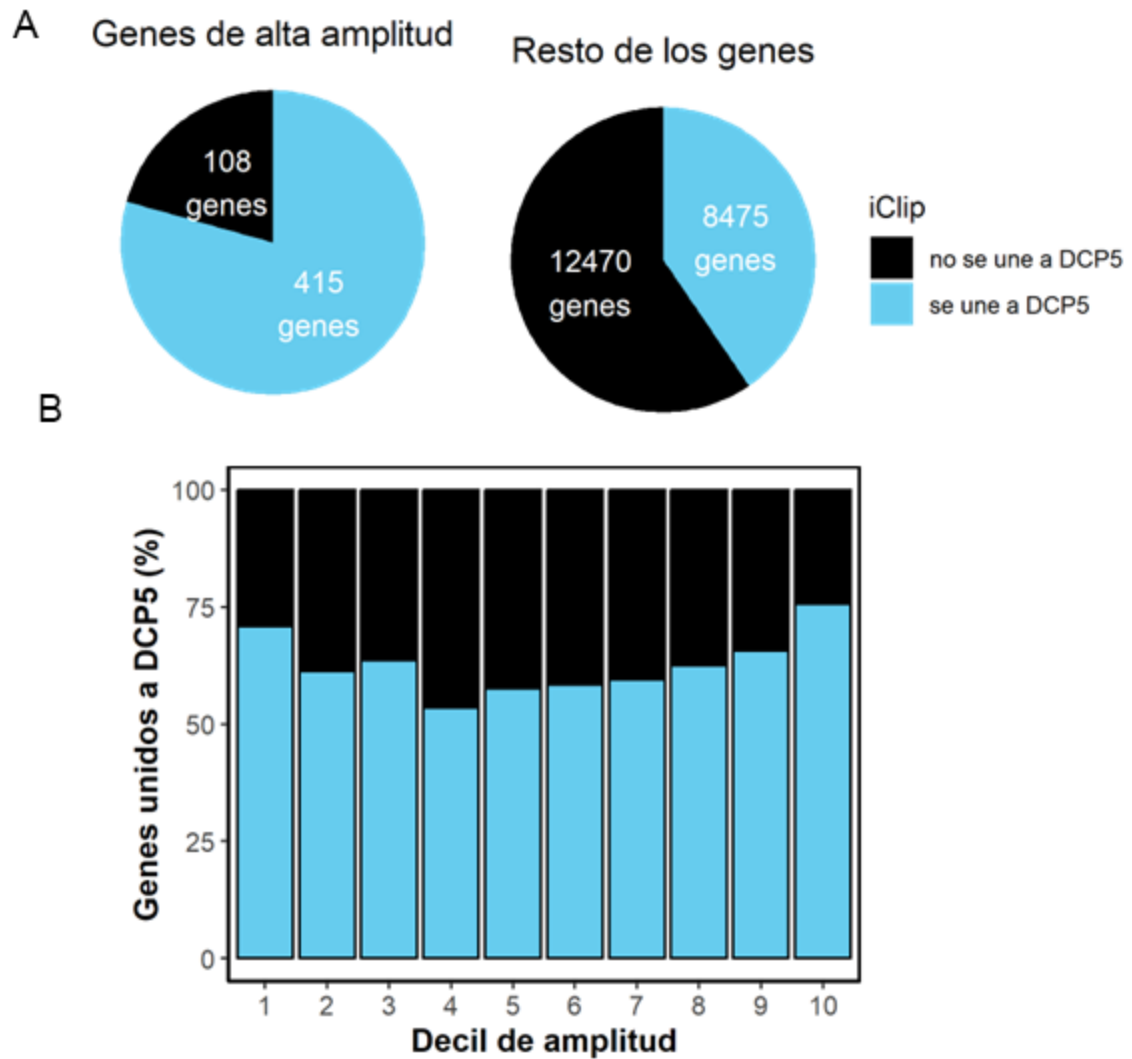


Figura 15. **DCP5 se une preferentemente a transcritos de alta amplitud.** (A) Gráficos de torta mostrando la proporción de transcritos blancos entre genes de alta amplitud y el resto del transcriptoma. (B) Proporción de transcritos que son blanco de DCP5 por decil de amplitud relativa.

DCP5 regula más de un 10% del transcriptoma

Para analizar el efecto de DCP5 en los niveles de expresión del transcriptoma, se realizó una secuenciación masiva de ARN de muestras de plantas silvestres y mutantes *dcp5*. Se tomaron muestras cada 4h durante 1 día en luz continua, en plantas cuyo reloj fue previamente entrenado en un fotoperiodo de 12h de luz y 12h de oscuridad (Figura 16 A). Se analizó el efecto del genotipo en la expresión génica mediante una prueba de razón de verosimilitudes (LTR, del inglés *likelihood ratio test*). Brevemente, se ajustó el patrón de expresión de cada gen utilizando dos modelos: un modelo completo que tiene en cuenta tanto tiempo como genotipo y la interacción entre ambos factores, y un modelo reducido que solo tiene cuenta el tiempo. Si el modelo completo ajusta a los datos significativamente mejor que el reducido, entonces se

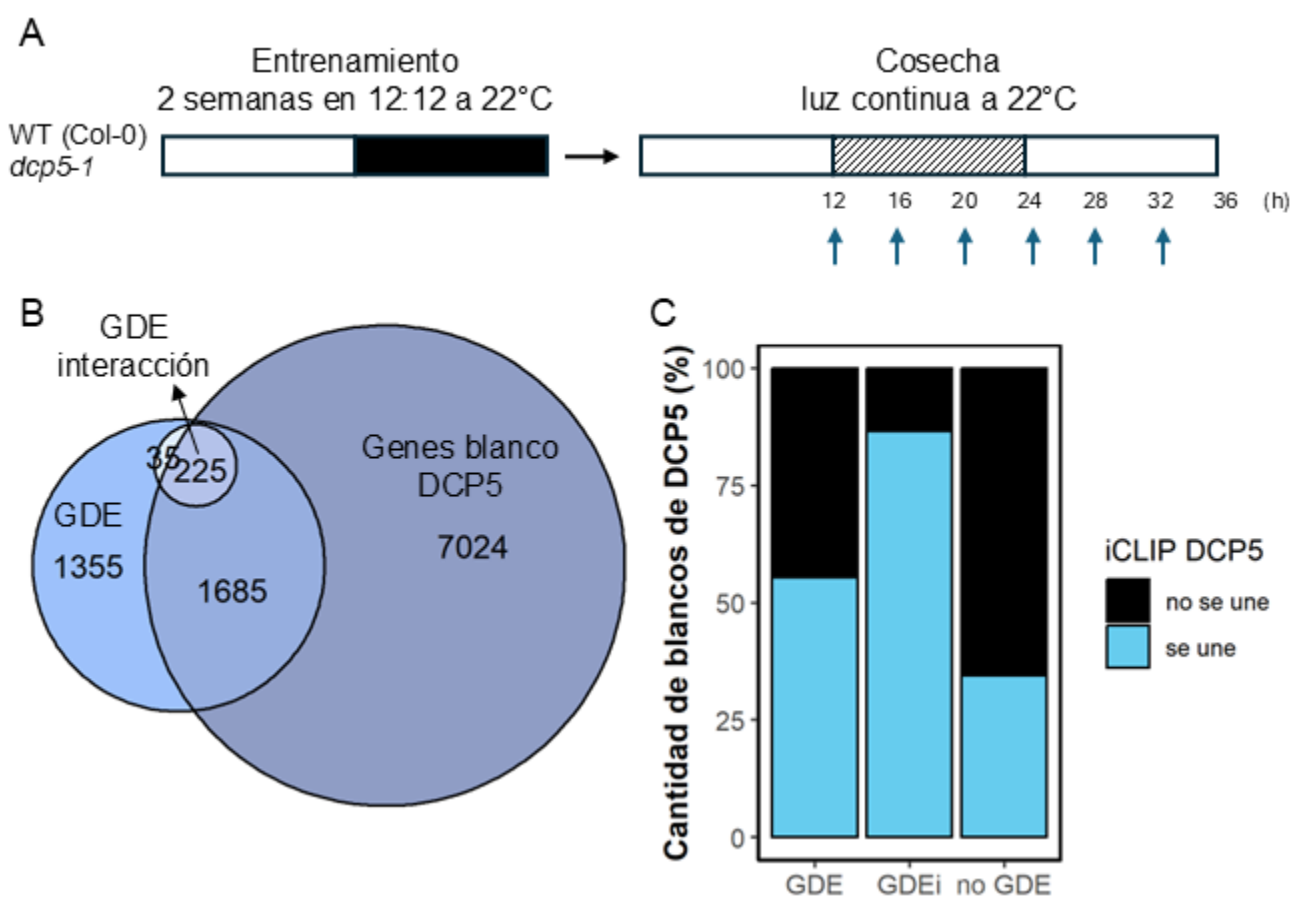


Figura 16. (A) Esquema del diseño experimental. Plantas silvestres y mutantes *dcp5* se crecieron por dos semanas en un fotoperiodo de 12:12 y luego fueron transferidas a luz continua. Las flechas indican los momentos de cosecha. Los bloques blancos, negros, y rayados representan día, noche y noche subjetiva, respectivamente. (B) Diagrama de Venn mostrando el solapamiento entre genes diferencialmente expresados (GDE), GDE con interacción entre tiempo y genotipo (GDEi), y transcritos blancos de DCP5 determinados por iCLIP. (C) Porcentaje de blancos de unión de DCP5 en GDE (sin incluir GDEi), GDEi, y el resto del transcripto no diferencialmente expresado (no GDE).

considera que hay un efecto del genotipo. Usando este método, se detectaron 3300 genes (14%) diferencialmente expresados (GDE) sobre un total de 23695 expresados entre plantas silvestres y la mutante *dcp5*, de los cuales el 7.8% (260 transcriptos) presenta interacción positiva, es decir, el efecto del genotipo depende del momento del día (Figura 16 B). El 86,5% (225 de 260 genes) de los GDE con interacción significativa (GDEi) se unen de manera directa a DCP5, mientras que este número baja a 55.4% y 34.4% en los GDE sin interacción y en el resto del transcriptoma respectivamente (Figura 16 C). Es decir, el 57.9% (1910) de los GDE (ya sea con o sin interacción) se unen directamente a DCP5, lo que sugiere un efecto directo de DCP5 en la regulación de estos transcriptos (prueba hipergeométrica, p-valor < 0.001).

Los GDEi presentan también otras características que los distinguen del resto de los GDE. Al igual que los blancos de unión de DCP5 (Figura 15), los GDEi muestran un enriquecimiento de TCR de alta amplitud. El 57.7% y 33.5% de los GDEi son TCR de alta amplitud (amplitud relativa > 4) y TCR de baja amplitud ($4 \geq$ amplitud relativa > 0) respectivamente (Figura 17 A). La cantidad de TCR de alta amplitud es mucho menor en el resto de los GDE y del transcriptoma (Figura 17 A). Consistentemente, la amplitud relativa de las oscilaciones en los niveles de expresión de los TCR, se observan también grandes diferencias entre los GDEi y GDE. Utilizando las amplitudes relativas calculadas con los datos del presente trabajo, la diferencia entre GDE y

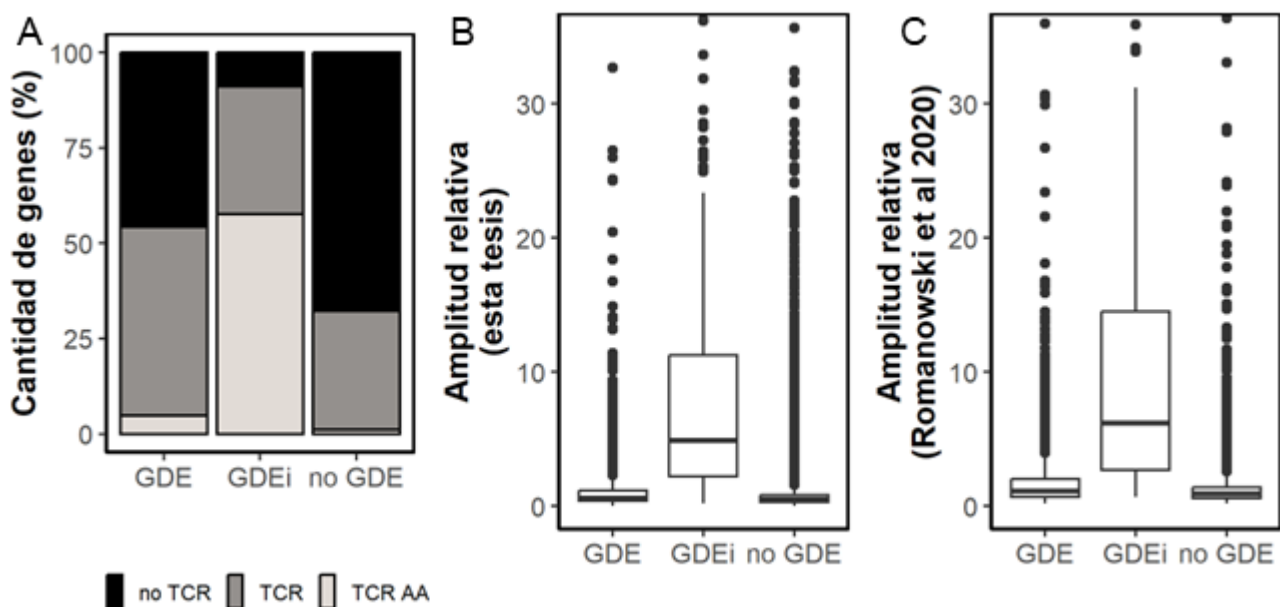


Figura 17. **DCP5 afecta la expresión de genes de alta amplitud.** (A) Proporción de transcriptos controlados por el reloj de alta amplitud (TCR AA), de baja amplitud (TCR) o transcriptos cuyos niveles de expresión no oscilan (no TCR) en genes diferencialmente expresados (GDE), GDE con interacción entre tiempo y genotipo (GDEi), y genes no diferencialmente expresados (no GDE). (B - C) Amplitud relativa de los GDE, GDEi y no GDE según (B) los datos de esta tesis o (C) los datos de Romanowski *et al.* (2020).

GDEi es de 4.3 (GDEi = 4.89 vs GDE = 0.59, Prueba U de Mann-Whitney, $p < 0.0001$) (Figura 17 B). Si se utilizan los valores de amplitud relativa calculados por Romanoski *et al.* (2020), la diferencia es de 5.1 (GDEi = 6.2 vs GDE = 0.9, Prueba U de Mann-Whitney, $p < 0.0001$) (Figura 17 C). Esto es congruente con la alta correlación entre las amplitudes calculadas con los datos generados en el presente trabajo y con los datos de Romanowski *et al.* (2020) ($R^2 = 0.81$). Los GDEi que oscilan circadianamente también tienden a tener mayor amplitud relativa en plantas

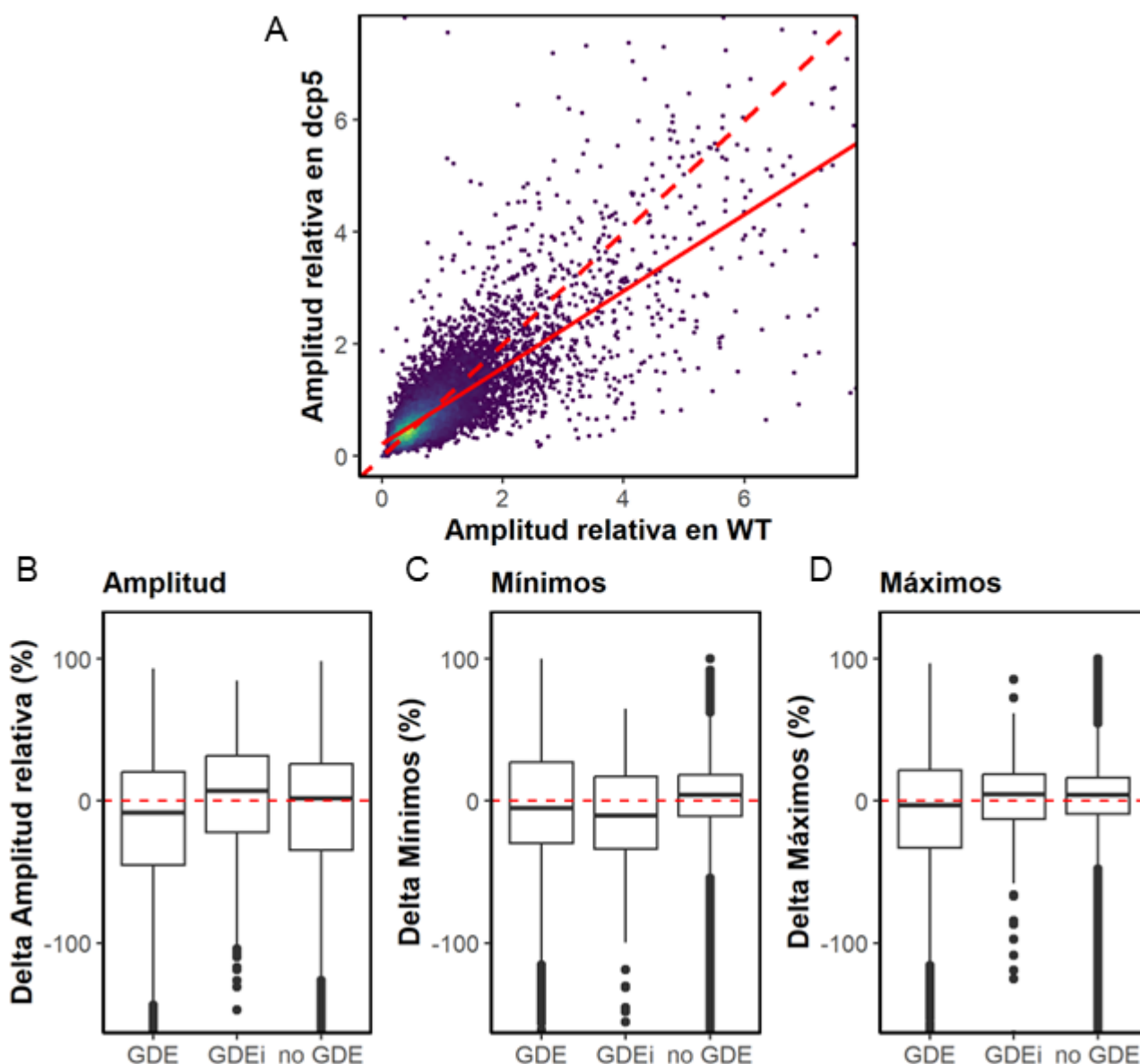


Figura 18. **Los transcritos controlados por el reloj pierden amplitud en *dcp5*.** (A) Amplitud relativa de los transcritos controlados por el reloj (TCR) en plantas silvestres (WT) y en la mutante *dcp5*. La línea roja continua es la línea del ajuste de una regresión robusta observaciones atípicas, y la línea roja punteada es una referencia de pendiente 1. (B-D) Boxplot mostrando la distribución de la diferencia de (B) amplitud, (C) valores mínimos y (D) valores máximos de expresión entre plantas silvestres y *dcp5* en genes diferencialmente expresados (GDE), GDE con interacción entre tiempo y genotipo (GDEi), y genes no diferencialmente expresados (no GDE). La diferencia fue calculada como $(WT - dcp5) / WT * 100$.

silvestres que en la mutante *dcp5* (Figura 18 A). La mediana del aumento de la amplitud es de 8.2% en los GDEi (Figura 18 B) (Prueba U de Mann-Whitney, $p < 0.0001$). Esta disminución de la amplitud relativa en *dcp5* es congruente con pisos de expresión más altos y techos más bajos que plantas silvestres (Figura 18 B y C).

Otra característica de los GDEi es que sus niveles promedio de expresión son mayores que el de los GDE y del resto del transcriptoma (Figura Suplementaria 2 A). Como hay una baja correlación entre amplitud relativa y expresión promedio (Figura Suplementaria 1 B), se estudió la amplitud relativa de los GDEi en distintos deciles de expresión para descartar que el enriquecimiento en genes de alta amplitud se deba a un enriquecimiento en genes de alta expresión. Se observa que los GDEi presentan mayor amplitud relativa que el resto del transcriptoma en todo el rango de expresión (Figura Suplementaria 2 B).

Los GDEi presenta vidas medias ligeramente más cortas que el resto de los GDE (Figura 19). Utilizando los datos de Sorenson et al. (2018), la mediana de la vida media de los GDEi es 1.73h mientras que la de los GDE es 2.04h (Prueba U de Mann-Whitney, $p < 0.05$), y con los datos de Chantarachot et al. (2020) la de los GDEi es 2.41h y la de los GDE, 2.94h (Prueba U de Mann-Whitney, $p < 0.01$). Sería interesante evaluar cómo cambia la vida media de estos transcritos en la mutante *dcp5*.

En conjunto, estos resultados indican que DCP5 regula directa o indirectamente aproximadamente el 14% del transcriptoma en condiciones normales de crecimiento. Casi un

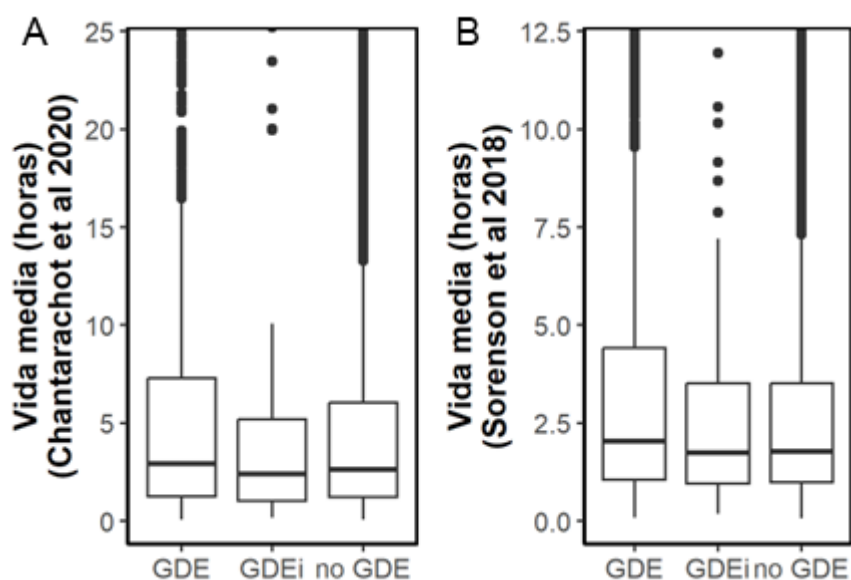


Figura 19. **Los transcritos controlados por DCP5 tienen vidas medias más cortas.** (A-B) Box-plots mostrando la distribución de vidas medias estimados por (A) Chantarachot et al. (2020) y (B) Sorenson et al. (2018) en genes diferencialmente expresados (GDE), GDE con interacción entre tiempo y genotipo (GDEi), y genes no diferencialmente expresados (no GDE).

60% de los transcriptos con alteraciones en sus niveles de expresión se unen a DCP5. Mediante un análisis de interacción entre tiempo y genotipo se halló un subconjunto de transcriptos enriquecidos en TCR de alta amplitud, incluyendo a genes del reloj biológico. Esto blancos potencialmente podrían explicar el fenotipo de reloj de la mutante *dcp5*.

Los transcriptos circadianos en *dcp5* muestran cambio de fase

Luego, se utilizó un algoritmo de agrupamiento jerárquico sobre los GDE y GDEi para encontrar patrones comunes de expresión. Se agruparon 199 de los 260 GDEi en 6 clústeres, con entre 18 y 51 genes cada uno (Figura 20). Cada clúster agrupa genes que comparten pico de expresión (Figura 21 A). En la mutante *dcp5*, se mantiene la fase de 56 transcriptos, mientras que se adelanta en 24 y se alarga en 119 (Figura 21 B). Este atraso del pico de expresión en las plantas *dcp5* con respecto a plantas silvestres no es exclusivo de los GDEi, sino que es generalizado a todo el transcriptoma circadiano (Figura 21 C). Por ejemplo, de los 1546 TCR con pico en CT=18 en plantas silvestres, solo el 34% muestran el pico a la misma hora en plantas *dcp5*, mientras que el 45% un atraso de la fase de entre 2 y 6h. Este atraso en la fase de expresión es consistente con el alargamiento de periodo observado en experimentos más extensos en el tiempo como el ensayo de movimiento de hojas y los ensayos de medición de actividad de la luciferasa bajo promotores circadianos (Figura 8).

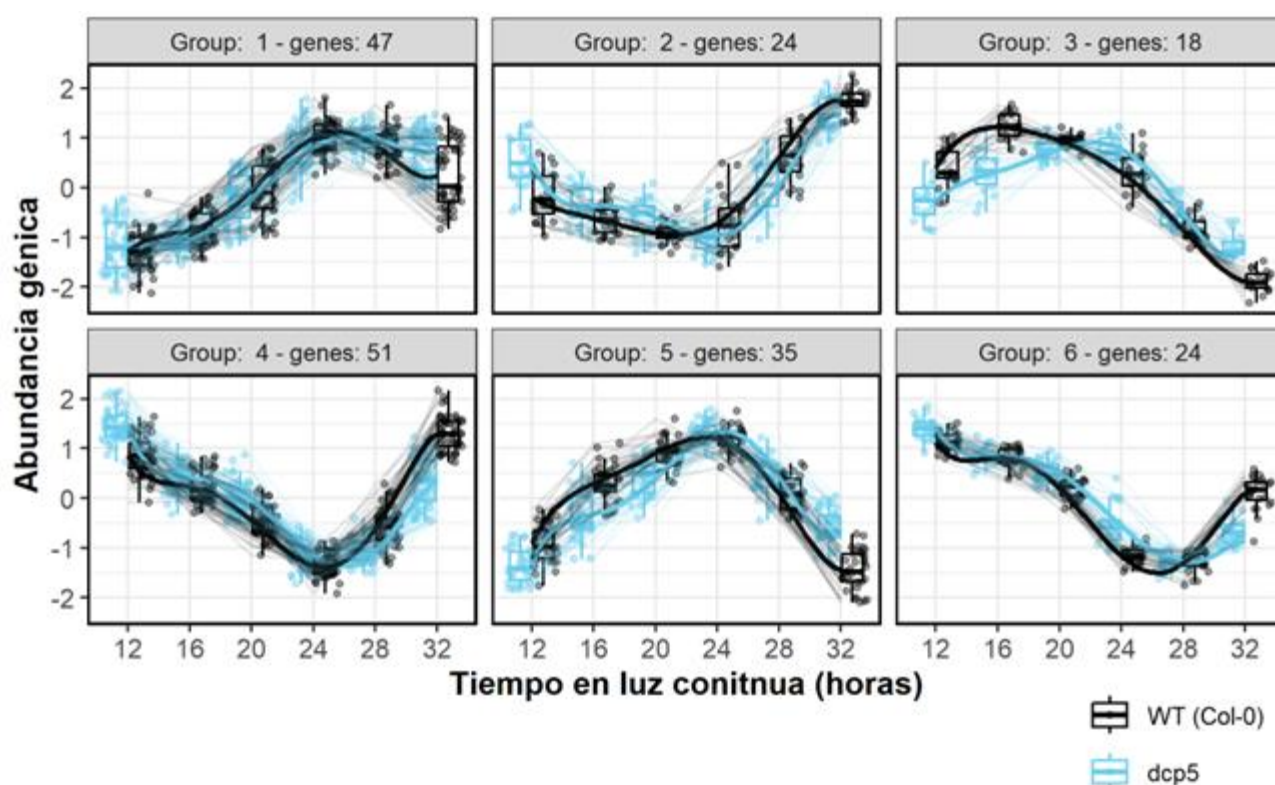


Figura 20. **DCP5 regula genes cuyos picos de expresión se reparten a lo largo de todo el día.** Patrones de expresión de clústeres de genes diferencialmente expresados con interacción significativa entre tiempo y genotipo (GDEi). Los clústeres fueron generados con el algoritmo de agrupamiento jerárquico de la herramienta bioinformática DEGrepot.

