

UCH-FC
DOC-BMCM
#385
C.1

**ROL DE CRIPTOCROMO 3 (CRY3) EN EL
SISTEMA CIRCADIANO DE PEZ CEBRA (*Danio
rerio*)**

Tesis

Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De

Doctor en Ciencias con Mención en Biología
Molecular, Celular y Neurociencias

Facultad De Ciencias

Por

VERONICA PATRICIA FERRER PRAT



Marzo, 2008

Director de Tesis: Dr. David Whitmore

Co-Director de Tesis: Dr. Miguel Allende

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

VERONICA PATRICIA FERRER PRAT

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 28 de Enero de 2008.

Director de Tesis:

Dr. David Whitmore

D. Whitmore

Co-Director de Tesis:

Dr. Miguel Allende

Miguel Allende

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Jimena Sierralta (Presidente)

Jimena Sierralta

Dr. Alvaro Glavic

Alvaro Glavic

Dr. Adrián Ocampo

Adrián Ocampo



*Dedico esta Tesis a Olga,
mujer auténtica y multifacética,
de mucho esfuerzo y coraje,
mi gran fuente de inspiración y guía
...contigo por siempre.*

AGRADECIMIENTOS



Agradezco a todos quienes contribuyeron directa e indirectamente a darle forma a mi vida y a este trabajo durante los últimos cuatro años.

En primer lugar a mi tutor, David Whitmore, por brindarme la gran oportunidad de trabajar en su laboratorio. Gracias a la exquisita mezcla de su sentido del humor inglés, su rigurosidad y destreza en el terreno de las ideas y a su disponibilidad a toda prueba, lo considero mi guía y por sobretodo un gran amigo.

A Miguel Allende, por su apoyo incondicional, su confianza en mí y su mirada siempre crítica.

A mis compañeros de laboratorio: Kathy, Lucy, Cristophe, Jessica, Águeda, Pete, Katherine y Conrad por todo el apoyo y afecto que he recibido durante mi estadía en el lab.

Agradezco especialmente a Rodrigo y Victoria, por todo el amor y alegría que me regalan a diario. Ustedes son mi "cargador de batería" y mi "muralla de contención" en los momentos de fatiga y desilusión.

A mis padres y hermanos, por todo el cariño y apoyo que me han dado desde la distancia.

Por último, no por ello menos importante, a la beca de Doctorado CONICYT, por el apoyo financiero.

INDICE DE MATERIAS



Título	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice de Materias	iv
Lista de Tablas	ix
Lista de Figuras	ix
Abreviaturas y Nomenclatura	xii
Resumen	xv
Abstract	xvii
Introducción	1
1 Mecanismos de ritmicidad circadiana	1
1.1 Vías de entrada	2
1.1.1 Fotorrecepción circadiana en <i>Drosophila</i>	4
1.1.2 Fotorrecepción circadiana en mamíferos	6
1.2 Oscilador central	8
1.2.1 Organización molecular del reloj circadiano de <i>Drosophila</i>	9
1.2.2 Organización molecular del reloj circadiano de mamíferos	11
1.3 Vías de salida	12
1.3.1 Vías de salida en <i>Drosophila</i>	12
1.3.2 Vías de salida en mamíferos	13

2	Criptocromos y Reloj Circadiano	15
2.1	Criptocromo de <i>Drosophila</i>	16
2.2	Criptocromos de mamíferos	18
3	Pez cebra como modelo para el estudio de ritmos circadianos	20
3.1	Organización molecular del reloj circadiano de pez cebra	21
3.2	Criptocromos de Pez cebra	24
4	Objetivos del Proyecto y aproximaciones experimentales	26
	 Hipótesis y Objetivos	 30
	 Materiales y Métodos	 31
	Materiales	31
1	Material biológico	31
1.1	Embriones de Pez cebra	31
1.2	Líneas celulares de Pez cebra	31
1.2.1	PAC2	31
1.2.2	Per1-luciferasa	32
1.2.3	Cry1a-luciferasa	33
1.2.4	Cry3-luciferasa	33
2	Lista de oligonucleótidos	34
3	Morfolinos	35
4	Anticuerpos	35
	Métodos	36
1	Ensayos de protección de Rnasa	36
2	Hibridación <i>in situ</i>	36
3	Doble híbrido en levaduras	38

4 Ensayos de bioluminiscencia	39
5 Análisis de Cambios de Fase	40
6 Inmunocitoquímica	41
7 Western Blot	42
8 Transfección retroviral	42
9 Bloqueo transitorio de la traducción de Cry3 en embriones de Pez cebra	43
10 Extracción de RNA, síntesis de cDNA y cuantifica- ción por RT-qPCR	45
11 Análisis estadístico	46
 Resultados	 47
1 Caracterización general de Cry3 de Pez cebra	47
1.1 Expresión de Cry3 en embriones de pez cebra	47
1.2 Expresión de Cry3 en células PAC2	51
1.3 Establecimiento de línea celular reportera de Cry3	53
1.3.1 Diseño del constructo reportero y transfección estable en células PAC2	53
1.3.2 Análisis <i>in vivo</i> de la expresión de Cry3	55
1.3.2.1 Ritmicidad bajo condiciones de oscuridad constante (DD)	56
1.3.2.2 Ritmicidad bajo condiciones de iluminación constante (LL)	57
1.3.2.3 Respuesta a pulsos de luz de variada intensidad	59
2 Participación de Cry3 en el mecanismo central del reloj circadiano de pez cebra	64
2.1 Interacción con proteínas centrales del reloj circadiano	64

2.2 Efecto de la sobreexpresión de Cry3 en líneas celulares reporteras	67
2.2.1 Sobreexpresión en células Perl-luciferasa	69
2.2.2 Sobreexpresión en células Cryla-luciferasa	69
2.3 Efecto del bloqueo transitorio de la traducción de Cry3 en la expresión relativa de genes controlados por el reloj	72
3 Rol de Cry3 en fotorrecepción circadiana	78
3.1 Efecto de la sobreexpresión de Cry3 en la respuesta de células Cryla-lucifera a pulsos de luz monocromática	79
3.2 Efecto del bloqueo transitorio de la traducción de Cry3 sobre la expresión relativa de genes inducidos por luz	82
 Discusión	 86
1 Ventajas que ofrece el Pez Cebra como modelo para el estudio del reloj circadiano	86
2 ¿Por qué estudiar <i>Cry3</i> ?	91
3 Patrones de expresión espacial y temporal de <i>Cry3</i> en embriones y líneas celulares de pez cebra	93
4 Posible rol de <i>Cry3</i> como componente central del reloj circadiano en células y tejidos periféricos de pez cebra	97
5 El bloqueo transitorio de la expresión de <i>Cry3</i> en embriones sugiere un alto grado de complejidad del sistema circadiano de pez cebra	101



6 Rol de <i>Cry3</i> en fotosensitividad circadiana	109
7 Perspectivas	111
Conclusiones	113
Bibliografía	115



LISTA DE TABLAS

Tabla 1: <i>Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de varianza para dos factores (2-way ANOVA) de los datos graficados en la Figura 27</i>	76
Tabla 2: <i>Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de varianza para dos factores (2-way ANOVA) de los datos graficados en la Figura 29</i>	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Representación esquemática de un sistema circadiano</i>	2
Figura 2: <i>Múltiples vías de entrada de la señal de luz en el sistema circadiano de Drosophila</i>	5
Figura 3: <i>Esquema del mecanismo de fotorrecepción en mamíferos</i>	8
Figura 4: <i>Mecanismo molecular del reloj circadiano en Drosophila</i>	10
Figura 5: <i>Mecanismo molecular del reloj circadiano en mamíferos</i>	11
Figura 6: <i>Representación esquemática de una proteína perteneciente a la familia DNA-fotoliasa/criptocromo</i>	16
Figura 7: <i>Arbol filogenético de la familia de proteínas DNA-fotoliasa/criptocromo</i>	19
Figura 8: <i>Representación esquemática del mecanismo molecular del reloj circadiano en Danio rerio</i>	23
Figura 9: <i>Criptocromos de pez cebra</i>	24