En el clúster 1 se destacan múltiples genes del oscilador central como *CCA1*, *LHY*, *LNK1*, *LNK2*, y *RVE8* (Figura 22 A-E). En este clúster también se encuentran *CONSTANTS LIKE 1* (*COL1*) y *COL2* (Figura 22 F), homólogos del gen maestro regulador de la floración *CO*. La sobreexpresión de cualquiera de ambos genes produce alteraciones en el funcionamiento del reloj (Ledger et al., 2001). De los restantes genes del oscilador central, *GI* y *PRR7* se encuentran en el clúster 2; *PRR5*

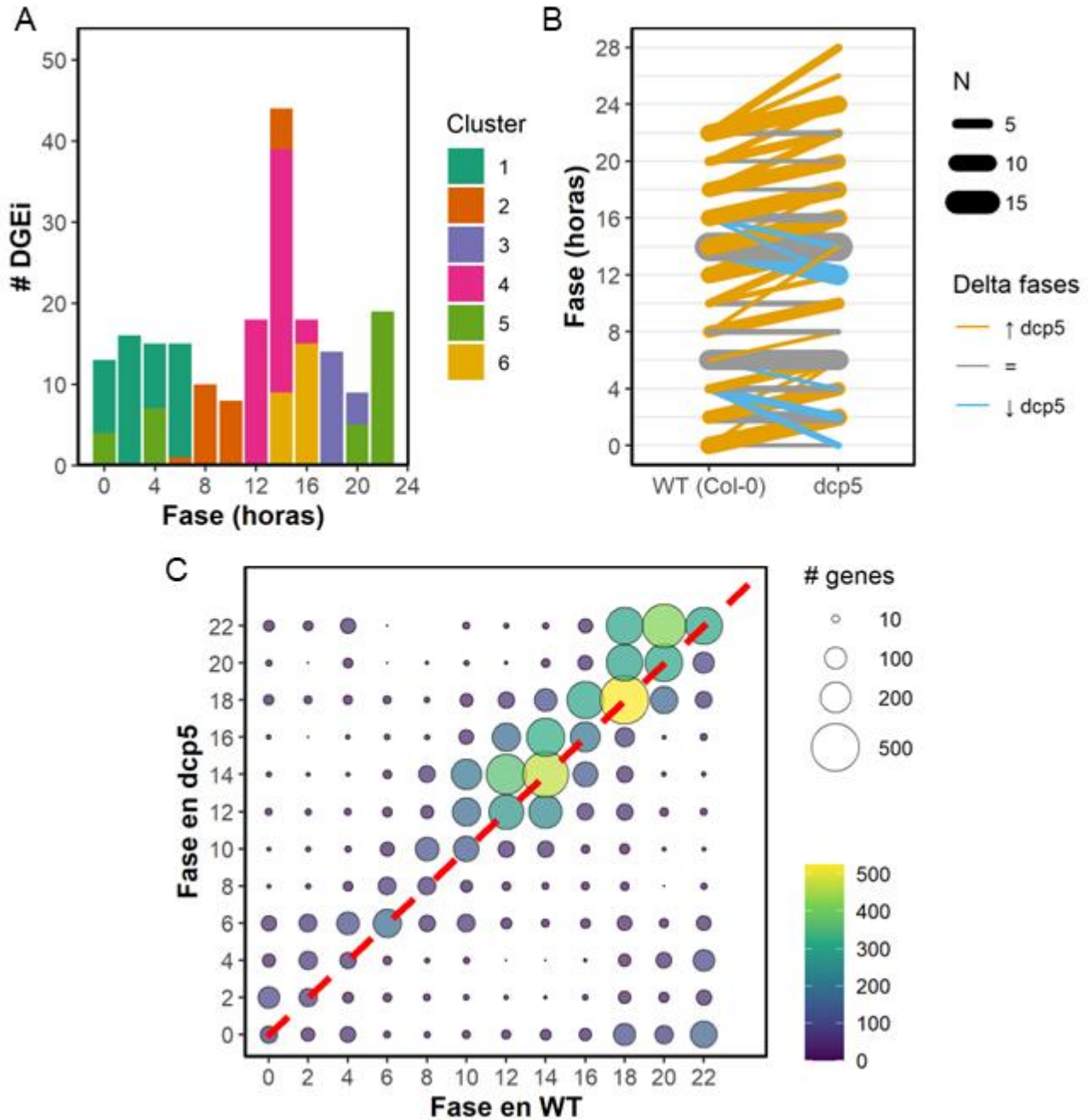


Figura 21. **El pico máximo de expresión se atrasa en *dcp5*.** (A) Distribución de fases de los genes diferencialmente expresados con interacción entre tiempo y genotipo (GDEi) en plantas silvestres por clúster. (B) Diferencia de fases de los GDEi entre plantas silvestres [WT (Col-0)] y la mutante *dcp5*. (C) Comparativa de fases de todos los transcritos circadianos en plantas silvestres (WT) y en *dcp5*.

en el clúster 4, y *PRR3* en el clúster 6 (Figura 23). En el clúster 2 también se ubican los genes involucrados en el crecimiento y termomorfogénesis *PIF4* y *HFR1*, y el gen regulador de la floración *COL5*. En el clúster 3 se ubica *CHLOROPLAST RNA BINDING* (CRB), que codifica para una proteína de unión al ARN, necesaria para controlar la amplitud de las oscilaciones circadianas en los niveles de ARNm por un presunto mecanismo que involucra una señal retrógrada del cloroplasto (Hassidim et al., 2007). Entre los genes agrupados también se

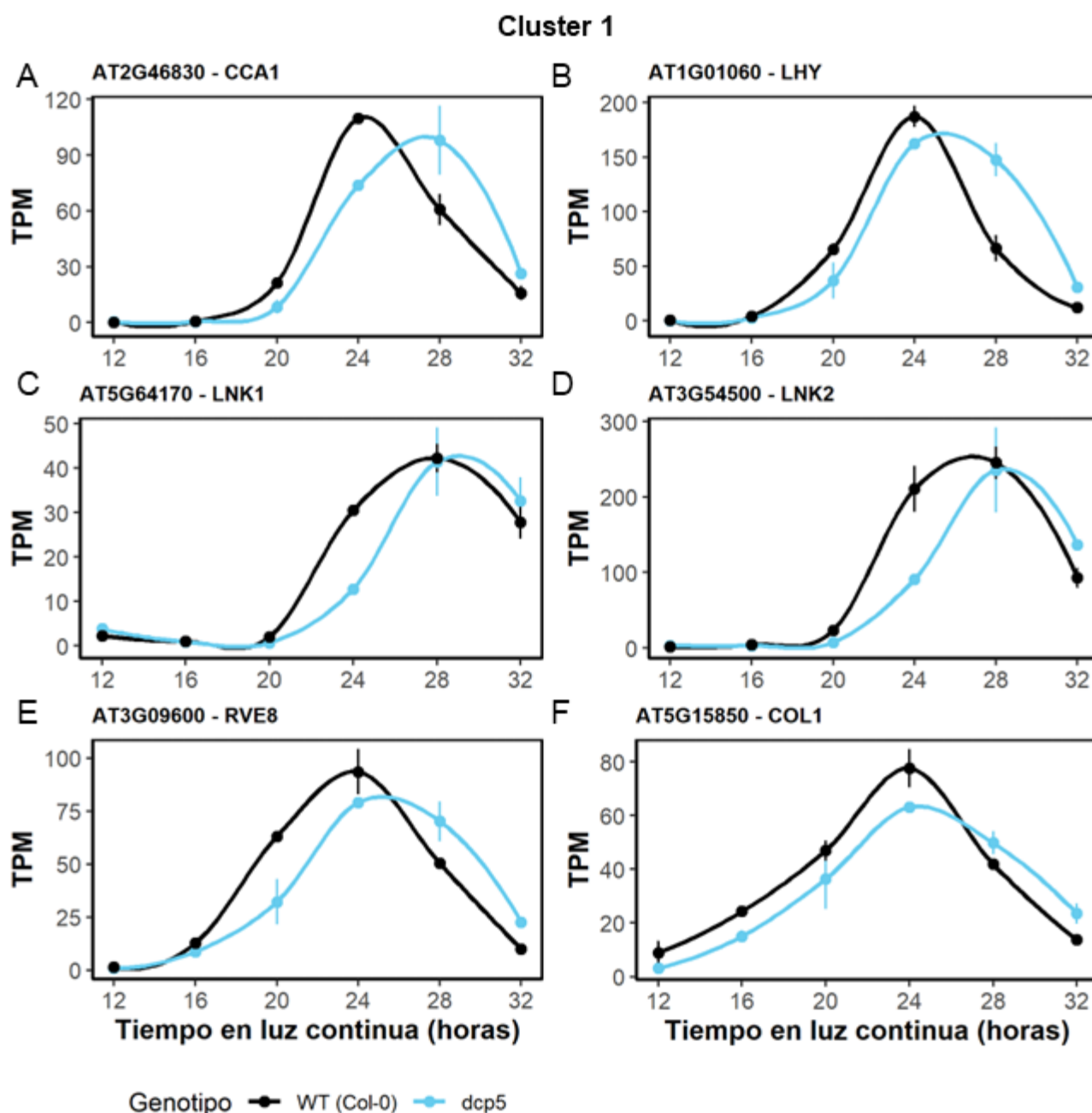


Figura 22. Los transcritos del oscilador central muestran desfases en sus picos de expresión en la mutante *dcp5*. Se muestran genes del oscilador central diferencialmente expresados con interacción significativa entre tiempo y genotipo que fueron agrupados en el clúster 1.

destacan algunos *outputs* del reloj biológico, como *GRP7*, en el clúster 4, un gen que codifica para una proteína de unión al ARN que regula la estabilidad de otros TCR (Lewinski, Steffen, et al., 2024) , o, en el clúster 5, *CATALASE 2* (*CAT2*) que regula los niveles de especies reactivas de oxígeno que ciclan circadianamente (Lai et al., 2012). *ELF4* y *PRR9* también son DGEi pero no

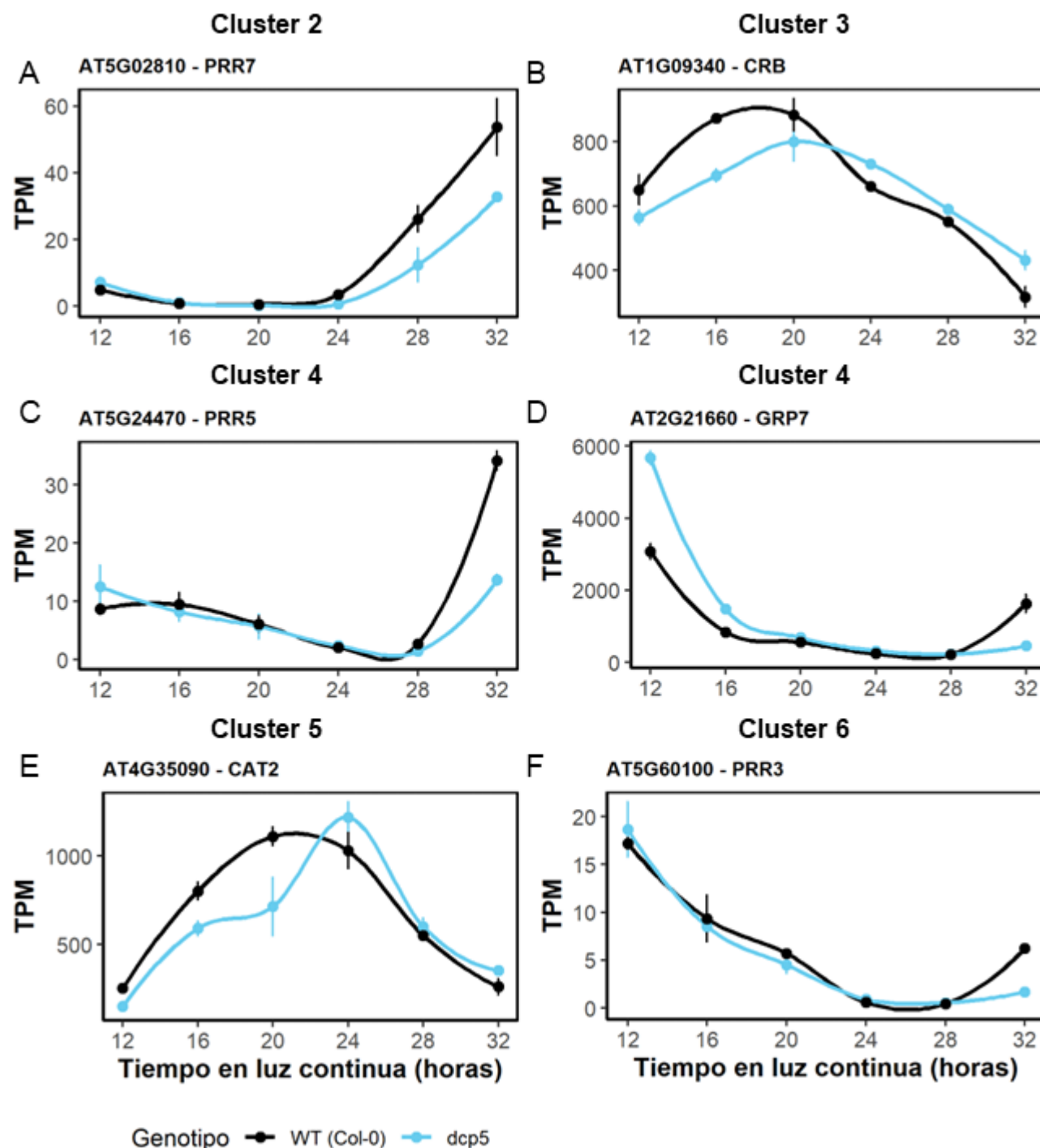


Figura 23. Los transcritos del oscilador central y outputs del reloj biológico muestran desfases en sus picos de expresión en la mutante *dcp5*. Se muestran genes del oscilador y outputs del reloj biológico central diferencialmente expresados con interacción significativa entre tiempo y genotipo que fueron agrupados en los clústeres 2 a 6.

fueron agrupados en ningún clúster (Figura 24 A-B). De los restantes genes del oscilador central, *ELF3* y *LUX* son DGE (Figura 24 C-D), y *TOC1* es el único gen no expresado diferencialmente, aunque es posible observar una tendencia hacia un atisbo de desfase en el último punto temporal (Figura 24 E). Los desfases son particularmente evidentes en los genes que alcanzan sus picos de expresión durante la mañana (Figura 22).

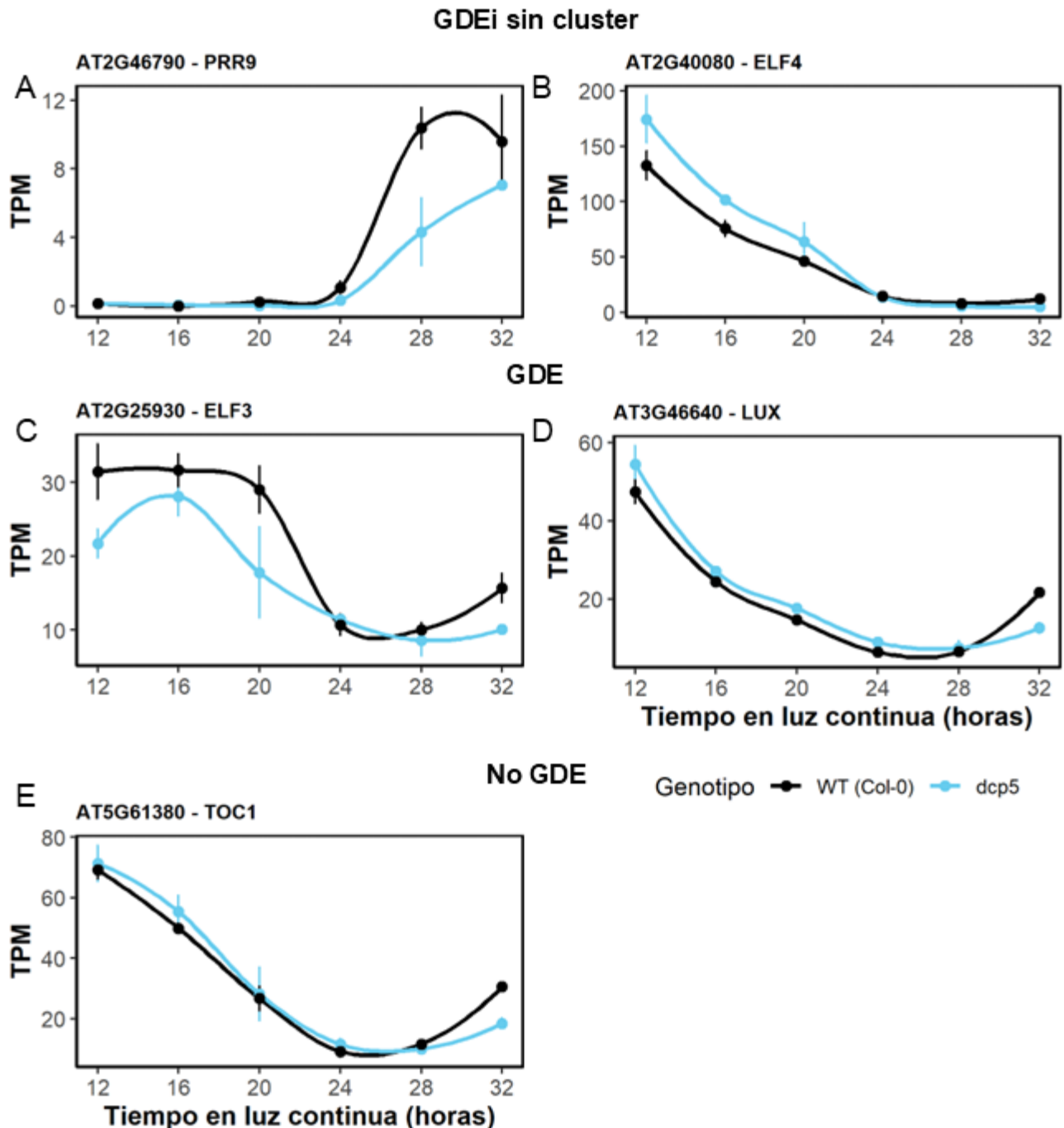


Figura 24. Los transcritos del oscilador central muestran alteraciones en sus patrones de expresión en la mutante *dcp5*. (A-D) Genes del oscilador central diferencialmente expresados (A-B) con interacción entre tiempo y genotipo o (C-D) sin interacción significativa. (E) *TOC1* es el único gen del oscilador que no está diferencialmente expresado.

Los GDE sin interacción se agruparon en 31 clústeres (Figura Suplementaria 3). Para entender como varia la expresión en los 31 clústeres, se analizó para cada GDE la dirección de la variación en cada uno de los puntos temporales. De los 31 clústeres, 15 agrupan 1325 genes mayormente sobre-expresados en *dcp5*, mientras que 16 contienen 1102 genes con la expresión mayormente disminuida en *dcp5* (Figura 25). El 64% de los GDEs cuya expresión aumenta en *dcp5* son blancos de unión DCP5 (855 de 1325), mientras que el 53% (594 de 1105) de los GDE cuya expresión disminuye en *dcp5* son blancos de DCP5 (Figura 26). Estos resultados sugieren una tendencia a la que la expresión de los blancos de unión de DCP5 y los GDEs aumente en *dcp5*.

Entre los GDE hay múltiples outputs del reloj biológico cuya expresión podría explicar el fenotipo de floración tardía de la mutante *dcp5*. *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*) integra información de la vía fotoperiódica a través de *FT* y de otras múltiples vías (Lee & Lee, 2010), y en *dcp5* sus niveles de expresión son más bajos que en plantas silvestres, consistente con el fenotipo de floración tardía (Figura 27 D). En *FT*, otro de los genes maestros reguladores de la floración, se observa un desfase en el pico de expresión y niveles menores (p-valor ajustado = 0.052). Rio arriba de la vía, varios represores de *FT*, como *FLOERING LOCUS C* (*FLC*), *TEMPRANILLO 1* (*TEM1*) y *TEM2* se encuentran sobre-expresados en *dcp5* (Figura 27 A-C) (Castillejo & Pelaz, 2008; Lee & Lee, 2010).

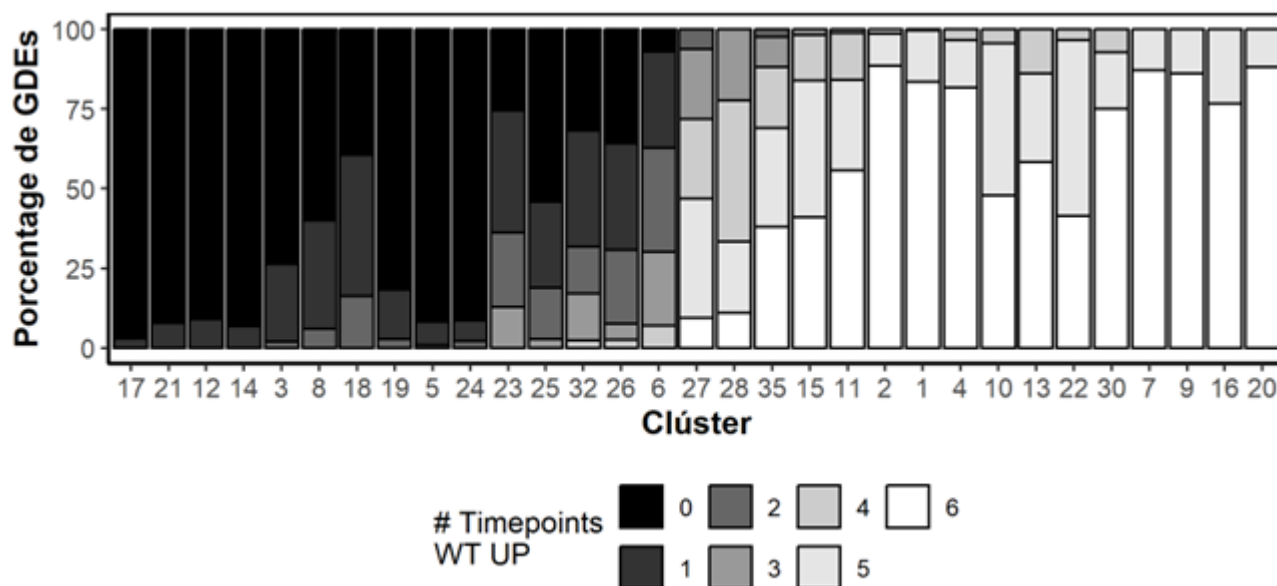


Figura 25. Análisis de dirección del cambio en los niveles de expresión por clúster. Para cada gen diferencialmente expresado (GDE) según el análisis de LTR se contó en cuantos puntos temporales la expresión de las plantas silvestres era mayor a la de las plantas mutantes *dcp5*. Los GDEs se clasificaron del 0 al 6 según el número de puntos temporales donde la expresión en plantas silvestres es mayor a las *dcp5*. Los resultados se muestran como porcentaje de cada una de las siete categorías (del 0 al 6) por clúster.

También, existen múltiples GDE capaces de alterar indirectamente los niveles de expresión del transcriptoma de manera indirecta en *dcp5*. Un ejemplo es una familia de glicosilasas de ADN de 5-metilcitosina conocida como *DEMETER* (*DME*), que se encarga de mantener niveles de metilación adecuados en el genoma de *Arabidopsis* (Ortega-Galisteo et al., 2008). Los genes de esta familia *DME*, *DEMETER LIKE 1* (*DML1*), y *DML3* están diferencialmente expresados en *dcp5* (Figura 28 A-B). *DML2* y *DML3* además se unen a DCP5. Otro ejemplo son los GDEs *COR27* y *COR28*, cuyos ARNm se une a DCP5 y ambos reprimen la expresión genes del oscilador *TOC1* y *PRR5* (Kahle et al., 2020) (Figura 28 C-D). Las alteraciones en la expresión de estos genes podrían afectar indirectamente el transcriptoma en *dcp5*.

En conclusión, en la mutante *dcp5* prácticamente todos los componentes del oscilador central se encuentran diferencialmente expresados. Estos, junto al resto de los TCR, muestran una tendencia al retraso de su fase en *dcp5*, consistente con el alargamiento del periodo de la mutante observado en los ensayos de movimientos de hojas. A nivel global, la mayoría de los GDE cuyos transcriptos son blancos de unión de DCP5 se sobre-expresan en *dcp5*, lo que es consistente con el rol de DCP5 en la degradación de ARN. Sin embargo, una gran proporción de los blancos de unión de DCP5 no se expresan diferencialmente en condiciones normales de crecimiento. Es posible que frente a otros estímulos ambientales estos transcriptos vean alterada su expresión en *dcp5*.

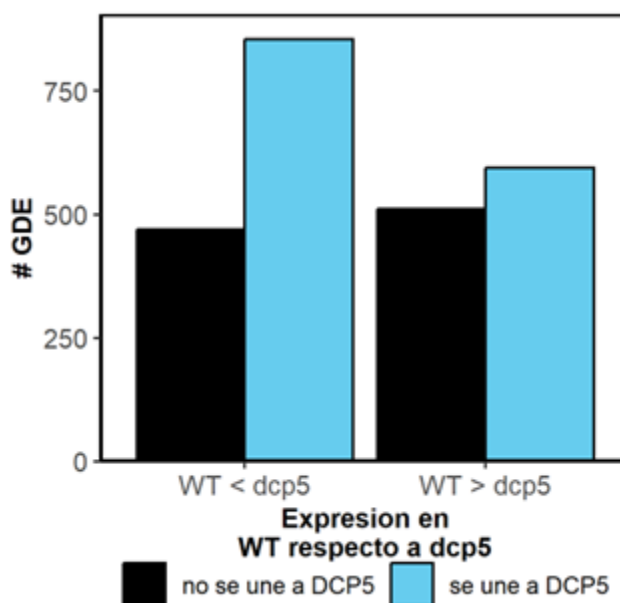


Figura 26. **Los ARN blancos de DCP5 tienden a aumentar su expresión en *dcp5*.** Cantidad de transcriptos blancos de DCP5 entre los genes diferencialmente expresados (GDEs) cuya expresión aumenta en *dcp5* (WT < *dcp5*) o disminuye (WT > *dcp5*).

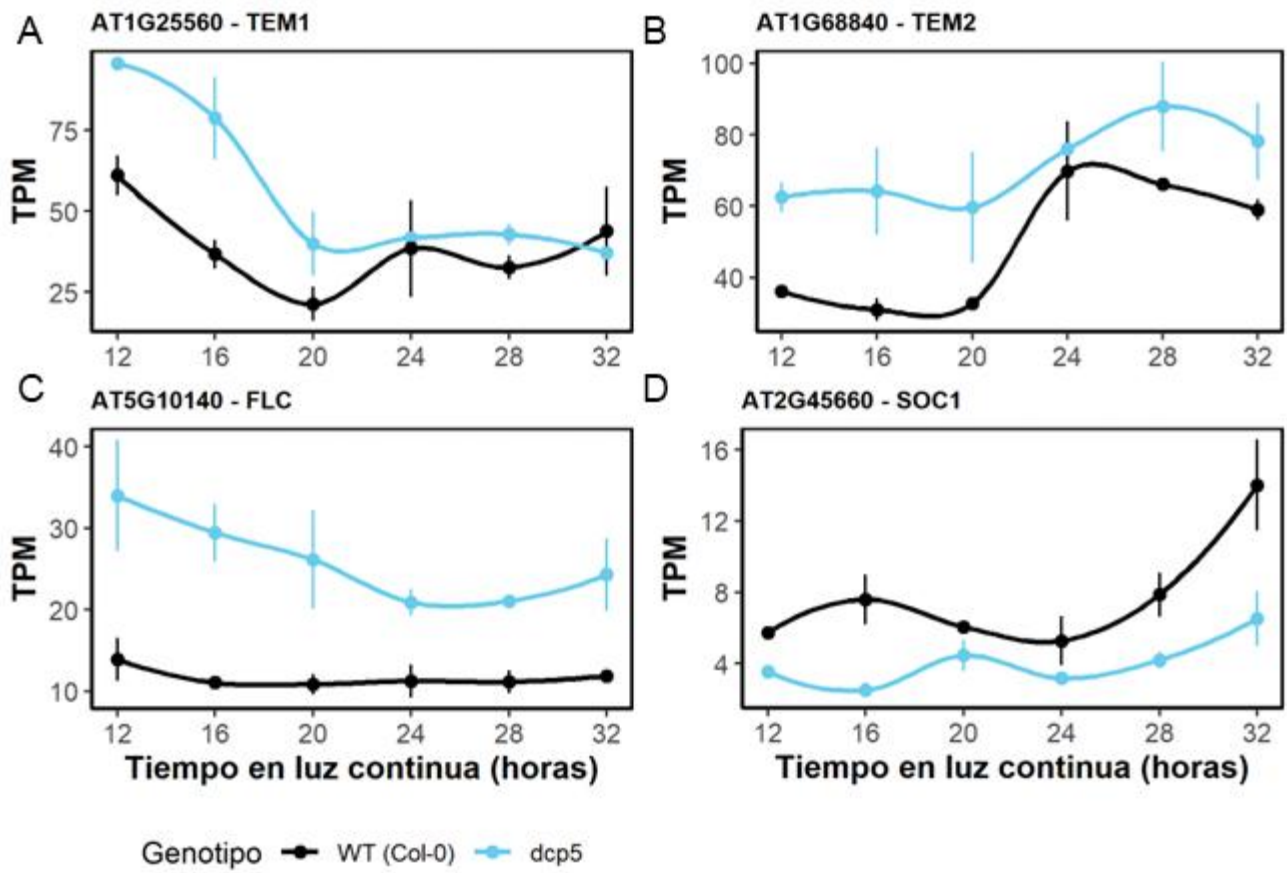


Figura 27. Expresión de genes diferencialmente expresados GDE de vías de floración en plantas silvestres y *dcp5*.

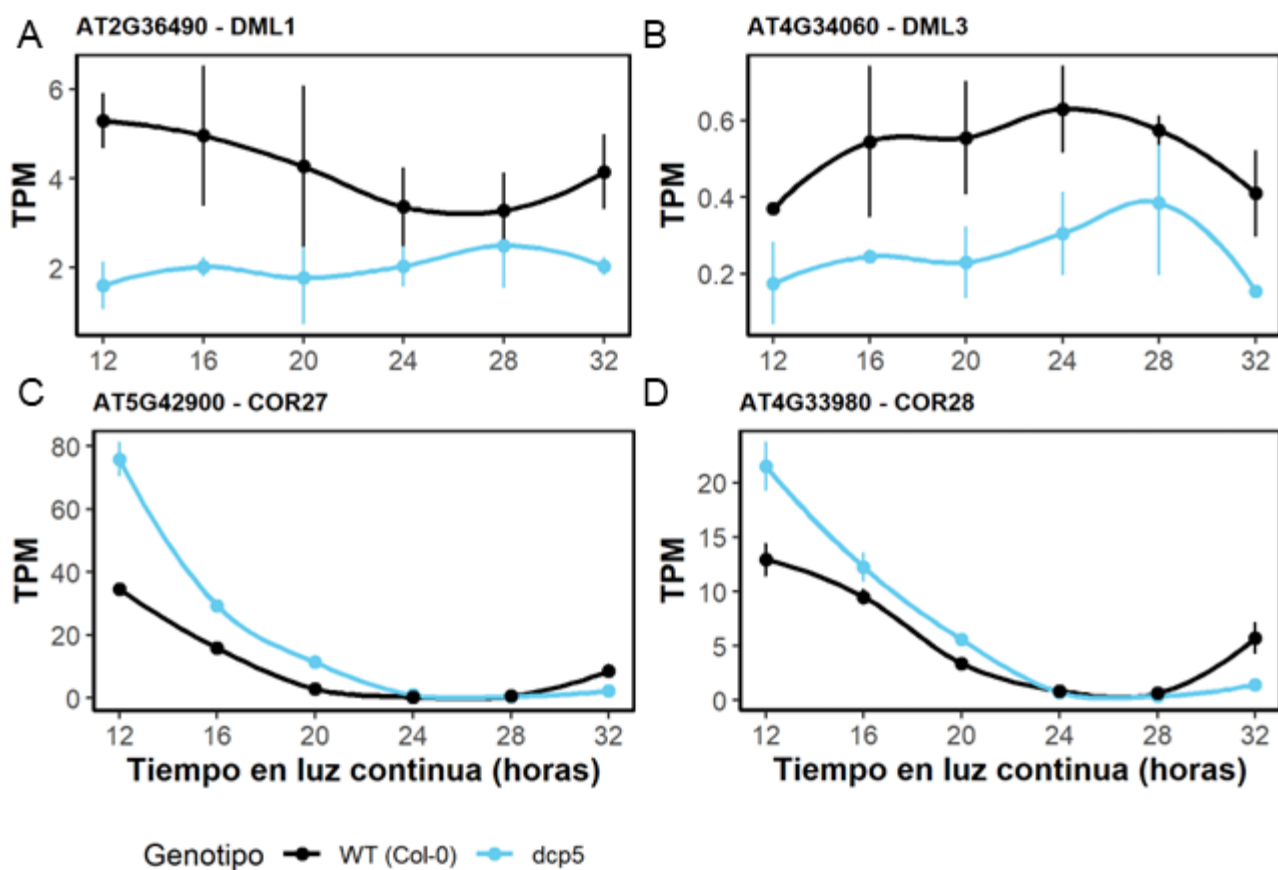


Figura 28. Expresión de genes diferencialmente expresados GDE de que regulan la expresión génica en Arabidopsis.