Figura 10: <i>Correlación entre inducción de Cryla y dimensión del cambio de fase de Perl en respuesta a pulsos de luz</i>	27
Figura 11: <i>Análisis de la expresión del mRNA de cry3 por hibridación in situ</i>	48
Figura 12: <i>Análisis de la expresión de Cry3 en embriones por ensayos de protección de RNasa</i>	50
Figura 13: <i>Oscilación de la expresión de Cry3 en células PAC2</i>	51
Figura 14: <i>Efecto de un pulso de luz en los niveles de expresión de Cry3 en células PAC2</i>	52
Figura 15: <i>Diseño del constructo reportero pGL3.5Kcry3</i>	54
Figura 16: <i>Ensayo de bioluminiscencia en células reporteras Cry3-luciferasa, previo a la selección clonal</i>	55
Figura 17: <i>Niveles de expresión de Cry3 bajo condiciones de oscuridad o iluminación constantes (DD versus LL)</i>	58
Figura 18: <i>Respuesta del reportero de Cry3 a pulsos de luz</i>	60
Figura 19: <i>Correlación entre cambios de fase e intensidad de luz</i>	61
Figura 20: <i>Cambios de fase de Cry3 en respuesta a pulsos de luz administrados a diferentes tiempos circadianos</i>	62
Figura 21: <i>Análisis de la interacción de Cry3 con las proteínas CLOCK1 y BMAL1</i>	65
Figura 22: <i>Análisis de la interacción de Cry3 con las proteínas PERs</i>	66
Figura 23: <i>Sobreexpresión de Cry3 en líneas celulares de pez cebra</i>	68
Figura 24: <i>Efecto de la sobreexpresión de Cry3 en células Perl-luciferasa</i>	70
Figura 25: <i>Efecto de la sobreexpresión de Cry3 en células Cryla-luciferasa</i>	71
Figura 26: <i>Bloqueo transitorio de la expresión de Cry3 en embriones de pez cebra</i>	73

Figura 27: <i>Patrón de expresión de genes regulados por el reloj en ausencia de Cry3</i>	75
Figura 28: <i>Efecto de la sobreexpresión de Cry3 en la respuesta de células Cry1a-luciferasa a pulsos de luz monocromática</i> ...	81
Figura 29: <i>Patrón de expresión de genes inducidos por luz en ausencia de Cry3</i>	83
Figura 30: <i>Control de bioluminiscencia con el reportero TOPflash</i>	89
Figura 31: <i>Representación esquemática del rol de Cry3 en el sistema circadiano de pez cebra</i>	100
Figura 32: <i>Representación esquemática de un modelo circadiano con múltiples ciclos de retroalimentación negativa</i>	106

ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA

Ritmo circadiano

Ritmo biológico que persiste bajo condiciones constantes con un período de aproximadamente 24 horas. Del latín "circa" y "diem", alrededor de un día.

Tiempo circadiano (CT)

Tiempo interno subjetivo de un organismo bajo condiciones constantes. Por convención, CT 12 corresponde al inicio de actividad para especies nocturnas, mientras que CT 0 designa el inicio de actividad para especies diurnas.

Entrenamiento

Proceso por el cual la fase de un oscilador biológico es ajustada a un estímulo medioambiental rítmico, como por ejemplo el ciclo de luz-oscuridad.

Zeitgeber

Término alemán que se traduce literalmente como "dador de tiempo" ó "time-giver" y que se refiere a una señal medioambiental capaz de entrenar un ritmo controlado por el reloj.