DCP5 es necesario para la respuesta a 28 °C

La mutante *dcp5* presenta fenotipos tanto de reloj como de termomorfogénesis, dos procesos fisiológicos estrechamente relacionados, ya que el reloj biológico regula la sensibilidad de la respuesta de termomorfogénesis. Para comprender específicamente cómo DCP5 participa en este proceso, se realizó un experimento de secuenciación masiva de ARNm, complementario al anterior, en el que se aplicaron pulsos de 28 °C durante 4h previos a la toma de muestra en seis momentos distintos del día, con el objetivo de evaluar la respuesta de *gating* en plantas silvestres y en la mutante *dcp5* (Figura 29 A). Este tiempo de tratamiento es suficiente para inducir cambios observables en la expresión génica (Mizuno et al., 2014).

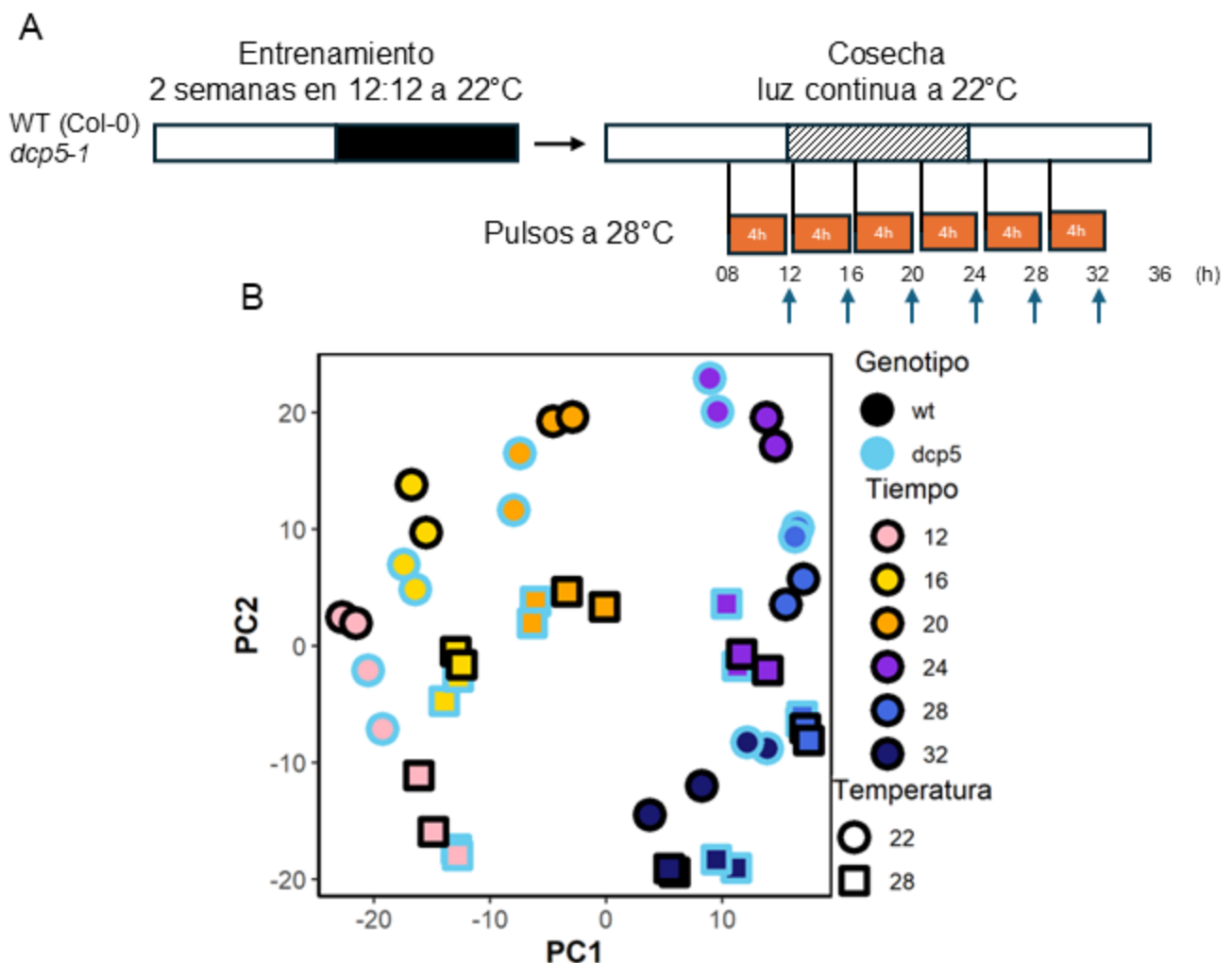


Figura 29. (A) Esquema de experimento de *gating*. Plantas silvestres y mutantes *dcp5* se crecieron por dos semanas en un fotoperiodo de 12:12 y luego fueron transferidas a luz continua. Antes de ser cosechadas, las plantas fueron tratadas con un pulso de 4h de 28 °C. Las flechas indican los momentos de cosecha. Los bloques blancos, negros, y rayados representan día, noche y noche subjetiva, respectivamente. (B) Análisis de componentes principales de las muestras a 22 °C y 28 °C.

Un análisis de componentes principales de las muestras obtenidas a 22 °C y 28 °C reveló que el principal factor de variación es el momento del día. La primera coordenada principal (PC1, eje x) separa las muestras tomadas durante el día de aquellas recolectadas en la noche subjetiva (Figura 29 B). La temperatura y, en menor medida, el genotipo constituyen los siguientes factores de variabilidad.

Para evaluar el *gating* a nivel global, se realizaron contrastes simples entre las muestras a 22 °C y 28 °C en cada punto temporal para cada genotipo (Figura 30 A). Hay 2232 genes cuya expresión responde a la temperatura, y la mayoría de los genes responsivos se agrupan en los CT12 y 24. Por su lado, en la mutante *dcp5*, hay 1963 genes que responden al pulso de 28 °C, y parece haber un desfase en el momento del día de la respuesta. Un análisis de LTR comparando un modelo que contemplaba los factores tiempo, genotipo y su interacción, y un modelo reducido que solo contemplaba el tiempo mostró 3062 genes cuya expresión depende de DCP5 a 28 °C. Es decir, teniendo en cuenta los experimentos a 22 °C y 28 °C, la expresión de 4827 genes depende de DCP5, de los cuales 2721 (56%) se unen a DCP5 según los datos de iCLIP (Figura 31). El cambio de genes targets que se expresan diferencialmente a 28 °C abona la teoría de que DCP5 puede unirse a un dado transcripto sin causar ningún efecto, y desencadenar su acción con el reclutamiento de otros factores en trans regulados por señales internas o externas. Esto cobra sentido teniendo en cuenta que, según datos de la base de datos ePlant, los niveles de expresión

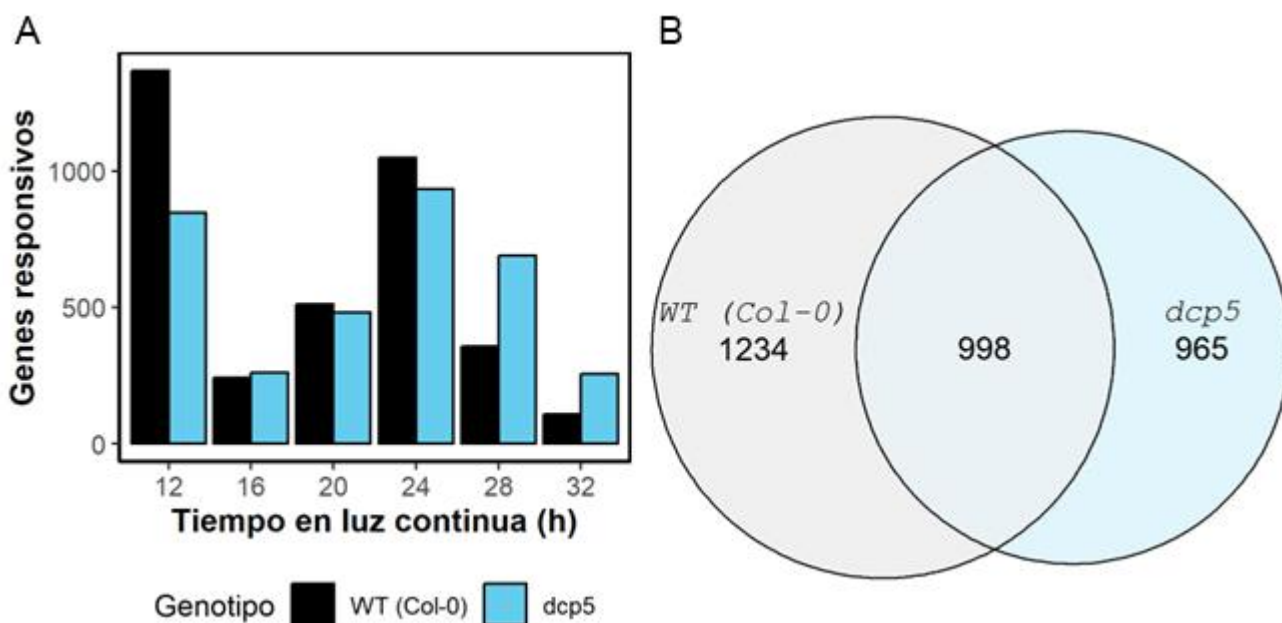


Figura 30. **El *gating* del transcriptoma se ve atenuado en la mutante *dcp5*.** (A) Cantidad de genes que responden a un pulso de 4h de 28 °C por punto temporal. (B) Diagrama de Venn mostrando los genes que responden a la temperatura en cada genotipo.

de DCP5 no sufren grandes cambios a lo largo de del desarrollo ni frente a distintos estímulos externos, siendo bastante estables frente a distintas situaciones (Waese et al., 2017).

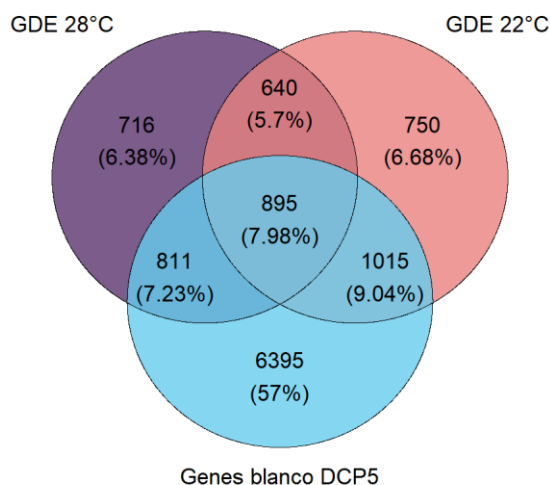


Figura 31. Diagrama de Venn mostrando la superposición entre genes diferencialmente expresados entre plantas silvestres y la mutante *dcp5* según el análisis de LTR a 28 °C (GDE 28 °C) y a 22 °C (GDE 22 °C) con los genes cuyos ARNm son blanco de unión de DCP5.

La vía de auxinas es regulada por DCP5

La vía de auxinas regula el crecimiento durante la termomorfogénesis y los actores que la componen han sido estudiados en profundidad. El primer paso en la vía involucra la percepción de la temperatura ambiente. En *Arabidopsis* se ha reportado la existencia de tres termosensores involucrados en la termomorfogénesis: phyB, ELF3 y PIF7. Al analizar los niveles de expresión de los termosensores, no se ven cambios significativos entre plantas silvestres y *dcp5* (Figura Suplementaria 4). La temperatura inhibe la actividad tanto de ELF3 como de phyB, y a la vez favorece la traducción de PIF7 (Chung et al., 2020; Jung et al., 2020; Legris et al., 2016). Por lo que no es sorprendente que DCP5 no afecte los niveles de sus transcriptos. Un detalle llamativo es que la estructura secundaria en el 5'UTR del transcripto de PIF7 que regula su traducción, esta flanqueada por sitios de unión de DCP5 (Figura Suplementaria 5). Sería interesante estudiar si DCP5 está involucrado y regula de alguna manera la traducción de PIF7.

PIF7 además de ser un termosensor es, junto a PIF4 y PIF5, un regulador maestro de la termomorfogénesis (Martínez et al., 2018). PIF4 es probablemente el regulador más estudiado de los tres y se ha descrito como es finamente controlado por múltiples actores (L. L. Zhang et al., 2021). *PIF4* no es blanco de DCP5 aunque *PIF5* y *PIF7* si lo son. Los análisis de LTR muestran que *PIF4* y *PIF5* están diferencialmente expresados tanto a 22 °C como a 28 °C (Figura 32). Ambos genes muestran una mayor respuesta a los pulsos de 28 °C durante la noche subjetiva, más precisamente en pulsos dados entre CT12 a 16 y de CT16 a 20. En la mutante *dcp5* ambos genes también responden a los pulsos de temperatura, pero mostrando un desfase con respecto a plantas silvestres (Figura 32). Entre los genes del reloj que regulan a *PIF4* se encuentran *PRR5*, *TOC1*, *ELF4* y *LUX* (L. L. Zhang et al., 2021). Todos estos se encuentran diferencialmente expresados entre plantas silvestres y *dcp5* a 28 °C (Figura 33 A-D y Figura Suplementaria 6 A-D). Es probable que el periodo largo del reloj en ausencia de DCP5 impacte en las oscilaciones de los *outputs* *PIF4* y *PIF5*. Además de los genes del reloj, el factor de transcripción y *output* del reloj biológico BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 (BZR1) también controla la expresión de *PIF4*. En temperaturas cálidas, BZR1 se une directamente a la región promotora de *PIF4* promoviendo su expresión (Ibañez et al., 2018). DCP5 se une al ARNm de *BZR1* y su expresión esta alterada tanto a 22 °C como a 28 °C en la mutante *dcp5* (Figura Suplementaria 6 E-F). Otro gen que modula la actividad de PIF4 es *LONG HYPOCOTYL IN FAR RED 1* (HFR1) (Hayes et al., 2017). HFR1 forma heterodímeros con PIF4 y evita que se una a sus genes blanco. Su expresión depende también de DCP5 (Figura 33 E-F).

PIF4, *PIF5* y *PIF7* activan directamente la expresión de varios genes de las vías de síntesis y señalización de auxinas (Burko et al., 2022; Fiorucci et al., 2020; Franklin et al., 2011; Leivar et al., 2008; J. Sun et al., 2012). Las auxinas son hormonas vegetales involucradas en el crecimiento celular inducido por oscuridad (escotomorfogénesis) y por temperaturas cálidas (termomorfogénesis) (Arsovski et al., 2012; Casal & Balasubramanian, 2019) Los genes involucrados en la vía de señalización de auxinas están sobrerrepresentados entre los genes

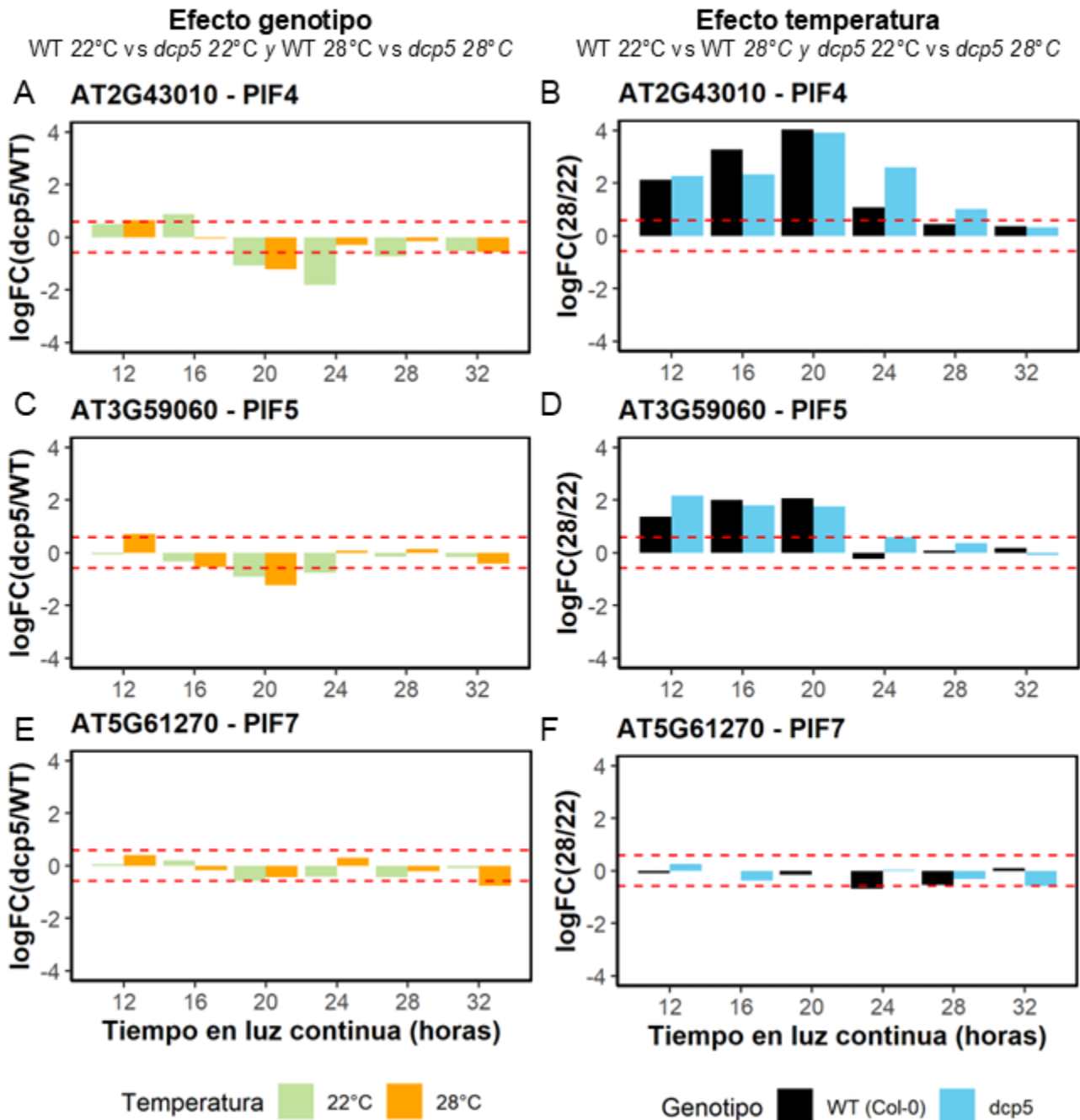


Figura 32. La expresión de los reguladores maestros *PIF4* y *PIF5* esta alterada en la mutante *dcp5*. Para cada gen se muestra (A, C, E) el efecto del genotipo [$\log_2\text{FC}(\text{dcp5}/\text{WT})$] a 22 °C y 28 °C, y (B, D, F) el efecto de la temperatura [$\log_2\text{FC}(\text{dcp5}/\text{WT})$] en plantas silvestres y *dcp5*. Las líneas punteadas representan un $|\log(\text{FC})|$ de $\log_2(1.5)$.

regulados por el reloj (Covington & Harmer, 2007). De una lista de 230 genes involucrados en la vía de auxinas, 50 (22%) necesitan a DCP5 para su correcta expresión (Figura 35) (Casal et al., 2025).

Las auxinas se sintetizan a partir de triptófano a través de varias vías (Casanova-Sáez et al., 2021). Las dos rutas mejor caracterizadas incluyen, por un lado, la conversión del triptófano

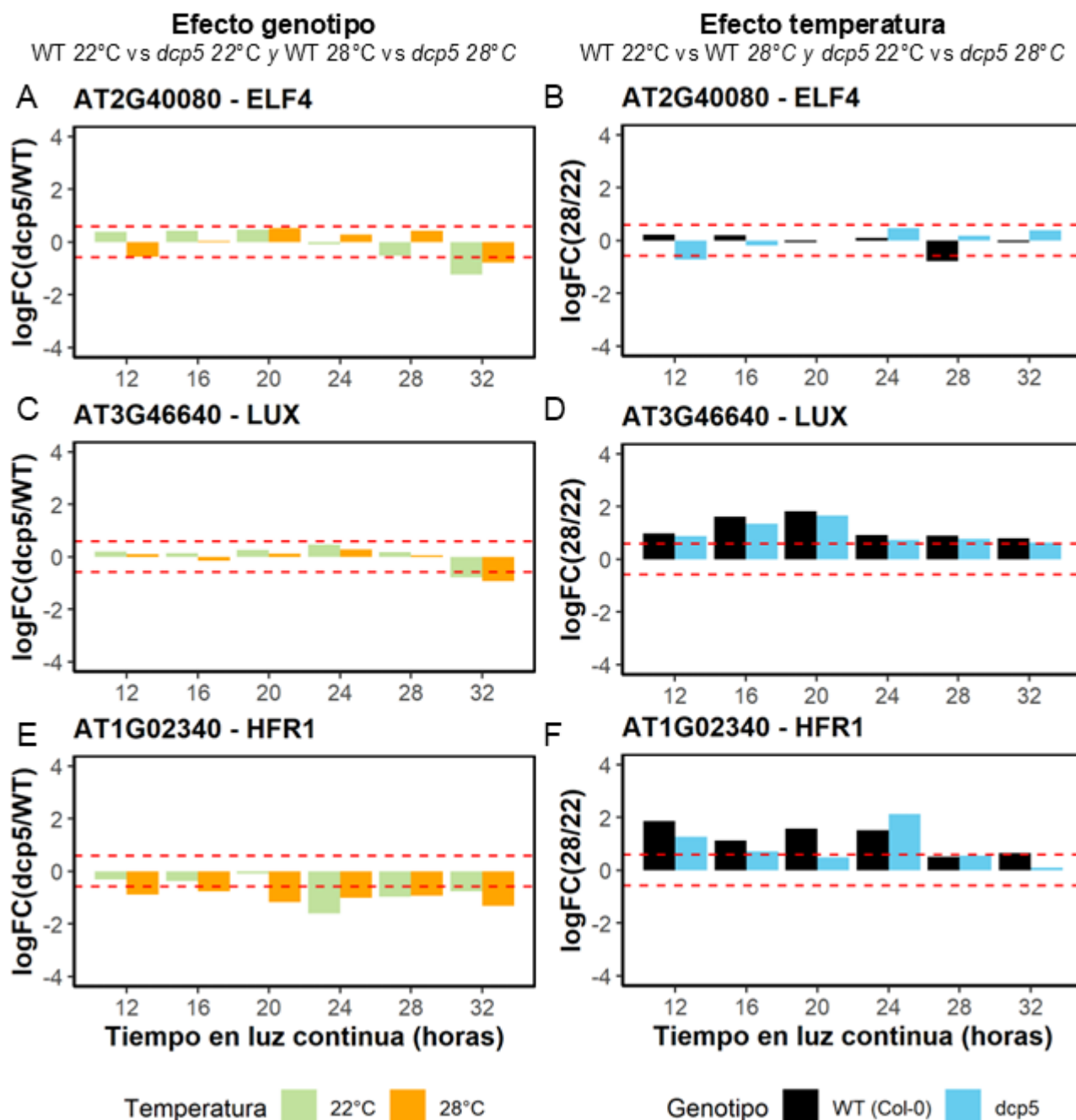


Figura 33. La expresión de los reguladores de la termomorfogénesis *ELF4*, *LUX* y *HFR1* está alterada en la mutante *dcp5*. Para cada gen se muestra (A, C, E) el efecto del genotipo [$\log_2FC(dcp5/WT)$] a 22 °C y 28 °C, y (B, D, F) el efecto de la temperatura [$\log_2FC(dcp5/WT)$] en plantas silvestres y *dcp5*. Las líneas punteadas representan un $|\log_2FC|$ de $\log_2(1.5)$.

en ácido indol-3-pirúvico mediante la enzima TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1 (TAA1), seguido por su transformación en auxinas por la acción de los genes *YUCCA*. Por otro lado, la vía alternativa involucra la conversión del triptófano en ácido indol-3-acetaldoxima por CYTOCHROME P450 79 B3 (CYP79B3), que posteriormente se convierte en auxinas por un mecanismo aun no identificado (Mashiguchi et al., 2011). Franklin et al., (2011) reportaron que, tras un pulso de 28 °C durante 24 horas en plantas cultivadas durante cinco días bajo luz continua, se induce la expresión de genes de la vía de síntesis de auxinas, específicamente *CYP79B2* y *TAA1*. Sin embargo, bajo las condiciones experimentales utilizadas en esta tesis, no se observó dicha inducción. En cambio, se detectaron aumentos de la expresión de *YUCCA2*, *YUCCA8* y *YUCCA9* por los pulsos de 4h de 28 °C (Figura 34 y Figura 35). En la mutante *dcp5*, *CYP79B3* y los mencionados genes *YUCCA* se encuentran disminuidos en su expresión, mientras que la de *TAA1* aumenta (Figura 34 y Figura 35). A excepción de *CYP79B3*, ninguno de estos transcriptos se une a DCP5, por lo que es presumible que el efecto en la expresión sea indirecto. Estos resultados sugieren que los niveles de auxinas en la mutante *dcp5* son inferiores a los observados en plantas silvestres.

Las auxinas se sintetizan principalmente en los cotiledones, y desde ahí son transportadas largas distancias de manera pasiva por el tejido vascular. Luego, en la región de destino, son distribuidas de manera activa por transportadores de varias familias: los PIN-FORMED (PIN), los PIN-LIKES (PILS), AUXIN INFLUX CARRIER (AUX), y ATP-binding cassette B (ABCB) (Gao et al., 2024). La expresión de múltiples miembros de estas familias esta alterada en la mutante *dcp5*. La expresión de *PIN3*, *PIN7*, *PILS5*, *AUX1* y *ABCB15* es menor tanto a 22 °C como 28 °C en plantas *dcp5* (Figura 34 y Figura 35). Por su lado *PILS4* tienen niveles de expresión similares a 22 °C en ambos genotipos, pero los pulsos de 28 °C hacen que la expresión aumente, en lugar de disminuir como ocurre en plantas silvestres (Figura 35).

Las auxinas pueden ser catabolizadas a formas inactivas para regular la concentración de su forma activa. Dos familias de genes involucradas en este proceso son *GRETCHEN HAGEN3* (*GH3*) y *DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION* (*DAO*) (Casanova-Sáez et al., 2021). Los genes *GH3.3* y *GH3.5* exhiben una respuesta de *gating*, en la que su expresión aumenta o disminuye en comparación con 22 °C dependiendo del momento del día (Figura 35). En la mutante *dcp5*, los niveles de expresión de ambos genes son inferiores a los de las plantas silvestres (Figura 34). Además, la respuesta de *GH3.3* a 28 °C es nula en *dcp5*, mientras que para *GH3.5* la inducción es menor (Figura 35). Por otro lado, *DAO2* responde a pulsos de 28 °C con una mayor sensibilidad

durante la noche subjetiva (Figura 35). En *dcp5*, tanto los niveles basales a 22 °C como el aumento de expresión en respuesta a 28 °C están atenuados (Figura 35).

Una vez dentro de la célula de destino, las auxinas promueven la interacción entre la familia de proteínas F-BOX formada por TIR1 y AFB1-3, y los represores transcripcionales Aux/IAA. Al interaccionar, los Aux/IAA pierden su capacidad de reprimir la transcripción y son marcados para degradación (Weijers & Wagner, 2016). *TIR1*, *AFB2* y *AFB3* son blancos de DCP5. Además, *TIR1* aumenta su expresión en 28 °C en la mutante *dcp5* en mayor medida que en plantas silvestres (Figura 35). Por su lado, los niveles de expresión de *IAA3*, *IAA8*, *IAA17*, *IAA19*, *IAA29* disminuyen en *dcp5*, mientras que los de *IAA27* y *IAA28* aumenta (Figura 34).

La principal familia génica que regulan los Aux/IAA son los *ARFs* (Weijers & Wagner, 2016). El genoma de *Arabidopsis* codifica 23 *ARFs* (1 a 23). Entre los GDEs entre plantas silvestres y *dcp5*, se encuentran ARF10, ARF11, ARF16 y ARF17 (Figura 34). Estos *ARFs* se expresan en menor nivel en la mutante *dcp5* a pesar de los bajos niveles de sus represores transcripcionales.

Rio abajo de la cascada de señalización se encuentran los *SMALL AUXIN UP-RNAs* (*SAUR*), una familia compuesta por 79 genes con alta redundancia en sus funciones (Stortenbeker & Bemer, 2019). Los SAUR inhiben la acción de las PROTEIN PHOSPHATASE TYPE 2C (PP2C), evitando así la desfosforilación de las H⁺ ATPases ubicadas en la membrana celular apoplasto (Arsuffi & Braybrook, 2018). Las H⁺ ATPases fosforiladas acidifican el apoplasto, lo que activa a un conjunto de enzimas denominadas expansinas, que debilitan la pared celular permitiendo la elongación celular (Cosgrove, 2025). A 28 °C, en la mutante *dcp5* hay 20 genes SAUR (SAUR 14, 16, 19-24, 26, 29, 41, 50, 62-67, 71 y 79), 11 de 35 expansinas, 2 PP2C [ARABIDOPSIS PP2C CLADE D7 (APD7) y APD9] y la H⁺ ATPasa AHA11 diferencialmente expresados (Figura 34).

De los 265 genes involucrados en el crecimiento celular por la vía de auxinas, 110 (41.5%) oscilan circadianamente. Llamativamente, en el subconjunto los GDEs en *dcp5*, 45 de 61 (69.2%) oscilan circadianamente. De la misma manera, 101 (38%) de los genes de la vía de auxinas son blanco de DCP5, mientras que ese número asciende a 57% entre los GDEs.