Zeitnehmer

Término alemán que se traduce literalmente como "usurpador de tiempo" ó "time-taker" y que se refiere a una vía de salida del reloj capaz de regular la vía de entrada de éste por

retroalimentación negativa. A menudo, la acción de la luz sobre el reloj es controlada por el mismo reloj. La regulación rítmica de una vía de entrada puede generar un estímulo de entrenamiento rítmico aún bajo condiciones constantes.

DD

Abreviatura usada convencionalmente para designar un régimen de oscuridad constante.

LD

Abreviatura usada convencionalmente para un régimen de iluminación compuesto por períodos alternados de luz y oscuridad.

LL

Abreviatura usada convencionalmente para designar un régimen de luz constante.

Oscilador

Sistema capaz de producir una fluctuación regular de una señal alrededor de una media. En biología circadiana, un oscilador se refiere a menudo al mecanismo molecular dentro de una célula capaz de generar un ritmo autosostenido con un período de aproximadamente 24 horas.

Marcapasos

Es la correlación anatómica de un oscilador, capaz de mantener su propia oscilación y de entrenar osciladores adicionales.

Oscilador periférico

Término que se refiere a un oscilador presente en tejidos que son capaces de regular ritmos circadianos a nivel local.

Caja E

Corresponde al motivo nucleotídico CACGTG, involucrado en la activación de la expresión de la mayoría de los genes controlados por el reloj.

Período

Intervalo regular de tiempo entre puntos de referencia de un ritmo regulado en forma directa o indirecta por el reloj circadiano.

Período "free-running"

Ritmo endógeno exhibido por un sistema circadiano bajo condiciones constantes.

Fase

Corresponde a un punto de referencia específico en el ciclo de un ritmo; por ejemplo, el inicio diario del sueño.

Cambio de fase

Cambio único y sostenido en la fase provocado por la acción de un *zeitgeber*.

Fotopigmento

Molécula capaz de transducir la absorbancia de un fotón en una respuesta intracelular.

RESUMEN

Los ritmos circadianos son ciclos de aproximadamente 24 horas que gobiernan los procesos bioquímicos, fisiológicos o de conducta de la mayoría de las plantas y animales. Estos ritmos son generados por relojes endógenos y pueden ser modulados por señales medioambientales.

Aún cuando la mayoría de los componentes del reloj circadiano están conservados entre los dos modelos animales más estudiados, *Drosophila* y mamíferos, los roles asignados a sus proteínas criptocromo (dCRY ó mCRY1 y 2, respectivamente) son muy diferentes: dCRY funciona como un fotorreceptor circadiano y mCRYs funcionan como represores de la transcripción mediada por los componentes centrales del reloj, CLOCK y BMAL1.

El objetivo central de este trabajo es el estudio de la función de Cry3 de pez cebra, modelo vertebrado que comparte con *Drosophila* la característica de poseer osciladores periféricos directamente entrenables por luz. Las diferentes líneas de evidencia aquí presentadas apoyan un rol de Cry3 como componente central del sistema circadiano de pez cebra, similar al de mCRYs, pero no

descartan un rol de esta proteína como fotorreceptor en tejidos periféricos.

ABSTRACT

Circadian rhythms are roughly 24-hour cycles that govern biochemical, physiological and behavioural processes of most animals and plants. These rhythms are generated by endogenous clocks and they can be modulated or set by environmental cues.

Although most circadian clock components are conserved between the most studied animal models, *Drosophila* and mammals, the roles assigned to their cryptochrome proteins (dCRY or mCRY1 and 2, respectively) are very different: dCRY functions as a circadian photoreceptor, whereas mCRY's are able to repress CLOCK/BMAL1-mediated transcription, and as such, represent core clock components.

The central aim of this work is to study the role of zebrafish Cry3. Even though zebrafish is a vertebrate model, it possesses a remarkable similarity with *Drosophila*: it has directly light-responsive peripheral oscillators. Several key pieces of data produced in this thesis support a role for Cry3 as a core component of the zebrafish circadian clock system, resembling mCRY's function, but do not discard a role of the protein as a photoreceptor in peripheral tissues.