En resumen, toda la vía de señalización de auxinas se encuentra afectada en *dcp5*. Los niveles bajos de los principales componentes de la vía de síntesis y señalización en la mutante *dcp5* son congruentes con el fenotipo de hipocótilo corto que muestra a 28 °C. Esto probablemente se debe a una combinación de efectos directos e indirectos. En la mutante *dcp5* se observa una tendencia general a mostrar niveles de expresión menores, incluso entre los transcriptos blanco de DCP5.

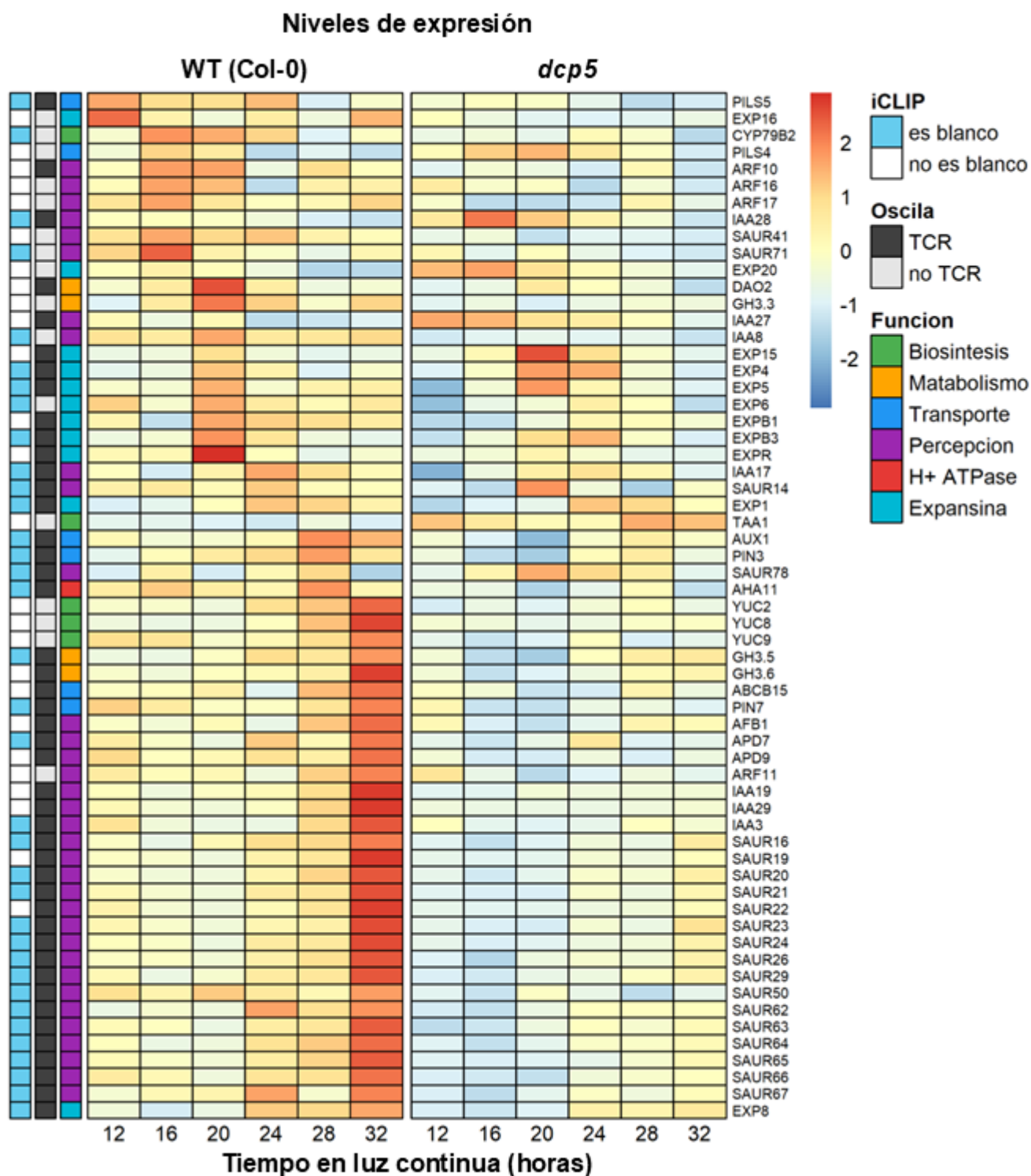


Figura 34. **Múltiples genes de la vía de auxinas cambian sus patrones de expresión en *dcp5*.** *Heatmap* mostrando los patrones de expresión a 28 °C de genes de la vía de señalización de auxinas cuya expresión cambia significativamente en *dcp5*.

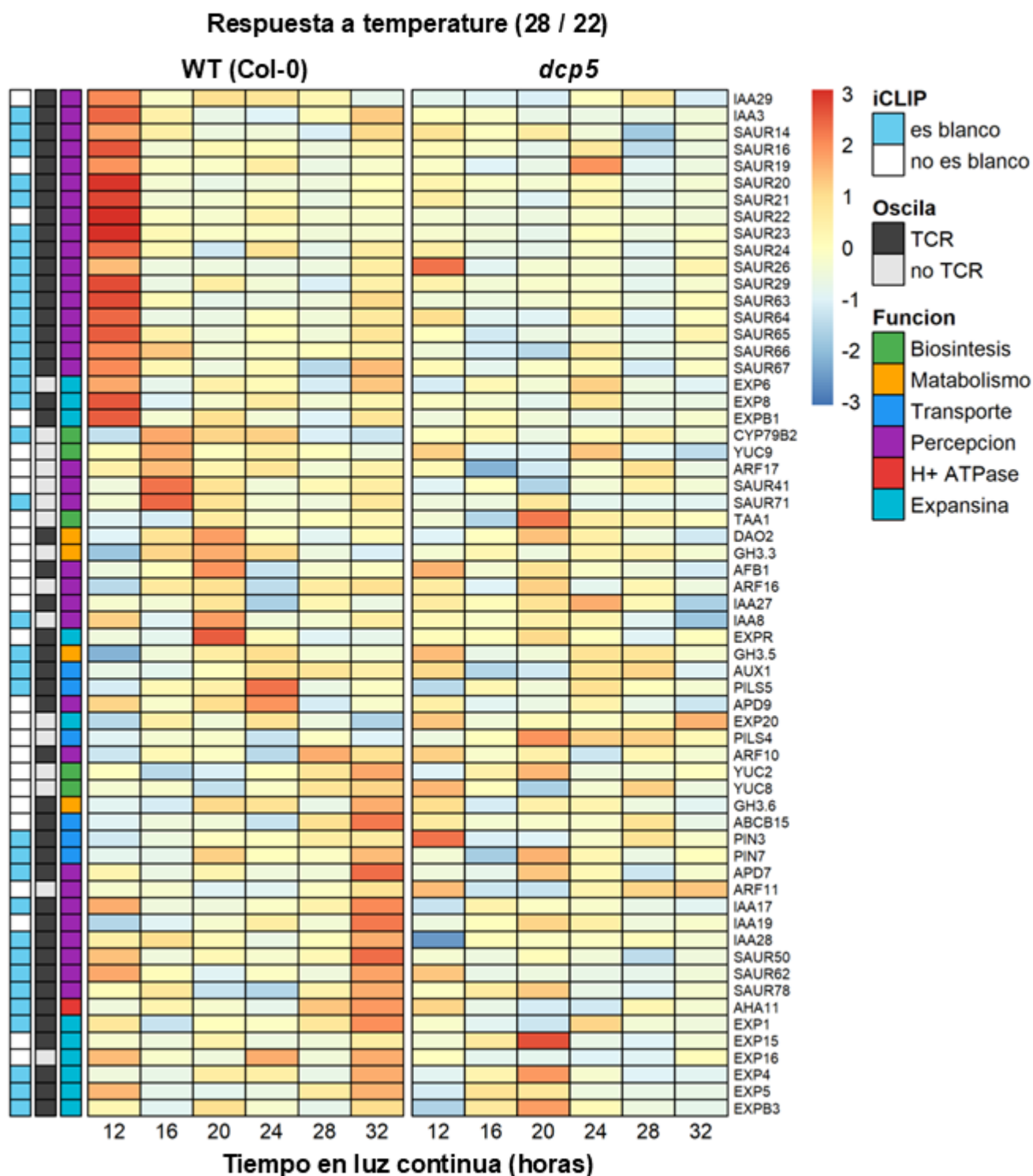


Figura 35. **DCP5 controla el *gating* en la expresión de genes de la vía de auxinas.** *Heatmap* con valores de $\log_2(28\text{ °C}/22\text{ °C})$ para plantas silvestres y la mutante *dcp5* de genes diferencialmente expresados entre ambos genotipos a 28 °C.

Mutaciones en *RDR6* revierten el fenotipo de *dcp5*

Los fenotipos particulares de múltiples mutantes de componentes de la vía de degradación de ARNm se revierten cuando se incorporan mutaciones adicionales en componentes de la vía de silenciamiento post-transcripcional, como en la polimerasa de ARN dependiente de ARN RDR6. Por ejemplo, el fenotipo de la mutante *dcp5* de resistencia a infecciones con el virus del mosaico de la coliflor se revierte en la doble mutante *dcp5 rdr6* (Hoffmann et al., 2022). A nivel molecular esto se debe a que DCP5 protege parcialmente al ARN viral de RDR6 y de la maquinaria de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS), por lo que en la mutante *dcp5* se generan más ARNs pequeños de interferencia necesarios para detectar y degradar el ARN viral (Hoffmann et al., 2022). Sin embargo, este fenómeno no es exclusivo a ARNs exógenos. En otras mutantes de componentes de la vía de degradación, como *dcp2* o *xrn4 ski2*, se reportó que sus fenotipos de letalidad se revierten al cruzarlas con la mutante *rdr6* (De Alba et al., 2015; X. Zhang et al., 2015). Esto se debería a que en las mutantes simples se acumulan ciertos ARNm endógenos, a partir de los cuales la maquinaria de PTGS generan ARN pequeños

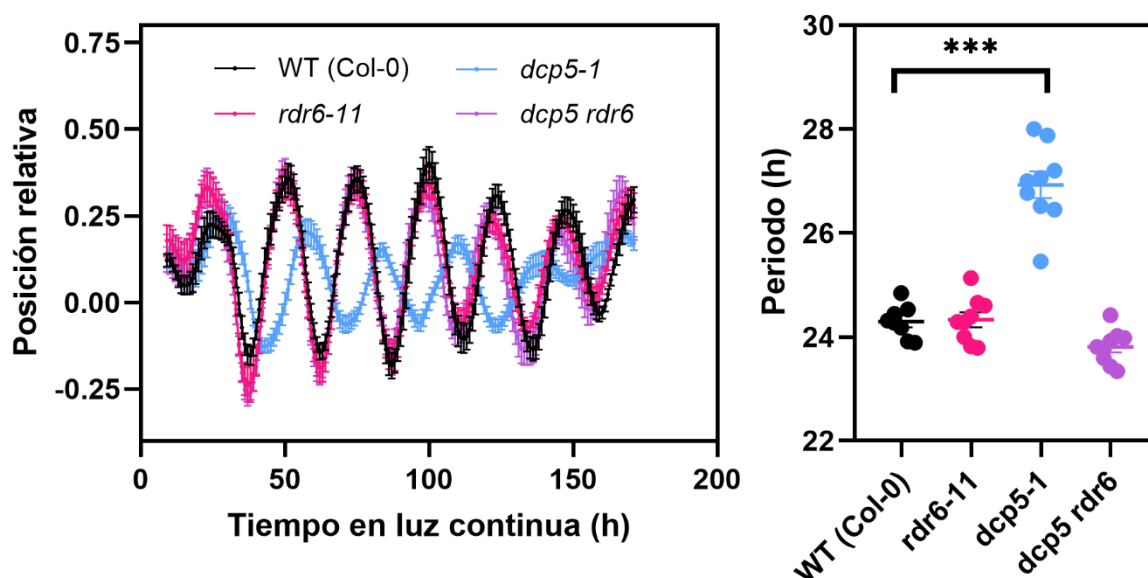


Figura 36. *rdr6* rescata el fenotipo de reloj de *dcp5*. Mediciones de movimiento relativo para el primer par de hojas en plántulas sincronizadas bajo condiciones de día largo y luego transferidas a luz continua (LL). Plantas silvestres (Col-0) (círculos negros), *rdr6-11* (círculos magenta), *dcp5-1* (círculos cian), *dcp5-1 rdr6-11* (triángulos violetas). (B) Largo del período de los ritmos de movimiento de hojas estimada mediante análisis de transformación rápida de Fourier con mínimos cuadrados no lineales (FFT-NLLS). Las barras de error representan la desviación estándar (SD).

de interferencia derivados de transcritos codificantes, denominados rqc-siRNAs, capaces de alterar la expresión del transcriptoma.

Para analizar si los fenotipos de la mutante *dcp5* en condiciones no infectivas dependen de la presencia de rqc-siRNAs generados a partir de ARNs endógenos, se generó la doble mutante *dcp5 rdr6*. Efectivamente, se observa que la doble mutante *dcp5 rdr6* tiene un periodo de movimiento de hojas indistinguible del de las plantas silvestres (Figura 36). De manera similar, en la doble mutante *dcp5 rdr6* se revierten los fenotipos de floración y crecimiento de hipocótilo a 28 °C (Figura 37 y Figura 38).

Para investigar los motivos moleculares del rescate del fenotipo por mutaciones en *RDR6*, realizamos una secuenciación masiva de ARNs pequeños en plantas silvestres, y en las mutantes *dcp5* y *rdr6* de muestras tomadas en dos momentos del día (CT12 y CT24) (Figura 39 A). La cantidad de lecturas con un largo correspondiente al de los rqc-siRNAs (21-22nt) obtenidas es similar a las reportadas por otros trabajos (Tabla Suplementaria 3) (X. Zhang et al., 2015). Para chequear la calidad de la secuenciación se observó la cantidad de lecturas que mapearon a los genes *TAS*, que codifican para un tipo de ARN pequeño de interferencia denominado tasiRNA

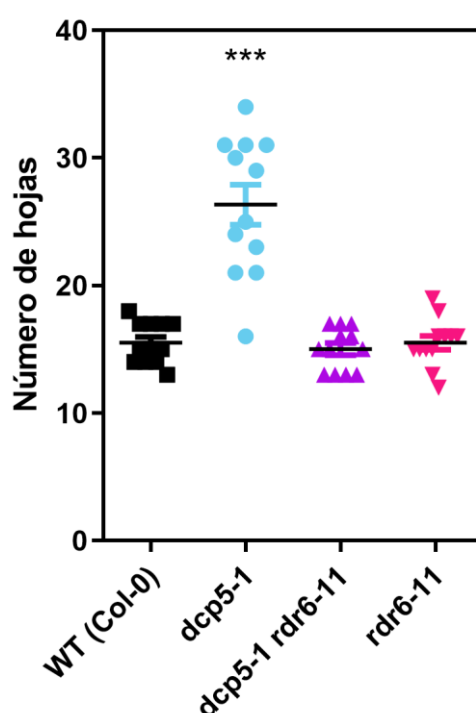


Figura 37. **Mutaciones en RDR6 rescatan el fenotipo de floración tardía de *dcp5*.** Tiempo de floración evaluado como el número de hojas de la roseta en el momento de la floración bajo condiciones de día largo. WT Col-0: tipo silvestre Columbia (cuadrados negros), *dcp5-1* (círculo cian), *rdr6-11 dcp5-1* (triángulo violeta), *rdr6-11* (triángulo hacia abajo rosa). Las barras de error representan el promedio con el desvío estándar. *** $p < 0,0001$ (prueba de ANOVA).

(del inglés, *trans-acting small interfering RNA*), cuya biogénesis depende de RDR6. Las muestras provenientes de la mutante *rdr6* presentan muchas menos lecturas que las muestras de plantas silvestres y la mutante *dcp5*, y los niveles de expresión son comparables a los reportados en trabajos previos (Tabla Suplementaria 3) (X. Zhang et al., 2015).

Reportes anteriores indican que solo una baja proporción de ARNm sirven de sustrato para generar rqc-siRNAs, y los motivos que convierten a un ARNm en la fuente de rqc-siRNAs aun no son del todo conocidos (Feng et al., 2024; Krzyszton & Kufel, 2022). Para definir potenciales *loci* que sean fuente de rqc-siRNAs se seleccionaron aquellos genes que codifican para proteínas con al menos 10 lecturas y donde la expresión en plantas silvestres similar o mayor que en la mutante *rdr6*. De los genes resultantes se conservaron aquellos cuya expresión de ARN pequeños fuera al menos 50% mayor en *dcp5* que en plantas silvestres. De esta manera detectamos 222 genes que potencialmente pueden generar rqc-siRNAs en la mutante *dcp5* (Figura 39 B). Los ARNm de 197 de estos genes (88.7%) se unen a DCP5, mientras que 77 (34.7%) están diferencialmente expresados, con una tendencia a que la expresión de los genes generadores de rqc-siRNAs aumente en la mutante *dcp5* (Figura 39 C y D). Un análisis de ontología génica mostró un enriquecimiento en las categorías ritmos circadianos, fotosíntesis y traducción (Figura 39 E).

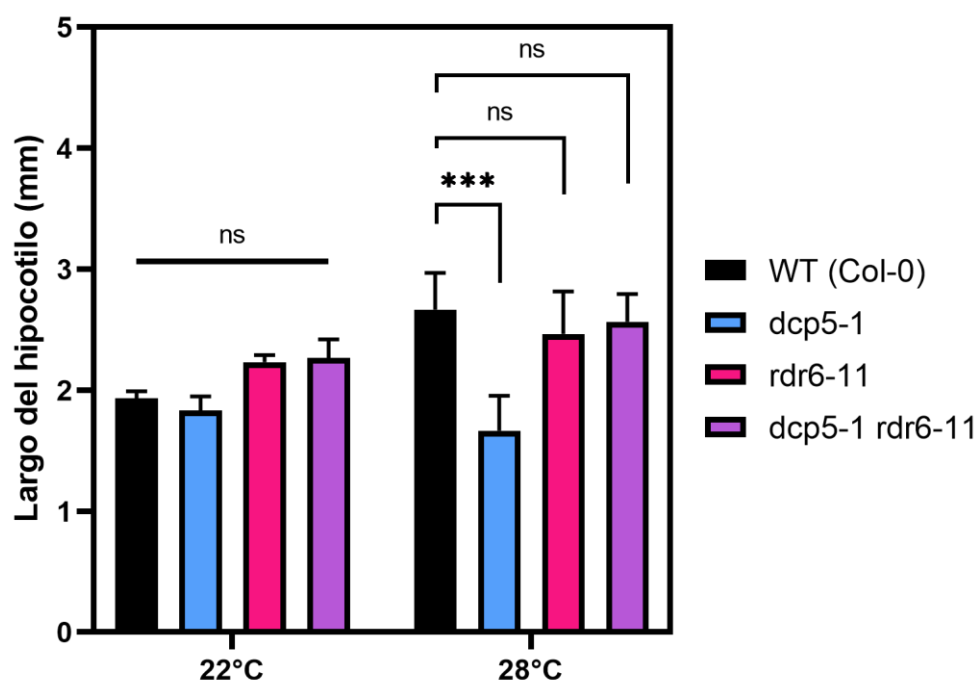


Figura 38. **Mutaciones en *RDR6* rescatan el fenotipo de termomorfogénesis de *dcp5*.** Largo del hipocótilo de plantas crecidas 2 días a 22 °C o 28 °C. Las barras de error representan el promedio con el desvío estándar. N.s: no significativo, *** $p < 0,0001$ (prueba de ANOVA).

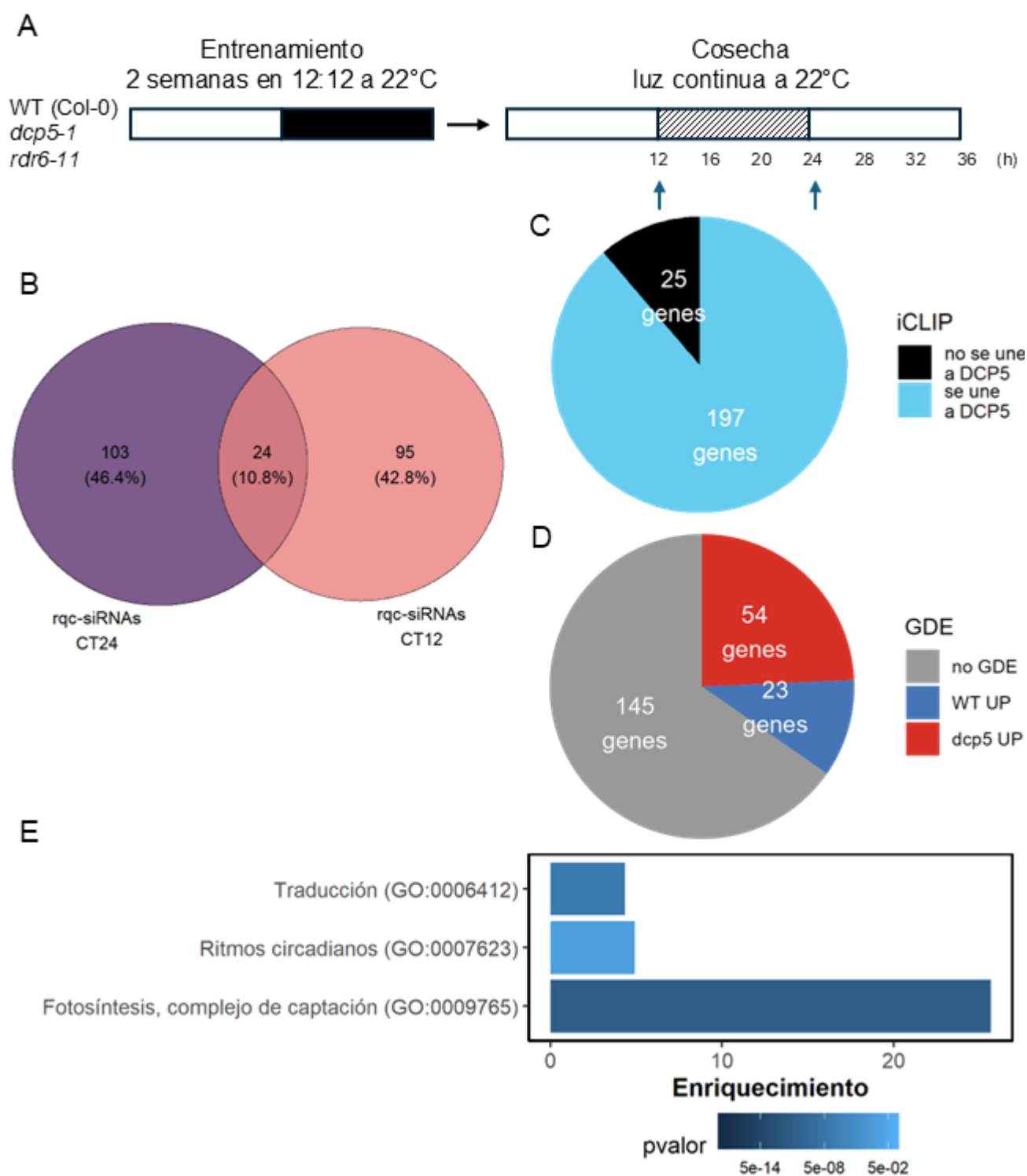


Figura 39. **Potenciales *rqc*-siRNAs generados por la ausencia de DCP5.** (A) Esquema del diseño experimental. Plantas silvestres y las mutantes *dcp5* y *rdr6* se crecieron por dos semanas en un fotoperiodo de 12:12 y luego fueron transferidas a luz continua. Las flechas indican los momentos de cosecha. Los bloques blancos, negros, y rayados representan día, noche y noche subjetiva, respectivamente. (B) Diagrama de Venn mostrando los potenciales *rqc*-siRNAs generados en cada momento del día en la mutante *dcp5*. (C-D) gráficos de torta mostrando (C) blancos de unión de DCP5 y (D) genes diferencialmente expresados entre los potenciales *rqc*-siRNAs. (E) Ontologías génicas destacadas entre los *rqc*-siRNAs generados en la mutante *dcp5*.

En conclusión, los fenotipos de la mutante *dcp5* son rescatados en la doble mutante *dcp5 rdr6*, lo que podría explicarse por la producción de ARNs pequeños de 21-22nt en *dcp5* a partir de ARNm endógenos. En este sentido, se hallaron 222 genes que podrían ser fuente de rqc-siRNAs. Aproximadamente un tercio de los ARNm “precursores” de los rqc-siRNAs presentan variación en sus niveles de expresión, y la gran mayoría son blancos de unión de DCP5. Serán necesarios otros estudios para buscar de manera exhaustiva posibles rqc-siRNAs y para ampliar nuestro conocimiento sobre sus mecanismos de acción y su relación con DCP5.

Discusión

Un modelo post-transcripcional del reloj

Las oscilaciones circadianas en los niveles de ARNm muestran una fina regulación entre sus fases crecientes y decrecientes. Este fenómeno difícilmente se explica exclusivamente desde un punto de vista transcripcional. A favor de esta idea, aquí se mostró mediante un metaanálisis de datos de estabilidad de ARNm que los transcriptos controlados por el reloj (TCR) presentan vidas medias más cortas en comparación con el resto del transcriptoma, y, más aún, que hay una correlación negativa entre vida medias y la amplitud relativa de la oscilación del transcripto. En esta misma línea, Gutierrez et al. (2002) hallaron que entre los 100 transcriptos más inestables de *Arabidopsis* había un enriquecimiento en genes controlados por el reloj y responsivos a auxinas. A pesar de la importancia del control de la estabilidad del ARNm en la configuración de las oscilaciones circadianas de la expresión génica, los mecanismos específicos involucrado en este proceso aún son en gran parte desconocidos (Beckwith & Yanovsky, 2014; Lück et al., 2014; Mateos et al., 2018; Romanowski & Yanovsky, 2015).

Una posibilidad es que la estabilidad de los transcriptos circadianos este dada por su composición de codones. Utilizando datos públicos de estabilidad de transcriptos, se calcularon el coeficiente de estabilización (CE) para los 61 codones codificantes. Aunque varios componentes del oscilador central están compuestos por codones no-óptimos, no se observó una tendencia generalizada entre los TCR de alta amplitud. En *Drosophila melanogaster*, *Nuerospora*, y la cianobacteria *Synechococcus elongate* se mostró que la composición múltiples genes del oscilador central también están enriquecidos en codones no-óptimos, y si se optimizan mediante ingeniería genética se ve una pérdida de la ritmicidad en las oscilaciones circadianas y del *fitness* (Fu et al., 2016; Y. Xu et al., 2013; M. Zhou et al., 2013). Una salvedad es que el método *in silico* aquí utilizado para calcular el CE es susceptible al ruido introducido por la presencia de otros elementos en *cis* que regulan la estabilidad de los ARNm. Para salvar esta limitación, en otros modelos donde existen técnicas para inyectar o incorporar ARN exógeno, se ha medido el CE sobre librerías inyectadas compuestas de distintas secuencias codificantes, pero con las mismas 5' y 3'UTR (Bazzini et al., 2016). También, los CE se calcularon a partir de datos de vida media provenientes de un experimento de inhibición de la transcripción con cordicepina. Esta técnica, aunque es popular y ampliamente utilizada, tiene efectos pleiotrópicos en los

organismos derivados de bloquear la transcripción (Q. Wu & Bazzini, 2024). Existen técnicas que no tienen estos efectos indeseados, como BRIC-seq, timelapse-seq, SLAM-seq, que se basan en la incorporación de nucleótidos marcados, pero presentan el desafío de adaptar su aplicación a *Arabidopsis* (Herzog et al., 2017; Imamachi et al., 2014; Schofield et al., 2018).

Una posible explicación de los resultados de *codon optimality* es que, si los TCR de alta amplitud están compuestos por codones poco óptimos, entonces la acumulación de los mensajeros sería costosa ya que a lo largo de todo el día se estaría favoreciendo la degradación de dichos transcriptos. Desde un punto de vista del diseño, sería más eficiente un mecanismo *on/off* que permita activar la degradación de ARNm selectivamente según el momento del día.

Hasta el momento, se ha reportado apenas un puñado de componentes de las vías de degradación que están involucrados en el control de los ritmos circadianos. En *Chlamydomonas* y *Neurospora* se mostró que EXORIBONUCLEASE 1 (XRN1) y la unidad catalítica del exosoma RAP44, respectivamente, son necesarias para el funcionamiento del reloj (Guo et al., 2009; Matsuo et al., 2008). También, ratones mutantes que no expresan IRON REGULATORY PROTEIN 2 (IRP2), una proteína que inhibe la traducción de ARNm específicos, muestran periodo largo de oscilaciones circadianas (Nadimpalli et al., 2024). En *Arabidopsis*, dos componentes del complejo *spliceosoma* U6 snRNPs, LSM4 y LSM5, afectan la función del reloj, regulando el *splicing* alternativo de un subconjunto de genes del reloj central (Perez-Santángelo et al., 2014). Dado que LSM4 y LSM5 no solo están involucrados en el procesamiento nuclear del ARN, sino que también modulan el *decapping* del ARNm en el citoplasma, parte del fenotipo circadiano podría deberse a los efectos de LSM4 y LSM5 en el *decapping* y la degradación del ARNm. Efectivamente, LSM1, que no está asociado con la maquinaria de *splicing* nuclear y que solo actúa en el complejo LSM1-LSM7 activador del *decapping* que modula la degradación del ARNm en el citoplasma, es necesario para el correcto funcionamiento del reloj circadiano (Careno et al., 2022). Además, XRN4, la única exorribonucleasa 5'-3' citoplasmática conocida en *Arabidopsis*, también es necesaria para el correcto funcionamiento del reloj biológico (Careno et al., 2022).

La degradación de ARNm y su traducción son dos procesos conectados de manera íntima y compleja (B. Roy & Jacobson, 2013), y, a su vez, la traducción es un proceso controlado en múltiples niveles por el reloj (Lyu et al., 2024; Mills et al., 2018). En la intersección entre traducción, degradación de ARNm y el reloj circadiano aparece *DCP5* como un actor clave. En esta tesis se mostró que una mutación hipomórfica en *DCP5* alarga el período de los ritmos circadianos en el movimiento de las hojas y la expresión génica, y retrasa la floración bajo condiciones de día largo. Los fenotipos circadianos son similares a los reportados anteriormente

en el mutante *lsm1a lsm1b* (Careno et al., 2022), lo que proporciona un fuerte apoyo a la idea de que la maquinaria de *decapping* controla la ritmicidad circadiana en Arabidopsis.