INTRODUCCION

Los ritmos circadianos (del latín *circa diem*; alrededor de un día) corresponden a ciclos diarios en eventos bioquímicos, fisiológicos o de comportamiento que exhiben un período preciso y que persisten en ausencia de señales medioambientales. Estos ritmos son gobernados por relojes biológicos endógenos cuya fase y período son constantemente ajustados a los cambios diarios que ocurren en señales medioambientales, como los ciclos de luz/oscuridad (LD), la disponibilidad de nutrientes o los ciclos de temperatura, para mantener una perfecta sincronía con la rotación de la Tierra (Pittendrigh y Daan, 1974).

1 MECANISMOS DE RITMICIDAD CIRCADIANA

El sistema circadiano de todos los organismos puede dividirse en tres componentes básicos: (1) las *vías de entrada*, involucradas en la percepción y transmisión de señales medioambientales para sincronizar a (2) el *oscilador central* o *marcapasos*, el que, a su vez, genera y mantiene ritmicidad a través de (3) múltiples *vías de*

salida que conectan al oscilador con la fisiología y el metabolismo (Figura 1).

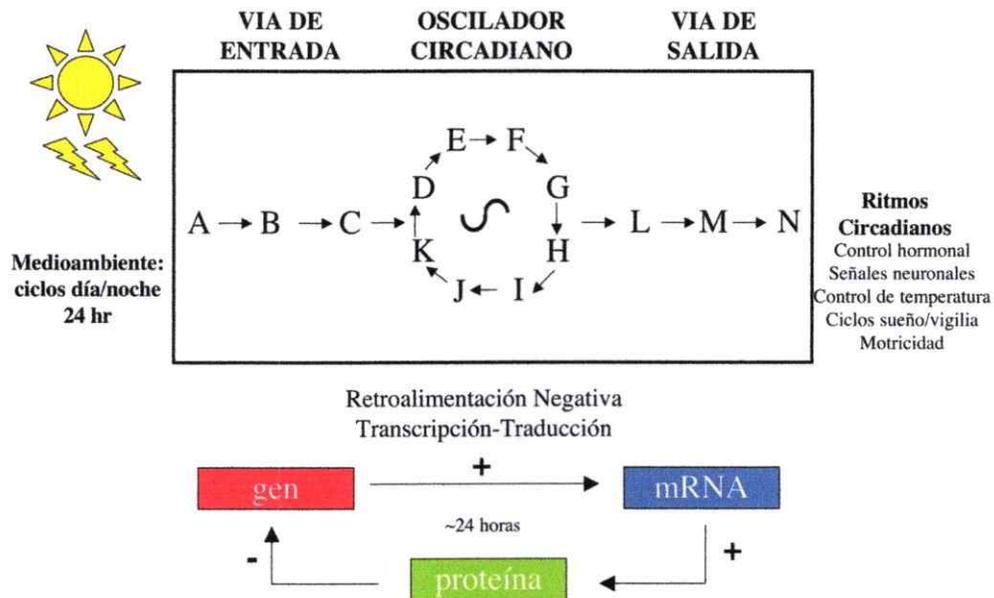


Figura 1. Representación esquemática de un sistema circadiano. Las señales medioambientales son transmitidas al oscilador circadiano a través de las vías de entrada. El marcapasos central controla las oscilaciones diarias en los diferentes aspectos de la fisiología a través de las vías de salida.

1.1 Vías de Entrada

Una propiedad fundamental de los relojes circadianos, es que su fase puede ser ajustada al ciclo LD local para mantenerse en sincronía con los cambios diarios en el fotoperíodo medioambiental (Roenneberg y Foster, 1997; Hall, 2000; Devlin y Kay, 2000). Aún cuando los cambios en

temperatura y otras señales medioambientales pueden afectar la fase, la amplitud y el período del ritmo, la luz es considerada la señal de entrenamiento o *Zeitgeber* (del alemán *zeit* = tiempo y *geber* = donador) predominante para la mayoría de las especies.