Los resultados de esta tesis indican que la regulación circadiana de los niveles de ARNm requiere la regulación tanto de la síntesis de ARNm como de su degradación, y proporcionan una fuerte evidencia de que la regulación que DCP5 realiza sobre los ARNm contribuye a refinar la función del reloj circadiano en Arabidopsis. Una posible explicación del atraso de la fase de expresión de transcritos circadianos en la mutante *dcp5* es que los transcritos no son llevados a degradación a tiempo, lo que provoca que tanto el transcripto como la proteína perduren más tiempo en concentraciones que inhiben al resto de los componentes del reloj. Es decir, en ausencia de DCP5, los genes de la mañana tardan más en decaer lo suficiente, tanto a nivel de ARNm como de proteína, por lo que la expresión de los genes de la tarde y noche esta reprimida mayor tiempo, y cuando se desreprimen a su vez tardan más en decaer, lo que atrasa el comienzo de la expresión de los genes de la mañana, y así sucesivamente. Los transcritos blancos de DCP5 no se acumulan indefinidamente probablemente debido a que existe degradación de ARN 5'-3' por fuera de los *p bodies*, y a que la vía de degradación de ARN 3'-5' amortigua los defectos en la otra vía, aunque lo suficientemente ineficiente para que la mutante tenga un fenotipo. Este mecanismo explicaría el periodo largo tanto de *dcp5*, como de otras mutantes de la vía de degradación de ARN como *xrn4*, *lsm1*, *lsm4* y *lsm5* (Careno et al., 2022; Perez-Santángelo et al., 2014).

Congruente con este modelo, recientemente se mostró que el factor de iniciación de la traducción eIF4E es necesario para el proceso de floración y para mantener el periodo del reloj biológico (J. Zhang et al., 2024). eIF4E se une al *cap* en el extremo 5', protegiendo al ARNm del *decapping* (Schwartz & Parker, 2000). La mutante *elf4e* tiene un periodo de reloj corto, lo que se puede explicar con una lógica similar a la de arriba: en la mutante los transcritos son más inestables, por lo que la expresión de los genes de la mañana decae antes que en plantas silvestres, por lo que los genes de la tarde y noche se desreprimen antes, lo que hace a su vez que se adelante la expresión de los genes de la mañana. También es posible pensar a las mutantes de expresión nula como análogo al caso extremo de inestabilidad, y en este caso la mayor cantidad de mutantes de componentes del oscilador central muestran periodo corto de oscilaciones circadianas (Nohales & Kay, 2016). A nivel post traduccional podría ocurrir algo similar. Aumentar la estabilidad de las proteínas TOC1 y PRR5, por vías genéticas o farmacológicas, alarga el periodo de oscilaciones circadiano (Más et al., 2003; Uehara et al., 2019).

Además de la regulación a nivel transcripcional, DCP5 regula el traductoma. Se ha reportado que luego de la germinación, las plantas que crecen en la oscuridad muestran una gran fracción del transcriptoma en un estado de represión traduccional, que se revierte cuando las plantas son transferidas a luz (G. J. Jang et al., 2019). En la mutante *dcp5*, la represión traduccional en la oscuridad es mucho más moderada, y entre los ARNm diferencialmente traducidos entre plantas silvestres y la mutante *dcp5* hay algunos pertenecientes al oscilador central como *PRR5*, *PRR7* y *RVE8* (G. J. Jang et al., 2019). Sería interesante evaluar si el efecto de DCP5 en el traductoma y proteoma que oscila circadianamente también es tan significativo. Estudios proteómicos en *Arabidopsis* muestran que alrededor de la mitad de las proteínas cuyos niveles oscilan circadianamente provienen de transcriptos que no oscilan (Choudhary et al., 2016; Krahmer et al., 2022). Cabe remarcar aquí que estos estudios son capaces de detectar una fracción muy pequeña del proteoma (~1000 proteínas). Contrariamente a estos resultados, se reportó que prácticamente todos los transcriptos que oscilan circadianamente a nivel de ARN también lo hacen a nivel de traducción (Bonnot & Nagel, 2021). Por esto, son necesarios estudios con mayor precisión para poder sacar conclusiones definitivas y definir el rol de DCP5.

Degradación y reprogramación del transcriptoma

No parece ser casualidad que tanto DCP5 como XRN4 y LSM1 sean necesarias para el funcionamiento del reloj biológico, ya que todas ellas suelen estar involucradas en procesos similares. Al igual que *dcp5*, la mutante *lsm7* no elonga su hipocótilo cuando es crecida a temperaturas cálidas y presenta niveles bajos de *PIF4* y genes *SAUR* (Nardeli et al., 2023). Tanto *dcp5* como *lsm1* son hipersensibles al estrés osmótico (Perea-Resa et al., 2015; J. Xu & Chua, 2012). También, las mutantes *dcp5*, *lsm1* y *xrn4* son hipersensibles a tratamientos con ácido abscísico (ABA) (Wawer et al., 2018). Congruentemente, en los datos de esta tesis se encontraron varios genes de la vía del ABA alterados en *dcp5*, tanto a 22 °C como a 28 °C (datos no mostrados). Las mutantes *dcp5*, *lsm1* y *xrn4* son más resistentes a infecciones virales, sin embargo, a nivel molecular *xrn4* se comporta de manera distinta a *dcp5* y *lsm1* (Hoffmann et al., 2022). La mutante *xrn4* sobrevive menos a estrés por altas temperaturas que plantas silvestres (Merret et al., 2013), y datos preliminares muestran que *dcp5* también es más susceptible (datos no mostrados). DCP1 y DCP5 también son necesarias para sobrevivir a tratamientos severos y rápidos de deshidratación (J. Xu & Chua, 2012).

También parece haber una tendencia a que la mutante *xrn4* muestre fenotipos menos marcados que las mutantes *dcp5* y *lsm1*, lo que sugiere un rol jerárquico de DCP5 y LSM1 en el metabolismo de ARN. Es posible que ante la necesidad de degradar un determinado conjunto de ARNs —ya sea por estímulos externos (como temperatura o cambios en la osmolaridad) o internas (reloj biológico)—, DCP5 y LSM1 sean capaces de detener la traducción de un subconjunto de ARNm, incluso en ausencia de XRN4. En cambio, en las mutantes *dcp5* y *lsm1*, XRN4 no solo es incapaz de detener la traducción de esos ARNs, sino que además los degrada con menor eficiencia debido a que DCP5 no los secuestra en los *p bodies*.

Los resultados del ensayo de iCLIP mostraron que, si bien casi el 60% de los genes con alteraciones en sus niveles de expresión en la mutante se unen a DCP5, un alto porcentaje de transcritos blancos de DCP5 no muestran alteraciones en su expresión. Una posibilidad que explica que haya 7024 ARN blancos de DCP5 que no muestren cambios de expresión en la mutante *dcp5* es que DCP5 este unido a esos transcritos constitutivamente y que solamente frente a algún estímulo apropiado se unan otros factores promoviendo el efecto de DCP5. Estos procesos de respuesta a estímulos ambientales probablemente requieren cambios rápidos en la identidad del transcriptoma (Crisp et al., 2016). En líneas generales se puede esperar que los procesos que requieren degradar de manera rápida y controlada ciertos ARN, están impedidos en plantas mutantes de la maquinaria de degradación de ARN.

El rol de DCP5 en la termomorfogénesis

Los resultados de esta tesis muestran que DCP5 es un regulador clave de la respuesta a temperaturas cálidas. Mostramos que componentes de todos los pasos de la vía de auxinas tienen niveles de expresión menores en la mutante *dcp5*. Esto es llamativo por varios motivos. Por un lado, la intuición indica que, en una planta mutante de componentes de la vía de degradación de ARN, como *dcp5*, los transcritos se deberían acumular. Por otro lado, se ha reportado que aumentos en la temperatura producen aumentos en la tasa de transcripción que son cancelados por aumentos en la tasa de degradación de ARN, y que los cambios en la abundancia de los transcritos de aquellos genes que responden a cambios de temperatura ambiental se deben principalmente a que la tasa de degradación no varía mientras que la tasa de transcripción aumenta (Sidaway-Lee et al., 2014). Esto supone que, en una planta mutante de la vía de degradación de ARN, los niveles de ARN de genes responsivos deberían ser más altos que

en plantas silvestres frente a un aumento en la temperatura. Sin embargo, esto no se observa en *dcp5*.

La vía de auxinas se compone de múltiples pasos desde su síntesis, pasando por su transporte, metabolismo y percepción, hasta que termina ejerciendo su acción final en el crecimiento celular. Múltiples genes involucrados en todos estos pasos modifican su expresión según la temperatura ambiente, lo que provoca un aumento en la concentración de auxinas (Casal & Balasubramanian, 2019; Nemhauser et al., 2004; Paponov et al., 2008). Aquí se corroboró que al exponer las plantas silvestres a 28 °C se registra un aumento generalizado de los niveles de ARNm asociados a componentes de la vía de auxinas. Sin embargo, en plantas mutantes *dcp5* no se observó tal inducción. Esto es similar a lo observado en la mutante para el gen maestro de la termomorfogénesis, *PIF4*, la cual, al igual que *dcp5*, no elonga su hipocótilo cuando es expuesta a 28 °C (Franklin et al., 2011). En la mutante *pif4* los niveles endógenos de auxinas no aumentan cuando la planta se expone a 28 °C, lo que sugiere que *dcp5* también podría presentar niveles de auxinas menores que plantas silvestres. El fenotipo de termomorfogénesis de *pif4* se revierte si se suministran auxinas exógenas o si se sobre-expresan genes río abajo de *PIF4*, como *SAUR19* (Franklin et al., 2011). Sería interesante medir la concentración de auxinas en *dcp5* y evaluar si su agregado exógeno revierte el fenotipo de termomorfogénesis para entender mejor el funcionamiento de la vía y su modulación por DCP5.

La expresión y actividad de *PIF4* es finamente controlada por varios componentes del oscilador central, acotando la ventana temporal donde *PIF4* es capaz de actuar (Li et al., 2024; Nusinow et al., 2011; Q. Sun et al., 2019; J. Y. Zhu et al., 2016). Esto probablemente sea la causa de que los niveles de auxinas oscilen circadianamente con un pico de concentración máxima alrededor de CT12 (Jouve et al., 1999). En la mutante *dcp5* posiblemente se combinen los efectos del desfase en las oscilaciones de auxinas, que a su vez alteraría los patrones de expresión de los genes responsivos a auxinas, sumado a los defectos en la degradación de ARN de los genes blanco de DCP5. Todo esto en conjunto crea desbarajustes en la red de señalización de auxinas, lo que explicaría el fenotipo severo de termomorfogénesis de la mutante *dcp5*.

El hipocótilo de plantas *dcp5* es ligeramente más corto que el de plantas silvestres también a 22 °C. Esto fue previamente reportado por Jang et al. (2019), quienes afirman que en plántulas silvestres cultivadas en oscuridad DCP5 secuestra en *p bodies* ARNm involucrados en la fotomorfogénesis deteniendo su traducción, y que, al transferir las plántulas a luz, los *p bodies* se desensamblan permitiendo la traducción de dichos ARNm y, consecuentemente, la detiolación. Llamativamente, a 22 °C las diferencias en el largo del hipocótilo entre plantas

silvestres y *dcp5* en la oscuridad es prácticamente nula, lo que indica que en estas condiciones la vía de auxinas probablemente funcione correctamente en la mutante.

Los resultados aquí exhibidos muestran como DCP5 regula la fisiología de Arabidopsis. Cabe preguntarse cómo se regula la actividad de DCP5 para influir sobre un distinto conjunto de ARNs frente a distintos estímulos ambientales.

¿Quién regula a DCP5?

Los niveles de DCP5 prácticamente no se modifican a lo largo del día ni frente a diversas condiciones ambientales. Una posibilidad es que la actividad de DCP5 sea constante en todas las condiciones. Sin embargo, existen indicios en la bibliografía que sugieren que su actividad es regulada por otros factores.

DCP5 y todos sus homólogos constan de tres dominios bien conservados. Por un lado, los dominios Lsm y FDF, necesarios para el funcionamiento básico de la proteína, y por otro un dominio RGG que regulan la actividad (Tang et al., 2020). La metilación de la arginina del motivo RGG en el extremo C-terminal es un posible mecanismo de regulación. La metilación es un proceso molecular clave para el funcionamiento del reloj biológico (Fustin et al., 2020). En Arabidopsis, la metilación tanto de ADN, ARN, histonas y proteínas del *spliceosoma* son necesarias para mantener los ritmos circadianos (Malapeira et al., 2012; Sánchez et al., 2010; Tian et al., 2021; X. Wang et al., 2021). El homólogo en levaduras de DCP5, Scd6, es metilado por Protein Arginine Methyltransferase 1 (PRMT1) modulando su capacidad de reprimir la traducción (Poornima et al., 2016). Ensayos utilizando el sistema de doble híbrido a escala genómica y de inmunoprecipitación seguidos de espectroscopía de masa mostraron que DCP5 interactúa con PRMT11, el homólogo de PRMT1 de levaduras (Chicois et al., 2018; Dreze et al., 2011). A su vez, la mutante de expresión nula *prmt11* muestra una arquitectura y un fenotipo de floración tardía comparables a los de *dcp5* (Scebba et al., 2007). Sería interesante evaluar si DCP5 es metilada, y, en tal caso, si es por la acción de PRMT11 y si su metilación varía a lo largo del día o frente a ciertas condiciones ambientales —como cambios en la temperatura— con un impacto en la fisiología de Arabidopsis.

Otros miembros del interactoma de DCP5 también podrían estar regulándola. La actividad represora de la traducción y la localización celular del homólogo en levaduras de DCP5, Scd6, es regulada por múltiples proteínas (Togra et al., 2024). Una de ellas es *Triose Phosphate*

Dehydrogenase 3 (Tdh3), que promueve la metilación de Scd6. La metilación en el motivo RGG de Scd6 favorece la interacción con el factor de inicio de la traducción eIF4G, lo que aumenta la represión traduccional (Poornima et al., 2016). El homólogo en *Arabidopsis* de Tdh3, GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C2 (GAPC2) regula el metaboloma, transcriptoma y traductoma específicamente en la transición entre el día y la noche, lo que sigue un rol en la regulación de los *outputs* del reloj circadiano (Wegener et al., 2024). Además, los niveles del transcripto de GAPC2 oscilan circadianamente, lo que podría aportar una capa de regulación circadiana a la actividad de DCP5 (Romanowski et al., 2020). En *Arabidopsis*, una capa de regulación de DCP5 involucra la interacción con la proteína del complejo de *decapping* DCP1, preferencialmente cuando DCP1 fue previamente fosforilada por MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 6 (MPK6) (J. Xu & Chua, 2012). En levaduras, el complejo de deadenilación CCR4-NOT inhibe la actividad de Scd6 (Zeidan et al., 2018). En *Arabidopsis*, se mostró que DCP5 interacciona con el componente CCR4f y con la proteína de unión al ARN PUMILLO 2 (PUM2), un factor asociado a dicho complejo (Arae et al., 2019; Chicois et al., 2018). El complejo CCR4-NOT posiblemente este bajo control circadiano ya que los transcriptos de los componentes NOT9A y NOT9C son TCR de alta amplitud (Romanowski et al., 2020). Por su parte, el tercer ortólogo, NOT9B oscila en menor medida, pero su actividad es regulada por el fitocromo A (Schwenk et al., 2021).

De los 368 interreactores de DCP5 reportados por Chicois et al. (2018), 205 oscilan circadianamente y de estos, 116 son proteínas de unión al ARN. Estas proteínas podrían estar regulando la actividad circadiana de DCP5. Un ejemplo son las POLY(A) BINDING PROTEINS (PAB), las cuales, como su nombre lo indica, son una familia de proteínas que se unen a las colas de poli(A) de los ARNm regulando su estabilidad. El genoma de *Arabidopsis* codifica ocho PABs, de las cuales DCP5 co-purifica con PAB2, PAB3, PAB4, PAB5 y PAB8. Además, los niveles de expresión de PAB4, PAB6 y PAB8 son controlados por el reloj biológico, mientras que todas oscilan diurnamente, es decir, en los ciclos diarios de luz y oscuridad (Mockler et al., 2007). Recientemente se mostró que DCP5 co-localiza con las PABs en condensados citoplasmáticos (Z. Wang et al., 2024). Llamativamente, en ausencia de las PABs, DCP5 es capaz de formar condensados citoplasmáticos, pero no reclutar ARNm eficientemente (Z. Wang et al., 2024). La actividad de DCP5 podría ser modulada por las PABs frente a distintos estímulos internos, como el reloj biológico, y externos, como la temperatura ambiente, a fin de reprimir la traducción de un subconjunto específico de transcriptos.

El complejo citoplasmático LSM1-7 estimula el *decapping* del ARNm en los *p bodies*, luego de que la traducción fue reprimida por DCP5 (Perea-Resa et al., 2012). El gen *LSM1b* mostró regulación circadiana de sus niveles de ARNm en el conjunto de datos diurnos (Mockler et al., 2007). En células humanas, el perfil de ribosomas reveló que la proteína LSM1 se traduce rítmicamente y que la formación de *p bodies* en el citoplasma también es rítmica en estas células (C. Jang et al., 2015). Así, el complejo LSM1-7 y otros factores que promueven la formación de *p bodies* podría estar contribuyendo a la ritmicidad del proceso de represión traduccional y degradación del ARNm iniciado por DCP5.

Recientemente se descubrió que DCP5 funciona como un osmosensor, que ante aumentos súbitos de la osmolaridad extracelular responde formando condensados citoplasmáticos de proteínas y ARNm que llevan a una reprogramación del transcriptoma y traductoma (Z. Wang et al., 2024). También, la formación de *p bodies* es inducida por señales ambientales como la temperatura y la oscuridad. Sería interesante evaluar si la formación de *p bodies* mediada por DCP5 se ve afectada por la temperatura ambiente, y, en tal caso, cual es el efecto en la termomorfogénesis.

Otra posibilidad es que la regulación no sea a nivel de la actividad de DCP5, sino que este dada por modificaciones en la secuencia de sus ARN blanco. La poliadenilación alternativa (PAA) crea distintas isoformas de un dado gen que pueden variar en su secuencia codificante, pero que principalmente modifican su 3'UTR. Es posible que distintos estímulos provoquen cambios en la abundancia relativa de distintas isoformas generadas por eventos de PAA, lo que termine repercutiendo en la presencia o ausencia de los sitios de unión de DCP5 y, en última instancia, en la eficiencia de traducción de esa isoforma. En *Arabidopsis*, al menos 70% de los genes tienen distintas isoformas generadas por PAA y la luz regula la PAA en el ~30% del transcriptoma (Kubaczka et al., 2024; S. Zhu et al., 2020). También se reportó que 3765 genes poseen dos o más isoformas generadas por PAA que oscilan en distintas fases bajo un fotoperiodo de 12h de luz – 12h de oscuridad, y que al menos 597 genes tienen eventos de PAA que oscilan circadianamente (Hou et al., 2021; Yang et al., 2020). También se reportó que mutantes de ciertos factores de corte y poliadenilación muestran defectos en sus oscilaciones circadianas de ARN (Lin et al., 2021; Xing et al., 2013). La funcionalidad y relevancia biológica de las distintas isoformas producidas por PAA no han sido extensamente investigadas. Además, los niveles de auxinas regulan la elección de los sitios de corte y poliadenilación, lo que podría tener algún vínculo con el fenotipo de termomorfogénesis defectuosa de *dcp5* (Hong et al., 2018). Este fenómeno podría traer una capa de regulación extra al rol de DCP5, dado que se une preferentemente a las 3'UTR.

La bibliografía sugiere múltiples mecanismos por los cuales DCP5, y, en última instancia, los ritmos circadianos podrían ser regulados. Será necesario probar las distintas hipótesis con los experimentos adecuados para completar nuestra comprensión de los mecanismos asociados.

La interacción entre DCP5 y la vía de PTGS

Los fenotipos alterados que presentan varias mutantes de genes de la vía de degradación de ARN son revertidos al incorporar mutaciones adicionales en componentes de la vía de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) (Liu & Chen, 2016). Aquí se mostró que los fenotipos de reloj circadiano de periodo largo, floración tardía y elongación del hipocótilo en temperaturas cálidas presentes en *dcp5* se revierten en *dcp5 rdr6*, y se detectaron 222 posibles *loci* generadores de rqc-siRNAs, números comparables a los observados en la mutante *lsm1* (Krzyszton & Kufel, 2022). En plantas silvestres también se detectaron, aunque en menor medida, ARNs pequeños, pero, dado la ausencia de fenotipos en la mutante *rdr6*, los rqc-siRNAs generados en bajo nivel en plantas silvestres no parecen tener un rol relevante en el funcionamiento del reloj biológico, o en los procesos de floración y termomorfogénesis.

Los primeros reportes de rqc-siRNAs datan de hace poco más de diez años y su mecanismo de acción aún no es claro. Hay ejemplos donde el aumento en la producción de rqc-siRNAs correlaciona con una disminución en los niveles de expresión del ARNm original presumiblemente debido a cortes endonucleolíticos mediados por ARGONAUTE 1 (AGO1) (Liu & Chen, 2016). Este es el caso del ARNm de *CER3* cuando se mutan componentes del exosoma (Lange et al., 2019). Sin embargo, otros estudios analizaron el efecto de los rqc-siRNAs en el transcriptoma y observaron que solo una baja proporción de los ARNm productores de rqc-siRNAs mostraban niveles de expresión menores en las plantas mutantes de componentes de la maquinaria de degradación que en las plantas silvestres (Feng et al., 2024; H. Wu et al., 2020). Es posible que la acción de los rqc-siRNAs ocurra a nivel de la transcripción y traducción. Se ha mostrado que los rqc-siRNAs provocan una reducción global en la eficiencia traduccional (H. Wu et al., 2020). También es posible que el aumento de la producción de rqc-siRNA compita con la producción de otro tipo de ARN pequeños involucrados en el silenciamiento génico a nivel del genoma mediado por la metilación, provocando en última instancia una disminución de la metilación del genoma y el aumento de expresión de ciertos *loci* (Feng et al., 2024; Sidorenko et al., 2017). Esto podría estar relacionado con el aumento de la tasa de transcripción reportado en el locus del inhibidor de la floración *FLC* en la mutante *dcp5* (W. Wang et al., 2023). En vista de

toda la evidencia, es probable que los rqc-siRNAs alteren la expresión génica tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional y traduccional a través de distintos mecanismos. Para traer más claridad sería interesante estudiar el traductoma de la mutante *dcp5* y ver si los rqc-siRNAs aquí detectados tienen algún efecto en él.

El futuro del reloj biológico

Actualmente atravesamos una revolución tecnológica impulsada por la automatización y la ciencia de datos, que está permitiendo expandir el conocimiento sobre la fisiología molecular de manera acelerada (Cizauskas et al., 2025). Por ejemplo, una técnica que surgió en los últimos años es la secuenciación de células individuales (scRNA-seq, del inglés, single cell RNA-seq) que permite medir los niveles de expresión del transcriptoma en cada una de las células de una muestra (Shaw et al., 2021). Uno de los interrogantes que esta técnica puede responder es cuanto de los resultados de experimentos de transcriptómica son en realidad el promedio de una población celular heterogénea. Aunque el uso de scRNA-seq en *Arabidopsis* es aún insipiente, hay trabajos que sugieren que existe un balance entre la autonomía y sincronización de las oscilaciones circadianas a nivel de célula y tejido relacionado con las funciones de cada tipo celular (Mortada et al., 2024; Qin et al., 2023, 2025; Torii et al., 2022; Vong et al., 2024). Otros avances tecnológicos recientes y con creciente popularidad incluyen la secuenciación de transcriptos completos, la identificación de niveles de metilación a nivel de genoma y transcriptoma, la cuantificación de cada vez más proteínas mediante técnica de proteómica. El desafío en los próximos años de la cronobiología abordada desde la biología molecular será integrar esta cantidad de datos enorme y creciente provenientes de múltiples plataformas sin perder de vista la variable temporal, con el fin de lograr un entendimiento más completo posible del funcionamiento molecular de los relojes en los organismos.

Conclusiones

Aquí mostramos que DCP5 regula los ritmos circadianos en *Arabidopsis*. La mutante *dcp5* presenta ritmos de movimiento de hojas y expresión de genes del reloj circadiano con un período más largo que el de plantas silvestres. Mediante la técnica de iCLIP se identificó que DCP5 se une a aproximadamente un tercio del transcriptoma, y que entre sus ARN blancos hay una sobre representación de ARN que oscilan circadianamente con alta amplitud. Se estudiaron las oscilaciones circadianas en los niveles de expresión génica, y en la mutante *dcp5* se observó a nivel global un atraso en los picos de expresión máxima, consistentes con un alargamiento del periodo de los ritmos circadianos.

También, se mostró que la mutante *dcp5* presenta una respuesta deficiente a aumentos en la temperatura ambiente. Se secuenció ARN proveniente de plantas silvestres y mutantes *dcp5* de plantas tratadas con pulsos de 28 °C en distintos momentos del día y se observó una reducción en la cantidad de genes que responden a la temperatura en la mutante *dcp5*. Entre estos genes se identificaron componentes de toda la vía de auxinas, lo que podría explicar la falta de respuesta de la mutante *dcp5* a temperaturas cálidas.

Por último, se mostró que los fenotipos alterados asociados al reloj biológico y a la termomorfogénesis de la mutante *dcp5* se recuperan en la doble mutante *dcp5 rdr6* sugiriendo que DCP5 evita la entrada de ARNm endógenos a la vía de silenciamiento post-transcripcional. Todos los resultados apoyan el rol clave de DCP5 en la regulación de la estabilidad de ARNm y particularmente para la regulación fina de las oscilaciones circadianas.