La intensidad de la luz, su composición espectral y la duración total de las diferentes condiciones de luz ambiente varían de forma predecible en función de la hora del día. Así, por ejemplo, la intensidad de luz al mediodía es alta en comparación a aquella que se registra al atardecer o amanecer; además, la luz ambiente está enriquecida para longitudes de onda en el rango azul durante las horas de transición y para los rangos verde y rojo a mediodía (Hall, 2000). Por lo tanto, es probable que existan varios mecanismos (incluyendo diferentes fotorreceptores) que contribuyan a la sincronización del comportamiento.

La mayoría de las plantas y animales han evolucionado hacia mecanismos circadianos de detección de luz y vías de señalización que transmiten la información a la maquinaria central del reloj circadiano. No obstante, en términos evolutivos, existen diferencias a nivel celular y sistémico

en los mecanismos descritos para los principales modelos circadianos animales: *Drosophila* y mamíferos.

1.1.1 Fotorrecepción circadiana en *Drosophila*

Análisis genéticos en *Drosophila* han mostrado la existencia de múltiples mecanismos de entrada de la señal de luz (Foster y Helfrich-Förster, 2001). Las células fotosensibles que transmiten la señal a las neuronas dorsales (DN) y laterales (LN), consideradas el oscilador central, están ampliamente distribuidas en el cerebro del insecto. Además, existen osciladores circadianos autónomos en tejidos periféricos (por ejemplo, alas, patas y antena) que son directamente entrenables por luz (Plautz y col., 1997) (Figura 2).

Naturaleza del fotopigmento circadiano en *Drosophila*

Las moscas que carecen de ojos compuestos o de alguno de sus componentes funcionales (ej. el mutante *norpa*, con pérdida de función de fosfolipasa C en los fotorreceptores externos – Pern y col., 1996) muestran una respuesta menos sensible que sus pares silvestres al entrenamiento a ciclos LD (Helfrich-Förster, 1997; Stanewsky y col., 1998; Yang y col., 1998), pero aún así son capaces de sincronizar

sus ritmos en respuesta a un pulso de luz (Wheeler y col., 1993; Yang y col., 1998).