Bibliografía

- Alabadí, D., Oyama, T., Yanovsky, M. J., Harmon, F. G., Más, P., & Kay, S. A. (2001). Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5531), 880–883. <https://doi.org/10.1126/science.1061320>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Andrés, F., & Coupland, G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics*, 13(9), 627–639. <https://doi.org/10.1038/nrg3291>
- Arae, T., Morita, K., Imahori, R., Suzuki, Y., Yasuda, S., Sato, T., Yamaguchi, J., & Chiba, Y. (2019). Identification of Arabidopsis CCR4-NOT Complexes with Pumilio RNA-Binding Proteins, APUM5 and APUM2. *Plant and Cell Physiology*, 60(9), 2015–2025. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz089>
- Arsovski, A. A., Galstyan, A., Guseman, J. M., & Nemhauser, J. L. (2012). Photomorphogenesis. *The Arabidopsis Book*, 10, e0147. <https://doi.org/10.1199/tab.0147>
- Arsuffi, G., & Braybrook, S. A. (2018). Acid growth: An ongoing trip. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 69, Issue 2, pp. 137–146). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx390>
- Barak, S., Tobin, E. M., Green, R. M., Andronis, C., & Sugano, S. (2000). All in good time: the Arabidopsis circadian clock. *Trends in Plant Science*, 5(12), 517–522. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01785-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01785-4)
- Basbous-Serhal, I., Pateyron, S., Cochet, F., Leymarie, J., & Bailly, C. (2017). 5' to 3' mRNA Decay Contributes to the Regulation of Arabidopsis Seed Germination by Dormancy. *Plant Physiology*, 173(3), 1709–1723. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01933>
- Bazzini, A. A., del Viso, F., Moreno-Mateos, M. A., Johnstone, T. G., Vejnar, C. E., Qin, Y., Yao, J., Khokha, M. K., & Giraldez, A. J. (2016). Codon identity regulates <sc>mRNA</sc> stability and translation efficiency during the maternal-to-zygotic transition. *The EMBO Journal*, 35(19), 2087–2103. <https://doi.org/10.15252/embj.201694699>
- Beckwith, E. J., & Yanovsky, M. J. (2014). Circadian regulation of gene expression: at the crossroads of transcriptional and post-transcriptional regulatory networks. *Current Opinion in Genetics & Development*, 27, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2014.03.007>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57(1), 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Blake, L. A., Watkins, L., Liu, Y., Inoue, T., & Wu, B. (2024). A rapid inducible RNA decay system reveals fast mRNA decay in P-bodies. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46943-z>

- Bonnot, T., Gillard, M. B., & Nagel, D. H. (2022). CAST-R: An application to visualize circadian and heat stress-responsive genes in plants. *Plant Physiology*, 190(2), 994–1004. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac121>
- Bonnot, T., & Nagel, D. H. (2021). Time of the day prioritizes the pool of translating mRNAs in response to heat stress. *The Plant Cell*, 33(7), 2164–2182. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab113>
- Box, M. S., Huang, B. E., Domijan, M., Jaeger, K. E., Khattak, A. K., Yoo, S. J., Sedivy, E. L., Jones, D. M., Hearn, T. J., Webb, A. A. R., Grant, A., Locke, J. C. W., & Wigge, P. A. (2015). ELF3 controls thermoresponsive growth in Arabidopsis. *Current Biology*, 25(2), 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.076>
- Brandmann, T., Fakim, H., Padamsi, Z., Youn, J., Gingras, A., Fabian, M. R., & Jinek, M. (2018). Molecular architecture of LSM 14 interactions involved in the assembly of mRNA silencing complexes. *The EMBO Journal*, 37(7), 1–16. <https://doi.org/10.15252/emboj.201797869>
- Burko, Y., Willige, B. C., Seluzicki, A., Novák, O., Ljung, K., & Chory, J. (2022). PIF7 is a master regulator of thermomorphogenesis in shade. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32585-6>
- Burow, D. A., Martin, S., Quail, J. F., Alhusaini, N., Coller, J., & Cleary, M. D. (2018). Attenuated Codon Optimality Contributes to Neural-Specific mRNA Decay in Drosophila. *Cell Reports*, 24(7), 1704–1712. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.039>
- Busch, A., Brüggemann, M., Ebersberger, S., & Zarnack, K. (2020). iCLIP data analysis: A complete pipeline from sequencing reads to RBP binding sites. *Methods*, 178(July 2019), 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.11.008>
- Buschauer, R., Matsuo, Y., Sugiyama, T., Chen, Y.-H., Alhusaini, N., Sweet, T., Ikeuchi, K., Cheng, J., Matsuki, Y., Nobuta, R., Gilmozzi, A., Berninghausen, O., Tesina, P., Becker, T., Coller, J., Inada, T., & Beckmann, R. (2020). The Ccr4-Not complex monitors the translating ribosome for codon optimality. *Science*, 368(6488). <https://doi.org/10.1126/science.aay6912>
- Careno, D. A., Assaf, C. H., Eggermont, E. D. C., Canelo, M., Cerdán, P. D., & Yanovsky, M. J. (2023). Role of Phytochromes in Red Light-Regulated Alternative Splicing in Arabidopsis thaliana: Impactful but Not Indispensable. *Cells*, 12(20), 2447. <https://doi.org/10.3390/cells12202447>
- Careno, D. A., Perez Santangelo, S., Macknight, R. C., & Yanovsky, M. J. (2022). The 5'-3' mRNA Decay Pathway Modulates the Plant Circadian Network in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 63(11), 1709–1719. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac126>
- Casal, J. J., & Balasubramanian, S. (2019). Thermomorphogenesis. *Annual Review of Plant Biology*, 70(1), 321–346. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095919>
- Casal, J. J., Murcia, G., & Bianchimano, L. (2025). Plant Thermosensors. *Annual Review of Genetics* Downloaded from www.annualreviews.org. Guest, 23, 39. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-111523>

- Casanova-Sáez, R., Mateo-Bonmatí, E., & Ljung, K. (2021). Auxin Metabolism in Plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(3), a039867. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a039867>
- Castillejo, C., & Pelaz, S. (2008). The Balance between CONSTANS and TEMPRANILLO Activities Determines FT Expression to Trigger Flowering. *Current Biology*, 18(17), 1338–1343. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.075>
- Chantarachot, T., Sorenson, R. S., Hummel, M., Ke, H., Kettenburg, A. T., Chen, D., Aiyetiwa, K., Dehesh, K., Eulgem, T., Sieburth, L. E., & Bailey-Serres, J. (2020). DHH1/DDX6-like RNA helicases maintain ephemeral half-lives of stress-response mRNAs. *Nature Plants*, 6(6), 675–685. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0681-8>
- Chen, M., Chory, J., & Fankhauser, C. (2004). Light signal transduction in higher plants. In *Annual Review of Genetics* (Vol. 38, pp. 87–117). <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092259>
- Chicois, C., Scheer, H., Garcia, S., Zuber, H., Mutterer, J., Chicher, J., Hammann, P., Gagliardi, D., & Garcia, D. (2018). The UPF1 interactome reveals interaction networks between RNA degradation and translation repression factors in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 96(1), 119–132. <https://doi.org/10.1111/tpj.14022>
- Choudhary, M. K., Nomura, Y., Shi, H., Nakagami, H., & Somers, D. E. (2016). Circadian profiling of the Arabidopsis proteome using 2D-DIGE. *Frontiers in Plant Science*, 7(JULY2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01007>
- Chow, B. Y., Helfer, A., Nusinow, D. A., & Kay, S. A. (2012). ELF3 recruitment to the PRR9 promoter requires other Evening Complex members in the Arabidopsis circadian clock. *Plant Signaling & Behavior*, 7(2), 170–173. <https://doi.org/10.4161/psb.18766>
- Chung, B. Y. W., Balcerowicz, M., Di Antonio, M., Jaeger, K. E., Geng, F., Franaszek, K., Marriott, P., Brierley, I., Firth, A. E., & Wigge, P. A. (2020). An RNA thermoswitch regulates daytime growth in Arabidopsis. *Nature Plants*, 6(5), 522–532. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0633-3>
- Cizauskas, C., DeBenedictis, E., & Kelly, P. (2025). How the past is shaping the future of life science: The influence of automation and AI on biology. *New Biotechnology*, 88, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2025.03.004>
- Cosgrove, D. J. (2025). Plant Cell Wall Loosening by Expansins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111822>
- Courel, M., Clément, Y., Bossevain, C., Foretek, D., Vidal Cruchez, O., Yi, Z., Bénard, M., Benassy, M.-N., Kress, M., Vindry, C., Ernoult-Lange, M., Antoniewski, C., Morillon, A., Brest, P., Hubstenberger, A., Roest Crollius, H., Standart, N., & Weil, D. (2019). GC content shapes mRNA storage and decay in human cells. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.49708>
- Covington, M. F., & Harmer, S. L. (2007). The circadian clock regulates auxin signaling and responses in Arabidopsis. *PLoS Biology*, 5(8), 1773–1784. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050222>

- Crawford, A. J., McLachlan, D. H., Hetherington, A. M., & Franklin, K. A. (2012). High temperature exposure increases plant cooling capacity. *Current Biology*, 22(10), R396–R397. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.044>
- Crisp, P. A., Ganguly, D., Eichten, S. R., Borevitz, J. O., & Pogson, B. J. (2016). Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. In *Science Advances* (Vol. 2, Issue 2). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501340>
- De Alba, A. E. M., Moreno, A. B., Gabriel, M., Mallory, A. C., Christ, A., Bounon, R., Balzergue, S., Aubourg, S., Gautheret, D., Crespi, M. D., Vaucheret, H., & Maizel, A. (2015). In plants, decapping prevents RDR6-dependent production of small interfering RNAs from endogenous mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 43(5), 2902–2913. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv119>
- de Leone, M. J., Hernando, C. E., Romanowski, A., Careno, D. A., Soverna, A. F., Sun, H., Bologna, N. G., Vázquez, M., Schneeberger, K., & Yanovsky, M. J. (2020). Bacterial Infection Disrupts Clock Gene Expression to Attenuate Immune Responses. *Current Biology*, 30(9), 1740–1747.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.02.058>
- Deng, X., Gu, L., Liu, C., Lu, T., Lu, F., Lu, Z., Cui, P., Pei, Y., Wang, B., Hu, S., & Cao, X. (2010). Arginine methylation mediated by the Arabidopsis homolog of PRMT5 is essential for proper pre-mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(44), 19114–19119. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009669107>
- Dixon, L. E., Knox, K., Kozma-Bognar, L., Southern, M. M., Pokhilko, A., & Millar, A. J. (2011). Temporal repression of core circadian genes is mediated through EARLY FLOWERING 3 in Arabidopsis. *Current Biology*, 21(2), 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.12.013>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Dodd, A. N., Salathia, N., Hall, A., Kévei, E., Tóth, R., Nagy, F., Hibberd, J. M., Millar, A. J., & Webb, A. A. R. (2005). Cell biology: Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science*, 309(5734), 630–633. <https://doi.org/10.1126/science.1115581>
- Dowdle, M. E., & Lykke-Andersen, J. (2025). Cytoplasmic mRNA decay and quality control machineries in eukaryotes. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/s41576-024-00810-1>
- Dreze, M., Carvunis, A.-R., Charlotiaux, B., Galli, M., Pevzner, S. J., Tasan, M., Ahn, Y.-Y., Balumuri, P., Barabási, A.-L., Bautista, V., Braun, P., Byrdsong, D., Chen, H., Chesnut, J. D., Cusick, M. E., Dangl, J. L., de los Reyes, C., Dricot, A., Duarte, M., ... Yazaki, J. (2011). Evidence for Network Evolution in an *Arabidopsis* Interactome Map. *Science*, 333(6042), 601–607. <https://doi.org/10.1126/science.1203877>
- Ehrnsberger, H. F., Grasser, M., & Grasser, K. D. (2019). Nucleocytoplasmic mRNA transport in plants: Export factors and their influence on growth and development. In *Journal of*

Experimental Botany (Vol. 70, Issue 15, pp. 3757–3763). Oxford University Press.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz173>

- Espinasa, L., & Jeffery, W. R. (2006). Conservation of retinal circadian rhythms during cavefish eye degeneration. *Evolution & Development*, 8(1), 16–22. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2006.05071.x>
- Feng, L., Yan, W., Tang, X., Wu, H., Pan, Y., Lu, D., Ling-hu, Q., Liu, Y., Liu, Y., Song, X., Ali, M., Fang, L., Guo, H., & Li, B. (2024). Multiple factors and features dictate the selective production of ct-siRNA in Arabidopsis. *Communications Biology*, 7(1), 474.
<https://doi.org/10.1038/s42003-024-06142-4>
- Fiorucci, A. S., Galvão, V. C., Ince, Y. Ç., Boccaccini, A., Goyal, A., Allenbach Petrolati, L., Trevisan, M., & Fankhauser, C. (2020). PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 7 is important for early responses to elevated temperature in Arabidopsis seedlings. *New Phytologist*, 226(1), 50–58. <https://doi.org/10.1111/nph.16316>
- Franklin, K. A., Lee, S. H., Patel, D., Kumar, S. V., Spartz, A. K., Gu, C., Ye, S., Yu, P., Breen, G., Cohen, J. D., Wigge, P. A., & Gray, W. M. (2011). Phytochrome-Interacting Factor 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(50), 20231–20235.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1110682108>
- Frederick, M. I., & Heinemann, I. U. (2021). Regulation of RNA stability at the 3' end. In *Biological Chemistry* (Vol. 402, Issue 4, pp. 425–431). De Gruyter Open Ltd.
<https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0325>
- Fu, J., Murphy, K. A., Zhou, M., Li, Y. H., Lam, V. H., Tabuloc, C. A., Chiu, J. C., & Liu, Y. (2016). Codon usage affects the structure and function of the *Drosophila* circadian clock protein PERIOD. <https://doi.org/10.1101/gad.281030>
- Fustin, J. M., Ye, S., Rakers, C., Kaneko, K., Fukumoto, K., Yamano, M., Versteven, M., Grünewald, E., Cargill, S. J., Tamai, T. K., Xu, Y., Jabbur, M. L., Kojima, R., Lamberti, M. L., Yoshioka-Kobayashi, K., Whitmore, D., Tammam, S., Howell, P. L., Kageyama, R., ... Okamura, H. (2020). Methylation deficiency disrupts biological rhythms from bacteria to humans. *Communications Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0942-0>
- Gao, J., Zhuang, S., & Zhang, W. (2024). Advances in Plant Auxin Biology: Synthesis, Metabolism, Signaling, Interaction with Other Hormones, and Roles under Abiotic Stress. In *Plants* (Vol. 13, Issue 17). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
<https://doi.org/10.3390/plants13172523>
- Gendron, J. M., Pruneda-Paz, J. L., Doherty, C. J., Gross, A. M., Kang, S. E., & Kay, S. A. (2012). Arabidopsis circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), 3167–3172. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200355109>
- Gillen, S. L., Waldron, J. A., & Bushell, M. (2021). Codon optimality in cancer. *Oncogene*, 40(45), 6309–6320. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02022-x>

- Gingold, H., Tehler, D., Christoffersen, N. R., Nielsen, M. M., Asmar, F., Kooistra, S. M., Christophersen, N. S., Christensen, L. L., Borre, M., Sørensen, K. D., Andersen, L. D., Andersen, C. L., Hulleman, E., Wurdinger, T., Ralfkiaer, E., Helin, K., Grønbaek, K., Ørntoft, T., Waszak, S. M., ... Pilpel, Y. (2014). A Dual Program for Translation Regulation in Cellular Proliferation and Differentiation. *Cell*, 158(6), 1281–1292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.011>
- Goodarzi, H., Nguyen, H. C. B., Zhang, S., Dill, B. D., Molina, H., & Tavazoie, S. F. (2016). Modulated Expression of Specific tRNAs Drives Gene Expression and Cancer Progression. *Cell*, 165(6), 1416–1427. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.046>
- Gould, P. D., Locke, J. C. W., Larue, C., Southern, M. M., Davis, S. J., Hanano, S., Moyle, R., Milich, R., Putterill, J., Millar, A. J., & Hall, A. (2006). The molecular basis of temperature compensation in the Arabidopsis circadian clock. *Plant Cell*, 18(5), 1177–1187. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039990>
- Graham, C. A., Paajanen, P., Edwards, K. J., & Dodd, A. N. (2023). Genome-wide circadian gating of a cold temperature response in bread wheat. *PLoS Genetics*, 19(9), e1010947. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010947>
- Greenham, K., & McClung, C. R. (2015). Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nature Reviews. Genetics*, 16(10), 598–610. <https://doi.org/10.1038/nrg3976>
- Gregory, B. D., O'Malley, R. C., Lister, R., Urich, M. A., Tonti-Filippini, J., Chen, H., Millar, A. H., & Ecker, J. R. (2008). A Link between RNA Metabolism and Silencing Affecting Arabidopsis Development. *Developmental Cell*, 14(6), 854–866. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.04.005>
- Guo, J., Cheng, P., Yuan, H., & Liu, Y. (2009). The Exosome Regulates Circadian Gene Expression in a Posttranscriptional Negative Feedback Loop. *Cell*, 138(6), 1236–1246. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.043>
- Gutierrez, R. A., Ewing, R. M., Cherry, J. M., & Green, P. J. (2002). Identification of unstable transcripts in Arabidopsis by cDNA microarray analysis: Rapid decay is associated with a group of touch- and specific clock-controlled genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17), 11513–11518. <https://doi.org/10.1073/pnas.152204099>
- Hajdu, A., Dobos, O., Domijan, M., Bálint, B., Nagy, I., Nagy, F., & Kozma-Bognár, L. (2018). ELONGATED HYPOCOTYL 5 mediates blue light signalling to the Arabidopsis circadian clock. *Plant Journal*, 96(6), 1242–1254. <https://doi.org/10.1111/tpj.14106>
- Harmer, S. L. (2009). The Circadian System in Higher Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), 357–377. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092054>
- Harmer, S. L., Hogenesch, J. B., Straume, M., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J. A., & Kay, S. A. (2000). Orchestrated Transcription of Key Pathways in Arabidopsis by the Circadian Clock. *Science*, 290(5499), 2110–2113. <https://doi.org/10.1126/science.290.5499.2110>

- Hassidim, M., Yakir, E., Fradkin, D., Hilman, D., Kron, I., Keren, N., Harir, Y., Yerushalmi, S., & Green, R. M. (2007). Mutations in CHLOROPLAST RNA BINDING provide evidence for the involvement of the chloroplast in the regulation of the circadian clock in Arabidopsis. *Plant Journal*, 51(4), 551–562. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03160.x>
- Hayes, S., Sharma, A., Fraser, D. P., Trevisan, M., Cragg-Barber, C. K., Tavridou, E., Fankhauser, C., Jenkins, G. I., & Franklin, K. A. (2017). UV-B Perceived by the UVR8 Photoreceptor Inhibits Plant Thermomorphogenesis. *Current Biology*, 27(1), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.004>
- Heck, A. M., & Wilusz, J. (2018). The interplay between the RNA decay and translation machinery in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032839>
- Helfer, A., Nusinow, D. A., Chow, B. Y., Gehrke, A. R., Bulyk, M. L., & Kay, S. A. (2011). LUX ARRHYTHMO encodes a nighttime repressor of circadian gene expression in the Arabidopsis core clock. *Current Biology*, 21(2), 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.12.021>
- Herrero, E., Kolmos, E., Bujdoso, N., Yuan, Y., Wang, M., Berns, M. C., Uhlworm, H., Coupland, G., Saini, R., Jaskolski, M., Webb, A., Gonçalves, J., & Davis, S. J. (2012). EARLY FLOWERING4 recruitment of EARLY FLOWERING3 in the nucleus sustains the Arabidopsis circadian clock. *Plant Cell*, 24(2), 428–443. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.093807>
- Herzog, V. A., Reichholf, B., Neumann, T., Rescheneder, P., Bhat, P., Burkard, T. R., Wlotzka, W., Von Haeseler, A., Zuber, J., & Ameres, S. L. (2017). Thiol-linked alkylation of RNA to assess expression dynamics. *Nature Methods*, 14(12), 1198–1204. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4435>
- Hoffmann, G., Mahboubi, A., Bente, H., Garcia, D., Hanson, J., & Hafr^on, A. (2022). Arabidopsis RNA processing body components LSM1 and DCP5 aid in the evasion of translational repression during Cauliflower mosaic virus infection. *Plant Cell*, 34(8), 3128–3147. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac132>
- Hong, L., Ye, C., Lin, J., Fu, H., Wu, X., & Li, Q. Q. (2018). Alternative polyadenylation is involved in auxin-based plant growth and development. *Plant Journal*, 93(2), 246–258. <https://doi.org/10.1111/tpj.13771>
- Hou, Y., Sun, J., Wu, B., Gao, Y., Nie, H., Nie, Z., Quan, S., Wang, Y., Cao, X., & Li, S. (2021). CPSF30-L-mediated recognition of mRNA m6A modification controls alternative polyadenylation of nitrate signaling-related gene transcripts in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 14(4), 688–699. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.01.013>
- Huang, W., Pérez-García, P., Pokhilko, A., Millar, A. J., Antoshechkin, I., Riechmann, J. L., & Mas, P. (2012). Mapping the core of the Arabidopsis circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science*, 335(6077), 75–79. <https://doi.org/10.1126/science.1219075>
- Ibañez, C., Delker, C., Martinez, C., Bürstenbinder, K., Janitza, P., Lippmann, R., Ludwig, W., Sun, H., James, G. V., Klecker, M., Grossjohann, A., Schneeberger, K., Prat, S., & Quint, M. (2018).

Brassinosteroids Dominate Hormonal Regulation of Plant Thermomorphogenesis via BZR1. *Current Biology*, 28(2), 303–310.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.077>

- Imamachi, N., Tani, H., Mizutani, R., Imamura, K., Irie, T., Suzuki, Y., & Akimitsu, N. (2014). BRIC-seq: A genome-wide approach for determining RNA stability in mammalian cells. *Methods*, 67(1), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.07.014>
- Iwasaki, S., Takeda, A., Motose, H., & Watanabe, Y. (2007). Characterization of Arabidopsis decapping proteins AtDCP1 and AtDCP2, which are essential for post-embryonic development. *FEBS Letters*, 581(13), 2455–2459. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.051>
- James, A. B., Syed, N. H., Bordage, S., Marshall, J., Nimmo, G. A., Jenkins, G. I., Herzyk, P., Brown, J. W. S., & Nimmo, H. G. (2012). Alternative Splicing Mediates Responses of the Arabidopsis Circadian Clock to Temperature Changes. *The Plant Cell*, 24(3), 961–981. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.093948>
- Jang, C., Lahens, N. F., Hogenesch, J. B., & Sehgal, A. (2015). Ribosome profiling reveals an important role for translational control in circadian gene expression. *Genome Research*, 25(12), 1836–1847. <https://doi.org/10.1101/gr.191296.115>
- Jang, G. J., Yang, J. Y., Hsieh, H. L., & Wu, S. H. (2019). Processing bodies control the selective translation for optimal development of Arabidopsis young seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(13), 6451–6456. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900084116>
- Jeacock, L., Faria, J., & Horn, D. (2018). Codon usage bias controls mRNA and protein abundance in trypanosomatids. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.32496>
- Johansson, M., & Staiger, D. (2015). Time to flower: Interplay between photoperiod and the circadian clock. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 719–730. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru441>
- Jones, M. A., Williams, B. A., McNicol, J., Simpson, C. G., Brown, J. W. S., & Harmer, S. L. (2012). Mutation of Arabidopsis *SPLICEOSOMAL TIMEKEEPER LOCUS1* Causes Circadian Clock Defects. *The Plant Cell*, 24(10), 4066–4082. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.104828>
- Jouve, L., Gaspar, T., Kevers, C., Greppin, H., & Degli Agosti, R. (1999). Involvement of indole-3-acetic acid in the circadian growth of the first internode of Arabidopsis. *Planta*, 209(1), 136–142. <https://doi.org/10.1007/s004250050615>
- Jung, J. H., Barbosa, A. D., Hutin, S., Kumita, J. R., Gao, M., Derwort, D., Silva, C. S., Lai, X., Pierre, E., Geng, F., Kim, S. B., Baek, S., Zubieta, C., Jaeger, K. E., & Wigge, P. A. (2020). A prion-like domain in ELF3 functions as a thermosensor in Arabidopsis. *Nature*, 585(7824), 256–260. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2644-7>
- Kahle, N., Sheerin, D. J., Fischbach, P., Koch, L. A., Schwenk, P., Lambert, D., Rodriguez, R., Kerner, K., Hoecker, U., Zurbriggen, M. D., & Hiltbrunner, A. (2020). COLD REGULATED 27 and 28 are targets of CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1 and negatively affect phytochrome B signalling. *Plant Journal*, 104(4), 1038–1053. <https://doi.org/10.1111/tpj.14979>

- Kamioka, M., Takao, S., Suzuki, T., Taki, K., Higashiyam, T., Kinoshita, T., & Nakamichi, N. (2016). Direct repression of evening genes by CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1 in the Arabidopsis circadian clock. *Plant Cell*, 28(3), 696–711. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00737>
- Kastenmayer, J. P., & Green, P. J. (2000). Novel features of the XRN-family in Arabidopsis : Evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13985–13990. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.25.13985>
- Kidokoro, S., Hayashi, K., Haraguchi, H., Ishikawa, T., Soma, F., Konoura, I., Toda, S., Mizoi, J., Suzuki, T., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2021). Posttranslational regulation of multiple clock-related transcription factors triggers cold-inducible gene expression in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.2021048118>
- Kim, Y. J. (2023). Crosstalk between RNA silencing and RNA quality control in plants. *BMB Reports*, 56(6), 321–325. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2023-0049>
- Kolmos, E., Chow, B. Y., Pruneda-Paz, J. L., & Kay, S. A. (2014). Hsfb2b-mediated repression of PRR7 directs abiotic stress responses of the circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(45), 16172–16177. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418483111>
- Konopka, R. J., & Benzer, S. (1971). Clock Mutants of Drosophila melanogaster. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.9.2112>
- Krahmer, J., Hindle, M., Perby, L. K., Mogensen, H. K., Nielsen, T. H., Halliday, K. J., van Ooijen, G., Le Bihan, T., & Millar, A. J. (2022). The Circadian Clock Gene Circuit Controls Protein and Phosphoprotein Rhythms in Arabidopsis thaliana. *Molecular and Cellular Proteomics*, 21(1). <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2021.100172>
- Krakau, S., Richard, H., & Marsico, A. (2017). PureCLIP: Capturing target-specific protein-RNA interaction footprints from single-nucleotide CLIP-seq data. *Genome Biology*, 18(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1364-2>
- Krittika, S., & Yadav, P. (2020). Circadian clocks: an overview on its adaptive significance. *Biological Rhythm Research*, 51(7), 1109–1132. <https://doi.org/10.1080/09291016.2019.1581480>
- Krzyszton, M., & Kufel, J. (2022). Analysis of mRNA-derived siRNAs in mutants of mRNA maturation and surveillance pathways in Arabidopsis thaliana. *Scientific Reports*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05574-4>
- Kubaczka, M. G., Godoy Herz, M. A., Chen, W. C., Zheng, D., Petrillo, E., Tian, B., & Kornblihtt, A. R. (2024). Light regulates widespread plant alternative polyadenylation through the chloroplast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 121(34). <https://doi.org/10.1073/pnas.2405632121>
- Kuhlman, S. J., Craig, L. M., & Duffy, J. F. (2018). Introduction to chronobiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033613>

- Kwon, Y.-J., Park, M.-J., Kim, S.-G., Baldwin, I. T., & Park, C.-M. (2014). Alternative splicing and nonsense-mediated decay of circadian clock genes under environmental stress conditions in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 14(1), 136. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-136>
- Lai, A. G., Doherty, C. J., Mueller-Roeber, B., Kay, S. A., Schippers, J. H. M., & Dijkwel, P. P. (2012). Circadian Clock-Associated 1 regulates ROS homeostasis and oxidative stress responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(42), 17129–17134. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209148109>
- Lamesch, P., Berardini, T. Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, D. L., Garcia-Hernandez, M., Karthikeyan, A. S., Lee, C. H., Nelson, W. D., Ploetz, L., Singh, S., Wensel, A., & Huala, E. (2012). The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D1202–D1210. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1090>
- Langmead, B. (2010). Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Current Protocols in Bioinformatics*, SUPP.32. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1107s32>
- Ledger, S., Strayer, C., Ashton, F., Kay, S. A., & Putterill, J. (2001). Analysis of the function of two circadian-regulated CONSTANS-LIKE genes. *The Plant Journal*, 26(1), 15–22. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01003.x>
- Lee, J., & Lee, I. (2010). Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 61, Issue 9, pp. 2247–2254). <https://doi.org/10.1093/jxb/erq098>
- Legris, M., Klose, C., Burgie, E. S., Rojas, C. C. R., Neme, M., Hiltbrunner, A., Wigge, P. A., Schäfer, E., Vierstra, R. D., & Casal, J. J. (2016). Phytochrome B integrates light and temperature signals in *Arabidopsis*. *Science*, 354(6314), 897–900. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5656>
- Leivar, P., Monte, E., Al-Sady, B., Carle, C., Storer, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Quail, P. H. (2008). The *Arabidopsis* phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *Plant Cell*, 20(2), 337–352. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052142>
- Lewinski, M., Brüggemann, M., Köster, T., Reichel, M., Bergelt, T., Meyer, K., König, J., Zarnack, K., & Staiger, D. (2024). Mapping protein–RNA binding in plants with individual-nucleotide-resolution UV cross-linking and immunoprecipitation (plant iCLIP2). *Nature Protocols*, 19(April), 33–48. <https://doi.org/10.1038/s41596-023-00935-3>
- Lewinski, M., Steffen, A., Kachariya, N., Elgner, M., Schmal, C., Messini, N., Köster, T., Reichel, M., Sattler, M., Zarnack, K., & Staiger, D. (2024). *Arabidopsis thaliana* GLYCINE RICH RNA-BINDING PROTEIN 7 interaction with its iCLIP target LHCB1.1 correlates with changes in RNA stability and circadian oscillation. *Plant Journal*, 118(1), 203–224. <https://doi.org/10.1111/tpj.16601>

- Li, H., Xue, M., Zhang, H., Zhao, F., Li, X., Yu, S., & Jiang, D. (2024). A warm temperature-released negative feedback loop fine-tunes PIF4-mediated thermomorphogenesis in Arabidopsis. *Plant Communications*, 5(5). <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2024.100833>
- Lidder, P., Gutiérrez, R. A., Salomé, P. A., McClung, C. R., & Green, P. J. (2005). Circadian Control of Messenger RNA Stability. Association with a Sequence-Specific Messenger RNA Decay Pathway. *Plant Physiology*, 138(4), 2374–2385. <https://doi.org/10.1104/pp.105.060368>
- Lin, J., Yu, Z., Ye, C., Hong, L., Chu, Y., Shen, Y., & Li, Q. Q. (2021). Alternative polyadenylated mRNAs behave as asynchronous rhythmic transcription in Arabidopsis. *RNA Biology*, 18(12), 2594–2604. <https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1933732>
- Liu, L., & Chen, X. (2016). RNA Quality Control as a Key to Suppressing RNA Silencing of Endogenous Genes in Plants. *Molecular Plant*, 9(6), 826–836. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.03.011>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, S. X., Webb, C. J., Knowles, S. M., Kim, S. H. J., Wang, Z., & Tobin, E. M. (2012). CCA1 and ELF3 interact in the control of hypocotyl length and flowering time in arabidopsis. *Plant Physiology*, 158(2), 1079–1088. <https://doi.org/10.1104/pp.111.189670>
- Lück, S., Thurley, K., Thaben, P. F., & Westermarck, P. O. (2014). Rhythmic degradation explains and unifies circadian transcriptome and proteome data. *Cell Reports*, 9(2), 741–751. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.021>
- Lyu, J., Zhuang, Y., & Lin, Y. (2024). Circadian regulation of translation. *RNA Biology*, 21(1), 959–969. <https://doi.org/10.1080/15476286.2024.2408524>
- Ma, Y., Gil, S., Grasser, K. D., & Mas, P. (2018). Targeted Recruitment of the Basal Transcriptional Machinery by LNK Clock Components Controls the Circadian Rhythms of Nascent RNAs in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 30(4), 907–924. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00052>
- MacGregor, D. R., Gould, P., Foreman, J., Griffiths, J., Bird, S., Page, R., Stewart, K., Steel, G., Young, J., Paszkiewicz, K., Millar, A. J., Halliday, K. J., Hall, A. J., & Penfield, S. (2013). HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES1 is required for circadian periodicity through the promotion of nucleo-cytoplasmic mRNA export in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25(11), 4391–4404. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114959>
- Malapeira, J., Khaitova, L. C., & Mas, P. (2012). Ordered changes in histone modifications at the core of the Arabidopsis circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(52), 21540–21545. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217022110>
- Maldonado-Bonilla, L. D. (2014). Composition and function of P bodies in Arabidopsis thaliana. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 5, Issue MAY). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00201>