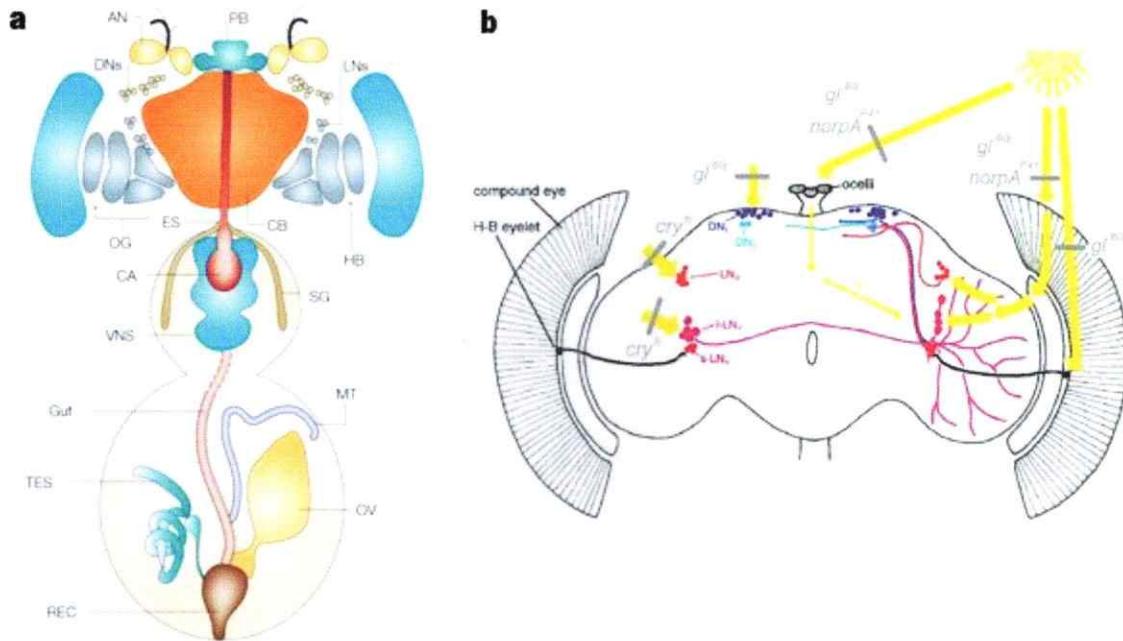


Figura 2. Múltiples vías de entrada de la señal de luz en el sistema circadiano de *Drosophila*. (a) En *D. melanogaster*, todos los tejidos indicados, excepto ovarios, contienen osciladores circadianos autónomos. Figura adaptada de (Bell-Pedersen y col., 2005) (b) Vista frontal del cerebro de una mosca adulta. El hemisferio derecho muestra las vías de entrada de luz a través de la retina y de estructuras extraretinales. En el hemisferio izquierdo, los fotorreceptores celulares involucrados en las vías de entrada hacia el grupo de neuronas que conforman el oscilador central. Figura adaptada de (Helfrich-Forster y col., 2001).

Por otra parte, el mutante *cry^b*, que presenta una mutación de sentido erróneo que afecta la unión de flavina

a la proteína criptocromo (dCRY), exhibe pérdida de sensibilidad a pulsos de luz de corta duración suministrados en oscuridad, sugiriendo con ello la pérdida de una entrada fotoreceptiva hacia el reloj (Stanewsky y col., 1998). Sin embargo, el mutante mantiene una respuesta parcial a ciclos LD, lo que indica una posible redundancia funcional entre dCry y opsinas en entrenamiento circadiano.

Sólo la generación de moscas mutantes dobles, *cry^b* y *gl^{60j}* (mutante *glass*; carente de todas las estructuras oculares fotoreceptivas externas y de la estructura H-B ubicada por debajo del ojo compuesto en el extremo distal del lóbulo óptico) , resulta en moscas que no son capaces de entrenar sus ritmos circadianos a ciclos LD externos (Helfrich-Forster y col., 2001)(Figura 2b).

1.1.2 Fotorrecepción circadiana en mamíferos

A diferencia de lo observado en *Drosophila*, en mamíferos toda la fotorrecepción ocurre a través de la retina (Van Gelder y Sancar, 2003) y es comunicada al reloj maestro, ubicado en el núcleo supraquiasmático (SCN) del hipotálamo, vía el tracto retino-hipotalámico (Johnson y col., 1988) (Figura 3). A la fecha, no existen datos reproducibles que indiquen entrenamiento directo por luz en

tejidos periféricos de mamíferos, salvo en retina (Tosini y Menaker, 1996).

Naturaleza del fotopigmento circadiano en mamíferos

Los primeros estudios en fotorrecepción sugerían la participación de un fotopigmento no visual en el entrenamiento circadiano, ya que ratones con degeneración en la retina externa, así como aquellos que carecían de los fotorreceptores visuales clásicos, aún podían entrenar sus ritmos normalmente (Ebihara y Tsuji, 1980).

Más tarde, después del descubrimiento y caracterización de los criptocromos de mamíferos (mCRYs), se propuso que estas proteínas podrían corresponder a tal fotopigmento (Hsu y col., 1996), pero la evidencia actual los ubica más bien en el centro de la maquinaria del reloj (Griffin y col., 1999; Kume y col., 1999; Sancar, 2004) (ver sección 1.2.2).