- Martínez, C., Espinosa-Rufz, A., de Lucas, M., Bernardo-García, S., Franco-Zorrilla, J. M., & Prat, S. (2018). PIF 4-induced BR synthesis is critical to diurnal and thermomorphogenic growth. *The EMBO Journal*, 37(23). <https://doi.org/10.15252/embj.201899552>
- Martin-Tryon, E. L., & Harmer, S. L. (2008). XAP5 CIRCADIAN TIMEKEEPER coordinates light signals for proper timing of photomorphogenesis and the circadian clock in Arabidopsis. *Plant Cell*, 20(5), 1244–1259. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056655>
- Martin-Tryon, E. L., Kreps, J. A., & Harmer, S. L. (2007). GIGANTEA acts in blue light signaling and has biochemically separable roles in circadian clock and flowering time regulation. *Plant Physiology*, 143(1), 473–486. <https://doi.org/10.1104/pp.106.088757>
- Más, P., Kim, W.-Y., Somers, D. E., & Kay, S. A. (2003). Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in Arabidopsis thaliana. *Nature*, 426(6966), 567–570. <https://doi.org/10.1038/nature02163>
- Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, A., Yaeno, T., Shirasu, K., Yao, H., McSteen, P., Zhao, Y., Hayashi, K., Kamiya, Y., & Kasahara, H. (2011). The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45), 18512–18517. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108434108>
- Mateos, J. L., de Leone, M. J., Torchio, J., Reichel, M., & Staiger, D. (2018). Beyond Transcription: Fine-Tuning of Circadian Timekeeping by Post-Transcriptional Regulation. *Genes*, 9(12), 616. <https://doi.org/10.3390/genes9120616>
- Matsui, A., Iida, K., Tanaka, M., Yamaguchi, K., Mizuhashi, K., Kim, J.-M., Takahashi, S., Kobayashi, N., Shigenobu, S., Shinozaki, K., & Seki, M. (2017). Novel Stress-Inducible Antisense RNAs of Protein-Coding Loci Are Synthesized by RNA-Dependent RNA Polymerase. *Plant Physiology*, 175(1), 457–472. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00787>
- Matsuo, T., Okamoto, K., Onai, K., Niwa, Y., Shimogawara, K., & Ishiura, M. (2008). A systematic forward genetic analysis identified components of the Chlamydomonas circadian system. *Genes and Development*, 22(7), 918–930. <https://doi.org/10.1101/gad.1650408>
- Merret, R., Descombin, J., Juan, Y. ting, Favory, J. J., Carpentier, M. C., Chaparro, C., Charng, Y. yung, Deragon, J. M., & Bousquet-Antonelli, C. (2013). XRN4 and LARP1 are required for a heat-triggered mRNA decay pathway involved in plant acclimation and survival during thermal stress. *Cell Reports*, 5(5), 1279–1293. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.019>
- Michael, T. P., Mockler, T. C., Breton, G., McEntee, C., Byer, A., Trout, J. D., Hazen, S. P., Shen, R., Priest, H. D., Sullivan, C. M., Givan, S. A., Yanovsky, M., Hong, F., Kay, S. A., & Chory, J. (2008). Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. *PLoS Genetics*, 4(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0040014>
- Michael, T. P., Salome, P. A., & Yu, H. J. (2003). *Enhanced Fitness Conferred by Naturally Occurring Variation in the Circadian Clock*. 302(November), 1049–1054.
- Millar, A. J., Carré, I. A., Strayer, C. A., Chua, N. H., & Kay, S. A. (1995). Circadian clock mutants in Arabidopsis identified by luciferase imaging. *Science*, 267(5201), 1161–1163. <https://doi.org/10.1126/science.7855595>

- Millar, A. J., & Kay, S. A. (1991). Circadian control of cab gene transcription and mRNA accumulation in Arabidopsis. *Plant Cell*. <https://doi.org/10.2307/3869359>
- Mills, S. C., Enganti, R., & von Arnim, A. G. (2018). What makes ribosomes tick? In *RNA Biology* (Vol. 15, Issue 1, pp. 44–54). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1391444>
- Mishima, Y., & Tomari, Y. (2017). Pervasive yet nonuniform contributions of Dcp2 and Cnot7 to maternal <scp>mRNA</scp> clearance in zebrafish. *Genes to Cells*, 22(7), 670–678. <https://doi.org/10.1111/gtc.12504>
- Mizuno, T., Nomoto, Y., Oka, H., Kitayama, M., Takeuchi, A., Tsubouchi, M., & Yamashino, T. (2014). Ambient temperature signal feeds into the circadian clock transcriptional circuitry through the EC night-time repressor in arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, 55(5), 958–976. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu030>
- Mockler, T. C., Michael, T. P., Priest, H. D., Shen, R., Sullivan, C. M., Givan, S. A., McEntee, C., Kay, S. A., & Chory, J. (2007). The Diurnal Project: Diurnal and Circadian Expression Profiling, Model-based Pattern Matching, and Promoter Analysis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 72(1), 353–363. <https://doi.org/10.1101/sqb.2007.72.006>
- Montemayor, E. J., Virta, J. M., Hayes, S. M., Nomura, Y., Brow, D. A., & Butcher, S. E. (2020). Molecular basis for the distinct cellular functions of the Lsm1-7 and Lsm2-8 complexes. *RNA*. <https://doi.org/10.1261/rna.075879.120>
- Mortada, M., Xiong, L., & Mas, P. (2024). Dissecting the complexity of local and systemic circadian communication in plants. *Npj Biological Timing and Sleep*, 1(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s44323-024-00003-3>
- Mouradov, A., Cremer, F., & Coupland, G. (2002). Control of Flowering Time: Interacting Pathways as a Basis for Diversity. In *Supplement: Signal Transduction* (Vol. 14). http://www.jstor.orgURL:http://www.jstor.org/stable/3871753http://www.jstor.org/stable/3871753?seq=1&cid=pdf-reference#references_tab_contents
- Nadimpalli, H. P., Katsioudi, G., Arpa, E. S., Chikhaoui, L., Arpat, A. B., Liechti, A., Palais, G., Tessmer, C., Hofmann, I., Galy, B., & Gatfield, D. (2024). Diurnal control of iron responsive element containing mRNAs through iron regulatory proteins IRP1 and IRP2 is mediated by feeding rhythms. *Genome Biology*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-024-03270-2>
- Nagel, D. H., Doherty, C. J., Pruneda-Paz, J. L., Schmitz, R. J., Ecker, J. R., & Kay, S. A. (2015). Genome-wide identification of CCA1 targets uncovers an expanded clock network in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34). <https://doi.org/10.1073/pnas.1513609112>
- Nagel, D. H., Pruneda-Paz, J. L., & Kay, S. A. (2014). FBH1 affects warm temperature responses in the Arabidopsis circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(40), 14595–14600. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416666111>

- Nakamichi, N. (2020). The Transcriptional Network in the Arabidopsis Circadian Clock System. *Genes*, 11(11), 1284. <https://doi.org/10.3390/genes11111284>
- Nakamichi, N., Kiba, T., Henriques, R., Mizuno, T., Chua, N. H., & Sakakibara, H. (2010). PSEUDO-RESPONSE ReGULATORS 9, 7, and 5 are transcriptional repressors in the Arabidopsis circadian clock. *Plant Cell*, 22(3), 594–605. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072892>
- Nakamichi, N., Kiba, T., Kamioka, M., Suzukie, T., Yamashino, T., Higashiyama, T., Sakakibara, H., & Mizuno, T. (2012). Transcriptional repressor PRR5 directly regulates clock-output pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(42), 17123–17128. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205156109>
- Nardeli, S. M., Zacharaki, V., Rojas-Murcia, N., Collani, S., Wang, K., Bayer, M., Schmid, M., & Goretta, D. (2023). Arabidopsis thaliana *LSM7* is essential for auxin-mediated regulation of SAUR genes and thermomorphogenesis. <https://doi.org/10.1101/2023.03.28.534379>
- Nemhauser, J. L., Mockler, T. C., & Chory, J. (2004). Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis. *PLoS Biology*, 2(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020258>
- Nohales, M. A., & Kay, S. A. (2016). Molecular mechanisms at the core of the plant circadian oscillator. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23(12), 1061–1069. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3327>
- Nusinow, D. A., Helfer, A., Hamilton, E. E., King, J. J., Imaizumi, T., Schultz, T. F., Farré, E. M., & Kay, S. A. (2011). The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature*, 475(7356), 398–402. <https://doi.org/10.1038/nature10182>
- Orellana, E. A., Liu, Q., Yankova, E., Pirouz, M., De Braekeleer, E., Zhang, W., Lim, J., Aspris, D., Sendinc, E., Garyfallos, D. A., Gu, M., Ali, R., Gutierrez, A., Mikutis, S., Bernardes, G. J. L., Fischer, E. S., Bradley, A., Vassiliou, G. S., Slack, F. J., ... Gregory, R. I. (2021). METTL1-mediated m7G modification of Arg-TCT tRNA drives oncogenic transformation. *Molecular Cell*, 81(16), 3323–3338.e14. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.06.031>
- Ortega-Galisteo, A. P., Morales-Ruiz, T., Ariza, R. R., & Roldán-Arjona, T. (2008). Arabidopsis DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Molecular Biology*, 67(6), 671–681. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9346-0>
- Paponov, I. A., Paponov, M., Teale, W., Menges, M., Chakrabortee, S., Murray, J. A. H., & Palme, K. (2008). Comprehensive Transcriptome Analysis of Auxin Responses in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 1(2), 321–337. <https://doi.org/10.1093/mp/ssm021>
- Passarelli, M. C., Pinzaru, A. M., Asgharian, H., Liberti, M. V., Heissel, S., Molina, H., Goodarzi, H., & Tavazoie, S. F. (2022). Leucyl-tRNA synthetase is a tumour suppressor in breast cancer and regulates codon-dependent translation dynamics. *Nature Cell Biology*, 24(3), 307–315. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00856-5>
- Perea-Resa, C., Carrasco-López, C., Catalá, R., Turečková, V., Novak, O., Zhang, W., Sieburth, L., Jiménez-Gómez, J. M., & Salinas, J. (2015). The LSM1-7 complex differentially regulates

arabidopsis tolerance to abiotic stress conditions by promoting selective mRNA decapping. *Plant Cell*, 28(2), 505–520. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00867>

Perea-Resa, C., Hernandez-Verdeja, T., Lopez-Cobollo, R., Castellano, M. d. M., & Salinas, J. (2012). LSM Proteins Provide Accurate Splicing and Decay of Selected Transcripts to Ensure Normal Arabidopsis Development. *The Plant Cell*, 24(12), 4930–4947. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103697>

Pérez-García, P., Ma, Y., Yanovsky, M. J., & Mas, P. (2015). Time-dependent sequestration of RVE8 by LNK proteins shapes the diurnal oscillation of anthocyanin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(16), 5249–5253. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420792112>

Perez-Santángelo, S., Perez-Santangelo, S., Mancini, E., Francey, L. J., Schlaen, R. G., Chernomoretz, a., Hogenesch, J. B., & Yanovsky, M. J. (2014). Role for LSM genes in the regulation of circadian rhythms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 15166–15171. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409791111>

Poornima, G., Shah, S., Vignesh, V., Parker, R., & Rajyaguru, P. I. (2016). Arginine methylation promotes translation repression activity of eIF4G-binding protein, Scd6. *Nucleic Acids Research*, 44(19). <https://doi.org/10.1093/nar/gkw762>

Prasetyaningrum, P., Litthauer, S., Vegliani, F., Battle, M. W., Wood, M. W., Liu, X., Dickson, C., & Jones, M. A. (2023). Inhibition of RNA degradation integrates the metabolic signals induced by osmotic stress into the Arabidopsis circadian system. *Journal of Experimental Botany*, 74(18), 5805–5819. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad274>

Presnyak, V., Alhusaini, N., Chen, Y.-H., Martin, S., Morris, N., Kline, N., Olson, S., Weinberg, D., Baker, K. E., Graveley, B. R., & Collier, J. (2015). Codon Optimality Is a Major Determinant of mRNA Stability. *Cell*, 160(6), 1111–1124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.029>

Qin, Y., Liu, Z., Gao, S., Long, Y., Zhu, X., Liu, B., Gao, Y., Xie, Q., Nohales, M. A., Xu, X., & Zhai, J. (2023). A Day in the Life of Arabidopsis: 24-Hour Time-lapse Single-nucleus Transcriptomics Reveal Cell-type specific Circadian Rhythms. <https://doi.org/10.1101/2023.12.09.570919>

Qin, Y., Liu, Z., Gao, S., Martínez-Vasallo, C., Long, Y., Zhu, X., Liu, B., Gao, Y., Xu, X., Nohales, M. A., Xie, Q., & Zhai, J. (2025). 48-Hour and 24-Hour Time-lapse Single-nucleus Transcriptomics Reveal Cell-type specific Circadian Rhythms in Arabidopsis. *Nature Communications*, 16(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-025-59424-8>

Rajyaguru, P., She, M., & Parker, R. (2012). Scd6 Targets eIF4G to Repress Translation: RGG Motif Proteins as a Class of eIF4G-Binding Proteins. *Molecular Cell*, 45(2), 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.11.026>

Riccio, A. P., & Goldman, B. D. (2000). Circadian rhythms of locomotor activity in naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*). *Physiology & Behavior*, 71(1–2), 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00281-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00281-X)

Richter, J. D., & Collier, J. (2015). Pausing on Polyribosomes: Make Way for Elongation in Translational Control. *Cell*, 163(2), 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.041>

- Roehr, J. T., Dieterich, C., & Reinert, K. (2017). Flexbar 3.0 - SIMD and multicore parallelization. *Bioinformatics*, 33(18), 2941–2942. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx330>
- Romanowski, A., Schlaen, R. G., Perez-Santangelo, S., Mancini, E., & Yanovsky, M. J. (2020). Global transcriptome analysis reveals circadian control of splicing events in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 103(2), 889–902. <https://doi.org/10.1111/tbj.14776>
- Romanowski, A., & Yanovsky, M. J. (2015). Circadian rhythms and post-transcriptional regulation in higher plants. *Frontiers in Plant Science*, 6(June), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00437>
- Roux, M. E., Rasmussen, M. W., Palma, K., Lolle, S., Regué, À. M., Bethke, G., Glazebrook, J., Zhang, W., Sieburth, L., Larsen, M. R., Mundy, J., & Petersen, M. (2015). The mRNA decay factor PAT 1 functions in a pathway including MAP kinase 4 and immune receptor SUMM 2. *The EMBO Journal*, 34(5), 593–608. <https://doi.org/10.15252/emj.201488645>
- Roy, B., & Jacobson, A. (2013). The intimate relationships of mRNA decay and translation. In *Trends in Genetics* (Vol. 29, Issue 12, pp. 691–699). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.09.002>
- Roy, D., & Rajyaguru, P. I. (2018). Suppressor of clathrin deficiency (Scd6)—An emerging RGG-motif translation repressor. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 9, Issue 5, pp. 1–17). <https://doi.org/10.1002/wrna.1479>
- Salomé, P. A., McClung, C. R., Salome, P. A., & McClung, C. R. (2005). PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*, 17(3), 791–803. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.029504>
- Sanchez, S. E., Petrillo, E., Beckwith, E. J., Zhang, X., Rugnone, M. L., Hernando, C. E., Cuevas, J. C., Godoy Herz, M. A., Depetris-Chauvin, A., Simpson, C. G., Brown, J. W. S., Cerdán, P. D., Borevitz, J. O., Mas, P., Ceriani, M. F., Kornblihtt, A. R., & Yanovsky, M. J. (2010). A methyl transferase links the circadian clock to the regulation of alternative splicing. *Nature*, 468(7320), 112–116. <https://doi.org/10.1038/nature09470>
- Scebbba, F., De Bastiani, M., Bernacchia, G., Andreucci, A., Galli, A., & Pitto, L. (2007). PRMT11: A new *Arabidopsis* MBD7 protein partner with arginine methyltransferase activity. *Plant Journal*, 52(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03238.x>
- Schlaen, R. G., Mancini, E., Sanchez, S. E., Perez-Santángelo, S., Rugnone, M. L., Simpson, C. G., Brown, J. W. S., Zhang, X., Chernomoretz, A., & Yanovsky, M. J. (2015). The spliceosome assembly factor GEMIN2 attenuates the effects of temperature on alternative splicing and circadian rhythms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(30), 9382–9387. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504541112>
- Schoenberg, D. R., & Maquat, L. E. (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 246–259. <https://doi.org/10.1038/nrg3160>
- Schofield, J. A., Duffy, E. E., Kiefer, L., Sullivan, M. C., & Simon, M. D. (2018). TimeLapse-seq: Adding a temporal dimension to RNA sequencing through nucleoside recoding. *Nature Methods*, 15(3), 221–225. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4582>

- Schwartz, D. C., & Parker, R. (2000). mRNA Decapping in Yeast Requires Dissociation of the Cap Binding Protein, Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E. *Molecular and Cellular Biology*, 20(21), 7933–7942. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.21.7933-7942.2000>
- Schwenk, P., Sheerin, D. J., Ponnu, J., Staudt, A. M., Lesch, K. L., Lichtenberg, E., Medzihradszky, K. F., Hoecker, U., Klement, E., Viczián, A., & Hiltbrunner, A. (2021). Uncovering a novel function of the ccr4-not complex in phytochrome a-mediated light signalling in plants. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.63697>
- Seo, P. J., & Mas, P. (2015). STRESSing the role of the plant circadian clock. In *Trends in Plant Science* (Vol. 20, Issue 4, pp. 230–237). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.01.001>
- Shaw, R., Tian, X., & Xu, J. (2021). Single-Cell Transcriptome Analysis in Plants: Advances and Challenges. In *Molecular Plant* (Vol. 14, Issue 1, pp. 115–126). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.10.012>
- Shu, H., Donnard, E., Liu, B., Jung, S., Wang, R., & Richter, J. D. (2020). FMRP links optimal codons to mRNA stability in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(48), 30400–30411. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009161117>
- Sidaway-Lee, K., Costa, M. J., Rand, D. A., Finkenstadt, B., & Penfield, S. (2014). Direct measurement of transcription rates reveals multiple mechanisms for configuration of the Arabidopsis ambient temperature response. *Genome Biology*, 15(3). <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r45>
- Smith, T., Heger, A., & Sudbery, I. (2017). UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. *Genome Research*, 27(3), 491–499. <https://doi.org/10.1101/gr.209601.116>
- Sorenson, R. S., Deshotel, M. J., Johnson, K., Adler, F. R., & Sieburth, L. E. (2018). Arabidopsis mRNA decay landscape arises from specialized RNA decay substrates, decapping-mediated feedback, and redundancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(7), E1485–E1494. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712312115>
- Steed, G., Ramirez, D. C., Hannah, M. A., & Webb, A. A. R. (2021). Chronoculture, harnessing the circadian clock to improve crop yield and sustainability. In *Science* (Vol. 372, Issue 6541). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.abc9141>
- Stortenbeker, N., & Bemer, M. (2019). The SAUR gene family: the plant's toolbox for adaptation of growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 70(1), 17–27. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery332>
- Sun, J., Qi, L., Li, Y., Chu, J., & Li, C. (2012). Pif4-mediated activation of yucca8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating arabidopsis hypocotyl growth. *PLoS Genetics*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002594>
- Sun, Q., Wang, S., Xu, G., Kang, X., Zhang, M., & Ni, M. (2019). SHB1 and CCA1 interaction desensitizes light responses and enhances thermomorphogenesis. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11071-6>

- Tang, N. H., Kim, K. W., Xu, S., Blazie, S. M., Yee, B. A., Yeo, G. W., Jin, Y., & Chisholm, A. D. (2020). The mRNA Decay Factor CAR-1/LSM14 Regulates Axon Regeneration via Mitochondrial Calcium Dynamics. *Current Biology*, 30(5), 865-876.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.061>
- Tian, W., Wang, R., Bo, C., Yu, Y., Zhang, Y., Shin, G. I., Kim, W. Y., & Wang, L. (2021). SDC mediates DNA methylation-controlled clock pace by interacting with ZTL in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 49(7), 3764–3780. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab128>
- Tognacca, R. S., Servi, L., Hernando, C. E., Saura-Sanchez, M., Yanovsky, M. J., Petrillo, E., & Botto, J. F. (2019). Alternative Splicing Regulation During Light-Induced Germination of Arabidopsis thaliana Seeds. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01076>
- Togra, C., Dhage, R., & Rajyaguru, P. I. (2024). Tdh3 and Rom2 are functional modulators of a conserved condensate-resident RNA-binding protein, Scd6, in *Saccharomyces cerevisiae*. *GENETICS*, 228(2). <https://doi.org/10.1093/genetics/iyae127>
- Torii, K., Inoue, K., Bekki, K., Haraguchi, K., Kubo, M., Kondo, Y., Suzuki, T., Kubota, A., Uemoto, K., Shimizu, H., Saito, M., Fukuda, H., Araki, T., & Endo, M. (2022). A guiding role of the Arabidopsis circadian clock in cell differentiation revealed by time-series single-cell RNA sequencing. *Cell Reports*, 40(2). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111059>
- Uehara, T. N., Mizutani, Y., Kuwata, K., Hirota, T., Sato, A., Mizoi, J., Takao, S., Matsuo, H., Suzuki, T., Ito, S., Saito, A. N., Nishiwaki-Ohkawa, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Yoshimura, T., Kay, S. A., Itami, K., Kinoshita, T., Yamaguchi, J., & Nakamichi, N. (2019). Casein kinase 1 family regulates PRR5 and TOC1 in the Arabidopsis circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 166(23), 11528–11536. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903357116>
- Vong, G. Y. W., McCarthy, K., Claydon, W., Davis, S. J., Redmond, E. J., & Ezer, D. (2024). AraLeTA: An Arabidopsis leaf expression atlas across diurnal and developmental scales. *Plant Physiology*, 195(3), 1941–1953. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiae117>
- Waese, J., Fan, J., Pasha, A., Yu, H., Fucile, G., Shi, R., Cumming, M., Kelley, L. A., Sternberg, M. J., Krishnakumar, V., Ferlanti, E., Miller, J., Town, C., Stuerzlinger, W., & Provart, N. J. (2017). ePlant: Visualizing and exploring multiple levels of data for hypothesis generation in plant biology. *Plant Cell*, 29(8), 1806–1821. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00073>
- Wang, B. B., & Brendel, V. (2004). The ASRG database: identification and survey of Arabidopsis thaliana genes involved in pre-mRNA splicing. *Genome Biology*. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-12-r102>
- Wang, W., Wang, C., Wang, Y., Ma, J., Wang, T., Tao, Z., Liu, P., Li, S., Hu, Y., Gu, A., Wang, H., Qiu, C., & Li, P. (2023). The P-body component DECAPPING5 and the floral repressor SISTER of FCA regulate FLOWERING LOCUS C transcription in Arabidopsis. *Plant Cell*, 35(9), 3303–3324. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad151>

- Wang, X., Jiang, B., Gu, L., Chen, Y., Mora, M., Zhu, M., Noory, E., Wang, Q., & Lin, C. (2021). A photoregulatory mechanism of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Nature Plants*, 7(10), 1397–1408. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-01002-z>
- Wang, X., Wu, F., Xie, Q., Wang, H., Wang, Y., Yue, Y., Gahura, O., Ma, S., Liu, L., Cao, Y., Jiao, Y., Puta, F., McClung, C. R., Xu, X., & Ma, L. (2012). SKIP Is a Component of the Spliceosome Linking Alternative Splicing and the Circadian Clock in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(8), 3278–3295. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.100081>
- Wang, Y., Wu, J. F., Nakamichi, N., Sakakibara, H., Nam, H. G., & Wu, S. H. (2011). LIGHT-REGULATED WD1 and PSEUDO-RESPONSE REGULATOR9 Form a positive feedback regulatory loop in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*, 23(2), 486–498. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081661>
- Wang, Z., Yang, Q., Zhang, D., Lu, Y., Wang, Y., Pan, Y., Qiu, Y., Men, Y., Yan, W., Xiao, Z., Sun, R., Li, W., Huang, H., & Guo, H. (2024). A cytoplasmic osmosensing mechanism mediated by molecular crowding-sensitive DCP5. *Science*, 386(6721), eadk9067. <https://doi.org/10.1126/science.adk9067>
- Wawer, I., Golisz, A., Sulkowska, A., Kawa, D., Kulik, A., & Kufel, J. (2018). mRNA Decapping and 5'-3' Decay Contribute to the Regulation of ABA Signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 9(March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00312>
- Wegener, M., Persicke, M., & Dietz, K. J. (2024). Reprogramming the translome during daily light transitions as affected by cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases GAPC1/C2. *Journal of Experimental Botany*, 75(8), 2494–2509. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad509>
- Weijers, D., & Wagner, D. (2016). Transcriptional Responses to the Auxin Hormone. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 67, pp. 539–574). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112122>
- Wu, J. F., Tsai, H. L., Joanito, I., Wu, Y. C., Chang, C. W., Li, Y. H., Wang, Y., Hong, J. C., Chu, J. W., Hsu, C. P., & Wu, S. H. (2016). LWD-TCP complex activates the morning gene CCA1 in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13181>
- Wu, Q., & Bazzini, A. A. (2024). *Annual Review of Biochemistry Translation and mRNA Stability Control*. 52, 12. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052621>
- Wu, Q., Medina, S. G., Kushawah, G., DeVore, M. L., Castellano, L. A., Hand, J. M., Wright, M., & Bazzini, A. A. (2019). Translation affects mRNA stability in a codon-dependent manner in human cells. *ELife*, 8, 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.45396>
- Xie, Q., Wang, P., Liu, X., Yuan, L., Wang, L., Zhang, C., Li, Y., Xing, H., Zhi, L., Yue, Z., Zhao, C., McClung, C. R., & Xu, X. (2014). LNK1 and LNK2 Are Transcriptional Coactivators in the *Arabidopsis* Circadian Oscillator. *The Plant Cell*, 26(7), 2843–2857. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.126573>
- Xing, D., Wang, Y., Xu, R., Ye, X., Yang, D., & Li, Q. Q. (2013). The regulatory role of Pcf11-similar-4 (PCFS4) in *Arabidopsis* development by genome-wide physical interactions with target loci. *BMC Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-598>

- Xu, J., & Chua, N. H. (2012). Dehydration stress activates Arabidopsis MPK6 to signal DCP1 phosphorylation. *EMBO Journal*, 31(8), 1975–1984. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.56>
- Xu, J., & Chua, N.-H. (2009). Arabidopsis Decapping 5 Is Required for mRNA Decapping, P-Body Formation, and Translational Repression during Postembryonic Development. *The Plant Cell*, 21(10), 3270–3279. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.070078>
- Xu, J., Yang, J.-Y., Niu, Q.-W., & Chua, N.-H. (2006). Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *The Plant Cell*, 18(December), 3386–3398. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047605>
- Xu, J., Yang, J.-Y., Niu, Q.-W., & Chua, N.-H. (2007). Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE Form a Decapping Complex Required for Postembryonic Development. *The Plant Cell*, 18(12), 3386–3398. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047605>
- Xu, Y., Ma, P., Shah, P., Rokas, A., Liu, Y., & Johnson, C. H. (2013). Non-optimal codon usage is a mechanism to achieve circadian clock conditionality. *Nature*, 495(7439), 116–120. <https://doi.org/10.1038/nature11942>
- Yakir, E., Hilman, D., Hassidim, M., & Green, R. M. (2007). CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 Transcript Stability and the Entrainment of the Circadian Clock in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 145(3), 925–932. <https://doi.org/10.1104/pp.107.103812>
- Yan, X., Hoek, T. A., Vale, R. D., & Tanenbaum, M. E. (2016). Dynamics of Translation of Single mRNA Molecules In Vivo. *Cell*, 165(4), 976–989. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.034>
- Yang, Y., Li, Y., Sancar, A., & Oztas, O. (2020). The circadian clock shapes the Arabidopsis transcriptome by regulating alternative splicing and alternative polyadenylation. *Journal of Biological Chemistry*, 295(22), 7608–7619. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013513>
- Young, M. W., & Kay, S. A. (2001). Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nature Reviews Genetics*, 2(9), 702–715. <https://doi.org/10.1038/35088576>
- Yu, C.-H., Dang, Y., Zhou, Z., Wu, C., Zhao, F., Sachs, M. S., & Liu, Y. (2015). Codon Usage Influences the Local Rate of Translation Elongation to Regulate Co-translational Protein Folding. *Molecular Cell*, 59(5), 744–754. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.018>
- Zeidan, Q., He, F., Zhang, F., Zhang, H., Jacobson, A., & Hinnebusch, A. G. (2018). Conserved mRNA-granule component Scd6 targets Dhh1 to repress translation initiation and activates Dcp2-mediated mRNA decay in vivo. *PLoS Genetics*, 14(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007806>
- Zhang, H., Kumimoto, R. W., Anver, S., & Harmer, S. L. (2023). XAP5 CIRCADIAN TIMEKEEPER regulates RNA splicing and the circadian clock by genetically separable pathways. *Plant Physiology*, 192(3), 2492–2506. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad193>
- Zhang, J., Jin, H., Chen, Y., Jiang, Y., Gu, L., Lin, G., Lin, C., & Wang, Q. (2024). The eukaryotic translation initiation factor eIF4E regulates flowering and circadian rhythm in Arabidopsis. *Plant Journal*. <https://doi.org/10.1111/tpj.16975>

- Zhang, L. L., Luo, A., Davis, S. J., & Liu, J. X. (2021). Timing to grow: roles of clock in thermomorphogenesis. In *Trends in Plant Science* (Vol. 26, Issue 12, pp. 1248–1257). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.07.020>
- Zhang, X., & Guo, H. (2017). mRNA decay in plants : both quantity and quality matter. *Current Opinion in Plant Biology*, 35, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.12.003>
- Zhang, X., Zhu, Y., Liu, X., Hong, X., Xu, Y., Zhu, P., Shen, Y., Wu, H., Ji, Y., Wen, X., Zhang, C., Zhao, Q., Wang, Y., Lu, J., & Guo, H. (2015). *Suppression of endogenous gene silencing by bidirectional cytoplasmic RNA decay in Arabidopsis*. 348(6230), 120–124.
- Zhou, M., Guo, J., Cha, J., Chae, M., Chen, S., Barral, J. M., Sachs, M. S., & Liu, Y. (2013). Non-optimal codon usage affects expression, structure and function of clock protein FRQ. *Nature*, 494(7439), 111–115. <https://doi.org/10.1038/nature11833>
- Zhou, Z., Dang, Y., Zhou, M., Li, L., Yu, C., Fu, J., Chen, S., & Liu, Y. (2016). Codon usage is an important determinant of gene expression levels largely through its effects on transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(41). <https://doi.org/10.1073/pnas.1606724113>
- Zhu, J. Y., Oh, E., Wang, T., & Wang, Z. Y. (2016). TOC1-PIF4 interaction mediates the circadian gating of thermoresponsive growth in Arabidopsis. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13692>
- Zhu, S., Ye, W., Ye, L., Fu, H., Ye, C., Xiao, X., Ji, Y., Lin, W., Ji, G., & Wu, X. (2020). PlantAPAdb: A comprehensive database for alternative polyadenylation sites in plants. *Plant Physiology*, 182(1), 228–242. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00943>

Anexo I: Tablas Suplementarias

AGI	Nombre del gen	Amplitud relativa
AT1G01060	LHY	167.3
AT2G46830	CCA1	144
AT5G06980	LNK4	86.4
AT3G26740	CCL	85.1
AT3G20810	JMJD5	81.2
AT3G09600	RVE8	66
AT3G12320	LNK3	61
AT5G02810	PRR7	56.3
AT3G54500	LNK2	54.6
AT1G68050	FKF1	54.2
AT5G60100	PRR3	38.4
AT5G37260	RVE2	36
AT1G22770	GI	34.2
AT5G64170	LNK1	33.9
AT2G46790	PRR9	29.9
AT2G21660	CCR2	27.4
AT5G17300	RVE1	25.9
AT3G07650	COL9	22.9
AT3G48360	BT2	21
AT5G24470	PRR5	20.9
AT5G15850	COL1	17.1
AT5G59570	BOA	14.9
AT2G21320	BBX18	13.7
AT1G18330	EPR1	11.8
AT2G42540	COR15A	10.9
AT5G64940	ATH13	8.8
AT3G46640	LUX	8.7
AT5G61380	TOC1	8.4
AT5G52310	LTI78	7.9
AT3G01060	AT3G01060	7.3
AT5G12050	BG1	6.9
AT4G38960	BBX19	6.5
AT3G21890	BBX31	6
AT2G17840	ERD7	5.3
AT4G15248	BBX30	4.2
AT2G25930	ELF3	4
AT2G47890	BBX11	3.3
AT2G18170	MPK7	3.3
AT3G57040	ARR9	3
AT4G26150	CGA1	2.9

AT3G14620	CYP72A8	2.8
AT4G09970	AT4G09970	2.8
AT2G41310	RR3	2.5
AT3G06500	A/N-InvC	2.3
AT3G04910	WNK1	2.2
AT5G02840	LCL1	1.9
AT5G54160	OMT1	1.7
AT4G30350	SMXL2	1.7
AT1G15950	CCR1	1.6
AT3G48100	RR5	1.6
AT3G19720	ARC5	1.6
AT5G56860	GNC	1.5
AT1G04400	CRY2	1.5
AT5G02120	OHP1	1.4
AT3G46780	PTAC16	1.4
AT3G58850	PAR2	1.4
AT1G09340	AT1G09340	1.4
AT2G16365	PCH1	1.3
AT3G51550	FER	1.3
AT4G02630	AT4G02630	1.3
AT4G32890	GATA9	1.2
AT3G56480	SCAB3	1.2
AT3G61070	PEX11E	1.2
AT3G55960	AT3G55960	1.1
AT4G00150	HAM3	1.1
AT4G37930	SHM1	1.1
AT4G13930	SHM4	1.1
AT3G45780	PHOT1	1.1
AT1G27450	APT1	1.1
AT5G24930	COL4	1
AT3G06080	TBL10	1
AT4G08920	CRY1	1
AT1G68830	STN7	1
AT4G36240	GATA7	0.9
AT4G18020	APRR2	0.8
AT5G58140	PHOT2	0.7
AT5G51200	EMB3142	0.7
AT3G63140	CSP41A	0.7
AT2G18790	PHYB	0.7
AT4G34680	GATA3	0.7
AT4G28610	PHR1	0.7
AT4G26700	FIM1	0.7
AT2G47700	RFI2	0.6
AT4G03390	SRF3	0.6
AT1G35460	FBH1	0.6
AT1G10470	ARR4	0.6

AT4G24470	ZIM	0.5
AT4G04970	GSL1	0.5
AT3G50000	CKA2	0.4
AT5G64813	LIP1	0.4
AT3G24050	GATA1	0.4
AT2G23080	CKA3	0.4
AT5G67380	CKA1	0.3
AT4G20400	JMJ14	-
AT5G63440	CSU4	-
AT2G37000	AT2G37000	-
AT5G05660	NFXL2	-
AT4G30200	VEL1	-
AT1G72390	PHL	-
AT1G69690	TCP15	-
AT3G54810	BME3	-
AT1G32070	NSI	-
AT1G80820	CCR2	-
AT4G25100	FSD1	-
AT4G24500	SIC	-
AT4G04920	SFR6	-
AT4G15180	SDG2	-
AT5G15840	CO	-
AT1G59940	AT1G59940	-
AT5G25830	GATA12	-
AT4G18290	AT4G18290	-
AT5G59560	SRR1	-
AT4G35160	ASMT	-
AT2G21070	FIO1	-
AT4G36930	SPT	-
AT5G57360	ZTL	-
AT3G12700	NANA	-
AT2G44680	CKB4	-
AT3G22231	PCC1	-
AT3G22170	FHY3	-
AT3G58390	PEL2	-
AT4G27650	PEL1	-

Tabla Suplementaria 1. Amplitud relativa de genes de la categoría ontogénica *Ritmos Circadianos* calculadas por Romanowski et al. (2020).

AGI	Nombre del gen	Se una a DCP5		Fase (h)
		CT12	CT24	
AT4G31120	PRMT5	NO	NO	0
AT3G09600	RVE8	NO	SI	0
AT1G01520	RVE3	NO	SI	0
AT1G01060	LHY	NO	SI	0
AT5G02840	RVE4	SI	SI	2
AT2G46830	CCA1	NO	SI	2
AT5G61270	PIF7	NO	SI	2
AT5G06980	LINK4	NO	SI	4
AT3G54500	LNK2	NO	SI	4
AT3G12320	LINK3	NO	SI	4
AT5G64170	LNK1	NO	SI	6
AT5G08330	CHE	SI	SI	6
AT2G46790	PRR9	NO	NO	6
AT5G02810	PRR7	NO	NO	8
AT2G43010	PIF4	NO	NO	8
AT3G26640	LWD2	NO	SI	10
AT1G22770	GI	SI	NO	10
AT1G12910	LWD1	SI	SI	10
AT3G46640	LUX	SI	SI	12
AT1G68050	FKF1	SI	NO	12
AT5G61380	TOC1	SI	NO	14
AT5G60100	APRR3	NO	NO	14
AT5G27720	LSM4	SI	SI	14
AT5G24470	PRR5	SI	NO	14
AT2G40080	ELF4	SI	SI	14
AT3G20810	JMJD5	SI	NO	16
AT2G25930	ELF3	SI	NO	16
AT4G01280	RVE5	NO	SI	22
AT1G10470	ARR4	SI	SI	22
AT2G18790	PHYB	SI	SI	22
AT5G59560	SRR1	NO	SI	NO TCR
AT5G57360	ZTL	SI	SI	NO TCR
AT5G52660	RVE6	NO	SI	NO TCR
AT5G48870	LSM5	SI	SI	NO TCR
AT4G19690	IRT1	NO	NO	NO TCR
AT3G60250	CKB3	SI	SI	NO TCR
AT3G22380	TIC	SI	SI	NO TCR
AT3G14080	LSM1B	NO	SI	NO TCR
AT2G44680	CKB4	SI	SI	NO TCR
AT2G39810	HOS1	NO	NO	NO TCR
AT2G31870	TEJ	NO	NO	NO TCR
AT2G28160	FIT	NO	NO	NO TCR

AT2G21150	XCT	NO	SI	NO TCR
AT2G21070	FIONA	NO	NO	NO TCR
AT2G18915	LKP2	NO	SI	NO TCR
AT1g77180	SKIP	SI	SI	NO TCR
AT1G59940	ARR3	NO	NO	NO TCR
AT1G54380	GEMIN2	NO	NO	NO TCR
AT1G19120	LSM1A	SI	SI	NO TCR
AT1G17070	STIPL1	NO	NO	NO TCR
AT1G26110	DCP5	SI	SI	NO TCR

Tabla Suplementaria 2. Genes del oscilador central o con fenotipo alterado de ritmos circadianos que se unen a o no a DCP5 según datos de iCLIP. Los datos de fase corresponden al momento del día en que se da el pico máximo de expresión y fueron estimados por Romanowski *et al.* (2020).

Gen ID	Gen	wt_12_22	dcp5_12_22	rdr6_12_22
AT2G27400	TAS1a	3528	1606	6
AT1G50055	TAS1b	286	199	2
AT2G39675	TAS1c	2007	775	2
AT2G39681	TAS2	1011	767	2
AT3G17185	TAS3a	525	293	4
AT5G49615	TAS3b	89	55	0
AT5G57735	TAS3c	40	17	2
AT3G25795	TAS4	2	0	0
Total alineadas(21-22nt)		2,658,918.00	2,659,426.00	2,651,698.00

Gen ID	Gen	wt_24_22	dcp5_24_22	rdr6_24_22
AT2G27400	TAS1a	3200	2647	83
AT1G50055	TAS1b	340	301	7
AT2G39675	TAS1c	1637	1248	53
AT2G39681	TAS2	1338	1226	30
AT3G17185	TAS3a	452	481	11
AT5G49615	TAS3b	87	95	2
AT5G57735	TAS3c	49	25	1
AT3G25795	TAS4	0	0	0
Total alineadas (21-22nt)		1,396,880.00	2,221,252.00	2,270,926.00

Tabla Suplementaria 3. Cantidad de lecturas de 21 y 22nt mapeadas en total y a cada uno de los genes *TAS* en las distintas muestras de la secuenciación masiva de ARN pequeños.

Anexo II: Figuras suplementarias

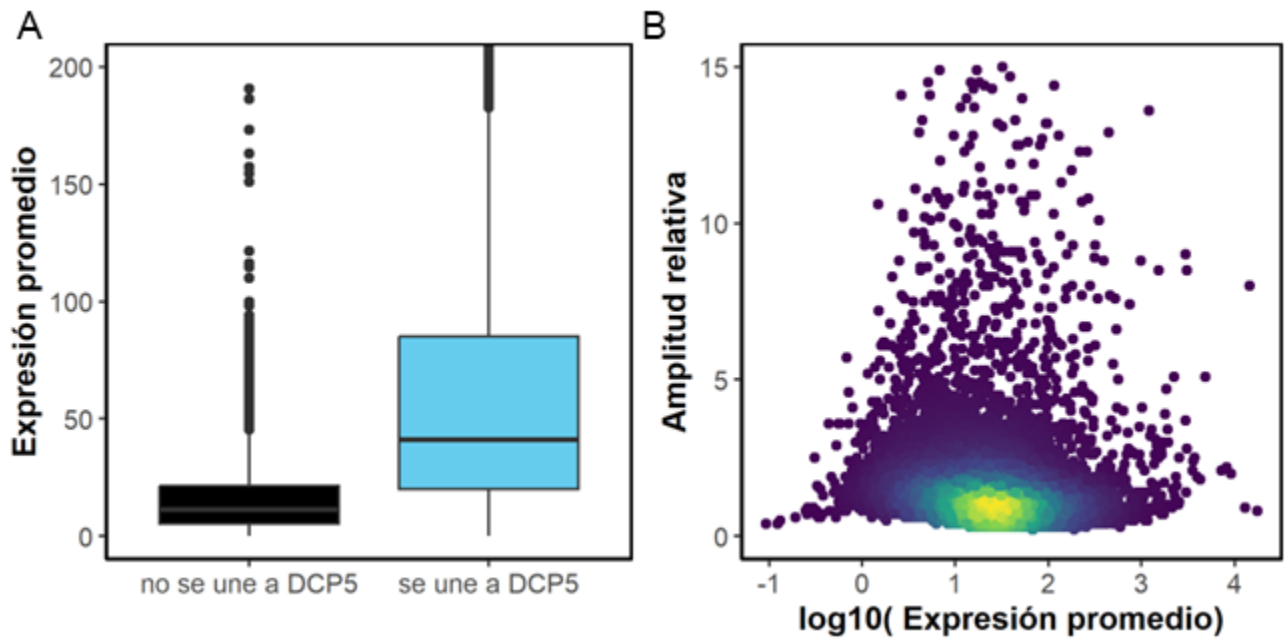


Figura Suplementaria 1. **La técnica de iCLIP no tiene un sesgo hacia genes de alta amplitud.** (A) Expresión promedio de TCR blanco y no blancos de DCP5. (B) Relación entre amplitud relativa y expresión promedio. Los valores de expresión se tomaron de Romanowski et al. (2020).

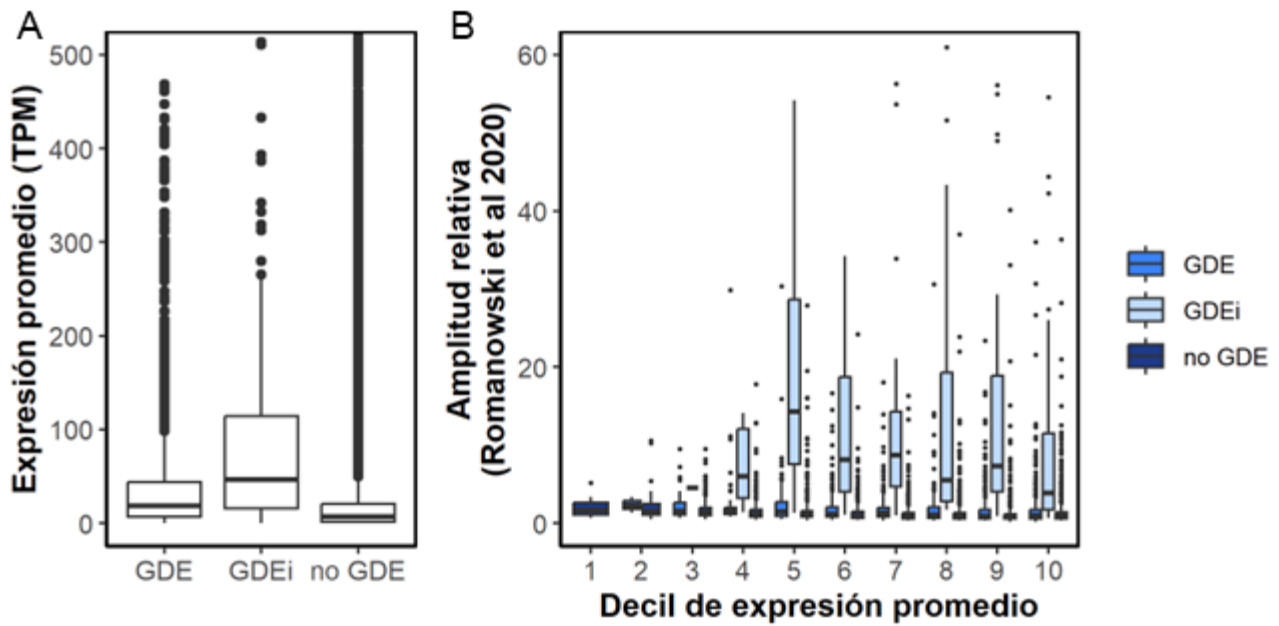


Figura Suplementaria 2. **DCP5 es necesaria para regular genes de alta expresión.** (A) Box-plot mostrando la distribución de la expresión promedio (TPM) de los genes diferencialmente expresados (GDE) en *dcp5*, GDE con interacción significativa entre tiempo y genotipo (GDEi), y el transcriptoma no diferencialmente expresado (no GDE). (B) Box-plots mostrando la distribución de amplitudes relativas estimadas por Romanowski et al. (2020) por decil de amplitud según GDE, GDEi y no GDE.

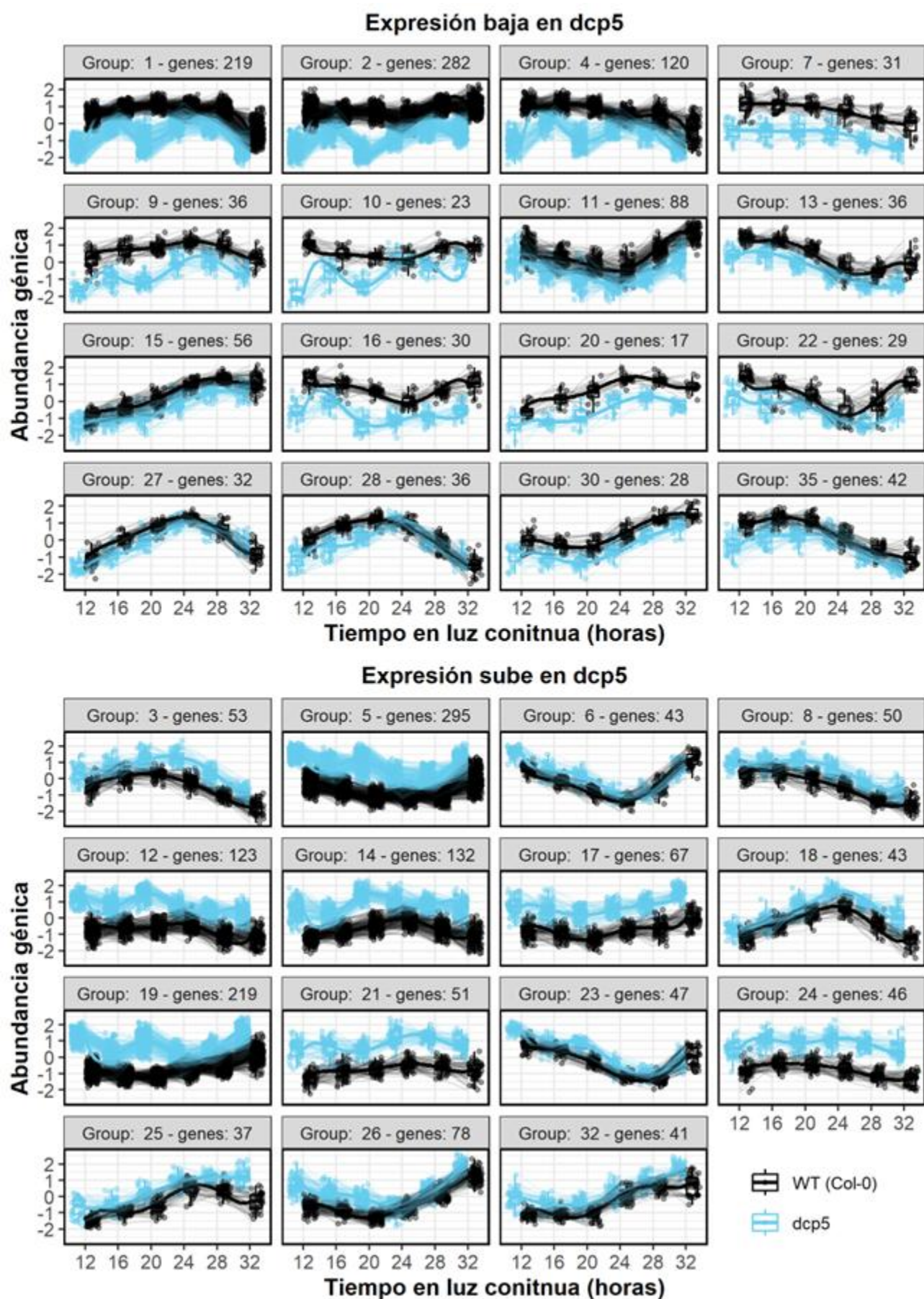


Figura Suplementaria 3. **Patrones de expresión de genes diferencialmente expresados en *dcp5***. Los clústeres fueron generados con el algoritmo de agrupamiento jerárquico de la herramienta bioinformática DEGrepot.

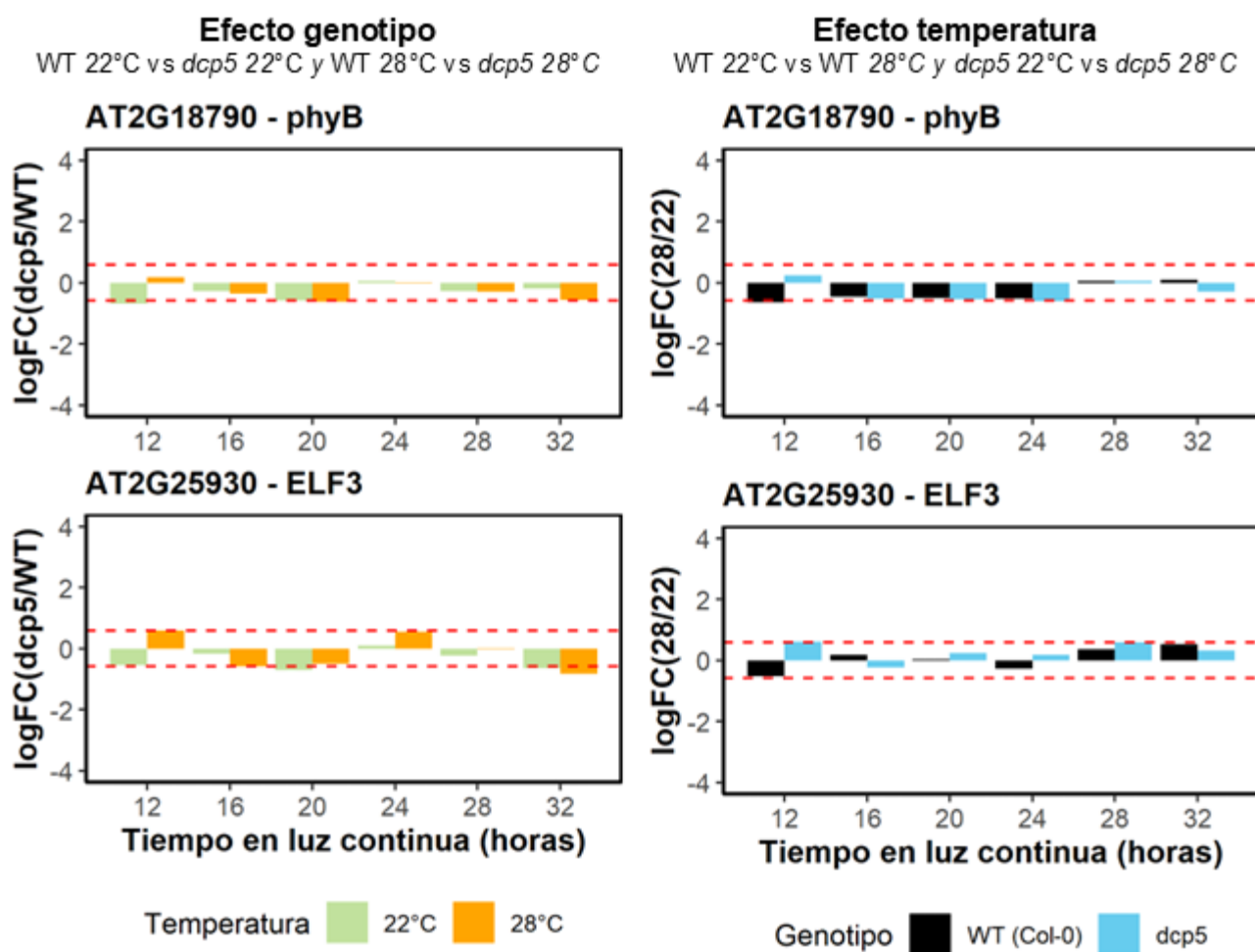


Figura Suplementaria 4. **La expresión de los termosensores no es regulada por DCP5.** Para cada gen se muestra (izquierda) el efecto del genotipo [$\log_2\text{FC}(\text{dcp5}/\text{WT})$] a 22 °C y 28 °C, y (derecha) el efecto de la temperatura [$\log_2\text{FC}(\text{dcp5}/\text{WT})$] en plantas silvestres y *dcp5*. Las líneas punteadas representan un $|\log(\text{FC})|$ de $\log_2(1.5)$.

*GTGTCG*CTGTGATTGTCAAGAGTTTGAACACACAAAGAAGAAAGAAGAACTCAA *CATTTC*AGCAAGAA *GAAAGAG*AGAA
 GAGAGAAGGTCCAATAATAGAGAGAACAAAAAAG *AGAGCTTAATTGTCAGTTTATTCTCT*GCAAACGTGCGGCCTAAG
 TAACACATGTGCAATTATG *GAGTTAA*AGAGCTCACATGGGAAAAATGGGCAACTAACCGTTTCATGGTCTAGGCGACGAAGTA
 GAACCAACCACCTCGAATAACCCTATTTGGACTCAAAGTCTCAACGGTTGTGAGACTTTGGAGTCTGTGGTTCATCAAGCG
 GCTCTACAGCAGCCAAGCAAGTTTCAGCTGCAGAGTCCGAATGGTCCAAACCACAATTATGAGAGCAAGGATGGATCTTGT
 TCAAGAAAACGCGTTATCCTCAAGAAATGGACCGATGGTTCGCTGTTCAAGAGGAGAGCCATAGAGTTGGCCACAGCGTC
 ACTGCAAGTGCGAGTGGTACCAATATGTCTTGGCGTCTTTTGAATCCGGTCGGAGCTTGAAGACAGCTAGAACCGGAGAC
 AGAGACTATTTCCGCTCTGGATCGGAACTCAAGATACTGAAGGAGATGAACAAGAGACAAGAGGAGAAGCAGGTAGATCT
 AATGGACGACGGGGACGAGCAGCAGCGATTACAACGAGTCCGAAAGGAGACGGCGTGATAGGATAAACCAGAGGATGAGA
 ACACTTCAGAAGCTGCTTCCTACTGCAAGTAAGGCGGATAAAGTCTCAATCTTGGATGATGTTATCGAACACTTGAAACAG
 CTACAAGCACAAGTACAGTTCATGAGCCTAAGAGCCAATTGCCACAACAAATGATGATTCCGCAACTACCTCCACCACAG
 TCAGTTCTCAGCATCCAACACCAACAACAACAACAGCAGCAGCAGCAACAACAGCAGCAACAGTTTCAGATG
 TCGTTGCTTGCAACAATGGCAAGAATGGGAATGGGAGGTGGTGGAAATGGTTATGGAGGTTTAGTTCCTCCTCCTCCTCCT
 CCACCAATGATGGTCCCTCCTATGGGTAACAGAGACTGCACCAACGGTCTTCAGCCACATTATCTGATCCATACAGCGCC
 TTTTTCGCACAGACAATGAATATGGATCTCTACAATAAAATGGCAGCAGCTATCTATAGACAACAGTCTGATCAACAACA
 AAGGTAAATATCGGCATGCCTTCAAGTTCTTCGAATCATGAGAAAAGAGATTAGTCTAGCGACCTAGTATTATTGATCCAT
 ATATATAGTTCTTGAAAGATTGTTGTATCATGATTGTAAAACTGTTTTGAGTATGGAAAAGACTTGACAG

Figura Suplementaria 5. DCP5 se une a *PIF7* en su 5'UTR. En letra itálica en rojo se muestran los sitios de unión de DCP5 a *PIF7* y en letra subrayada en rojo se muestra la región de la 5'UTR que forma un bucle que regula la traducción de *PIF7*. En verde se muestra la 5'UTR, en azul la región codificante, y en violeta la 3'UTR. Los distintos exones se muestran con distintos tonos del mismo color.

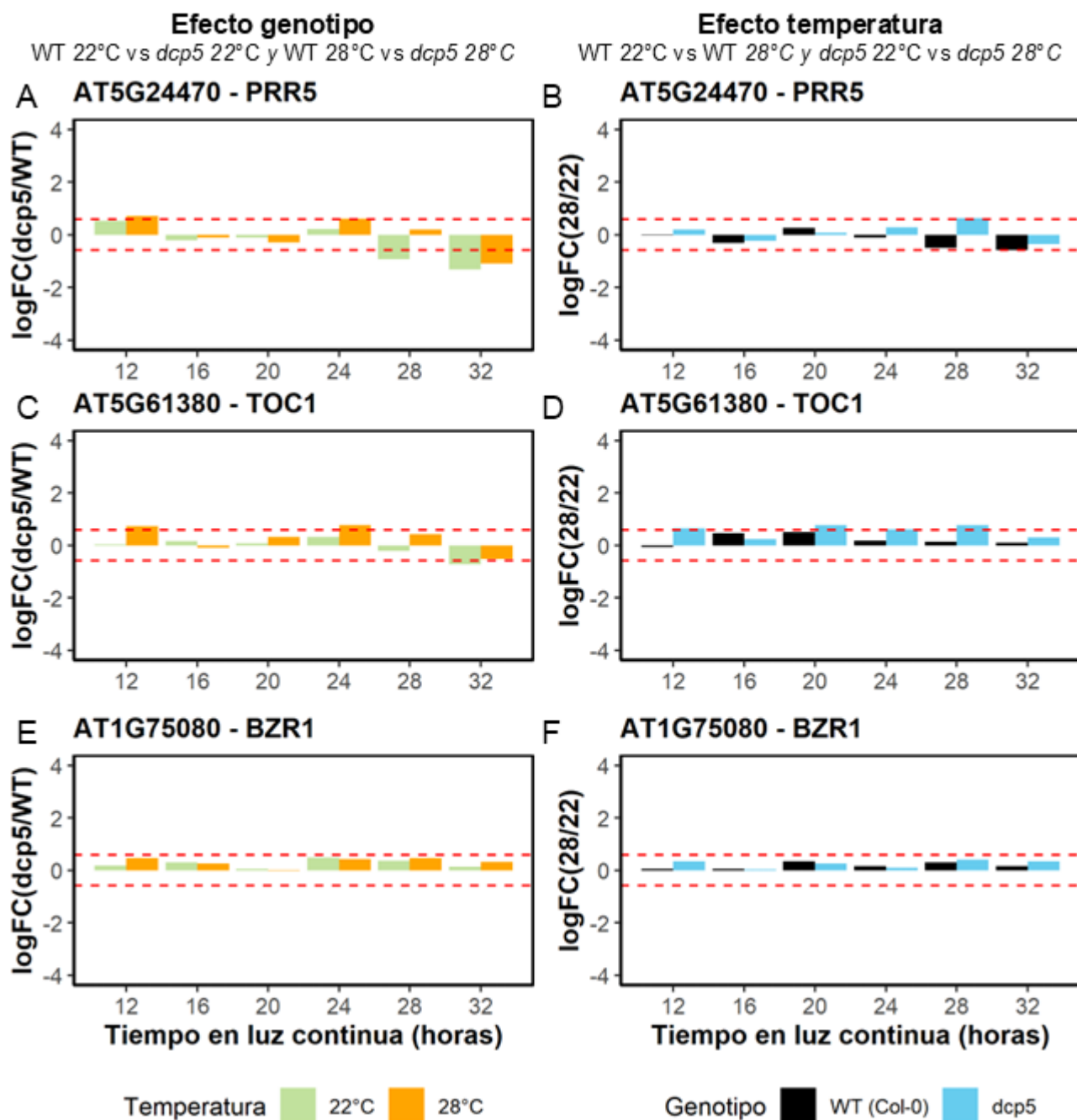


Figura Suplementaria 6. **La expresión de los reguladores de la termomorfogénesis *PRR5*, *TOC1* y *BZR1* está alterada en la mutante *dcp5*.** Para cada gen se muestra (A, C, E) el efecto del genotipo [$\log_2\text{FC}(\textit{dcp5}/\textit{WT})$] a 22 °C y 28 °C, y (B, D, F) el efecto de la temperatura [$\log_2\text{FC}(\textit{dcp5}/\textit{WT})$] en plantas silvestres y *dcp5*. Las líneas punteadas representan un $|\log(\text{FC})|$ de $\log_2(1.5)$.