En los últimos años, melanopsina, una nueva opsina expresada por un subgrupo de células ganglionares de la retina que proyectan directamente al SCN, se ha transformado en el candidato más fuerte para el rol de fotorreceptor circadiano (Provencio y col., 1998; Hattar y col., 2003; Lucas y col., 2003; Panda y col., 2003).

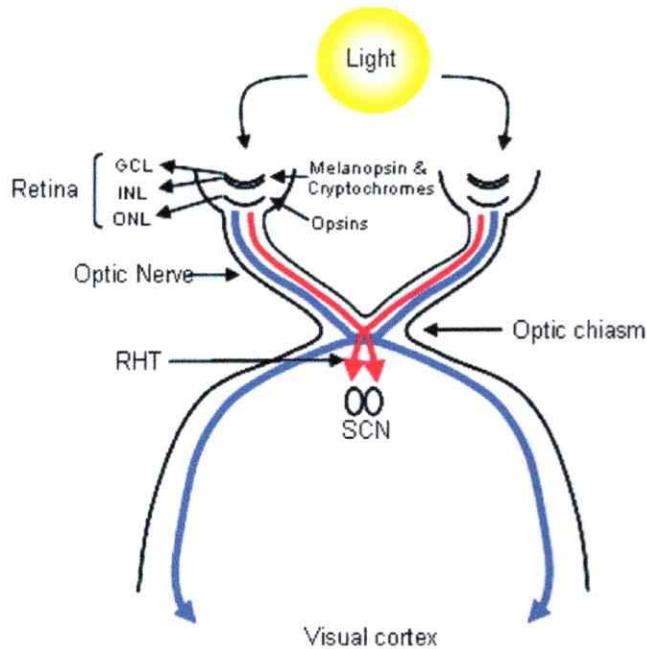


Figura 3. Esquema del mecanismo de foto-recepción en mamíferos. La señal de luz, recibida por opsinas en la retina externa y por criptocromos y melanopsina en la retina interna, es transmitida al reloj circadiano "maestro", el SCN, por un grupo especializado de células ganglionares de la retina que constituyen el tracto retino-hipotalámico (RHT). Figura adaptada de (Sancar, 2004).

1.2 Oscilador central

La mayor parte de nuestro entendimiento del mecanismo del reloj circadiano viene del uso de screenings genéticos en una variedad de sistemas, pero especialmente en *Drosophila* y ratón (Panda y col., 2002). El mecanismo molecular central del reloj circadiano está basado en ciclos de retroalimentación negativa, en los cuales factores reloj-específicos reprimen la transcripción de sus propios genes (Dunlap, 1999). Notoriamente, esta

característica del reloj ha sido conservada desde *Drosophila* hasta humanos.

Los genes que participan en el reloj central pueden clasificarse de acuerdo a la naturaleza molecular de sus productos. Así, existen diferentes categorías de genes: aquellos que activan la transcripción, aquellos que la reprimen, los que alteran la estabilidad o localización subcelular de proteínas y los que degradan proteínas.

1.2.1 Organización molecular del reloj circadiano de *Drosophila*

En *Drosophila*, los heterodímeros CLOCK/CYCLE se unen a cajas E (CACGTG) presentes en los promotores de genes regulados por el reloj (*Period* [*Per*], *Timeless* [*Tim*] y *Criptocromo* [*Cry*]) para activar su transcripción.

La proteína PER es fosforilada por las quinasas Doubletime [DBT] y Caseína quinasa 2 [CK2], lo que conduce a su rápida degradación. TIM se une y estabiliza a PER fosforilado, el cual se mantiene unido a DBT. La fosforilación de los complejos TIM-PER-DBT promueve su transporte hacia el núcleo. En el núcleo, los complejos se unen al heterodímero CLOCK/CYCLE e inhiben la transcripción.

En respuesta a la luz, la proteína CRY sufre una alteración conformacional en su dominio C-terminal que permite su unión a TIM. dCRY se une a TIM o a uno de sus complejos (citoplasmático o nuclear) y promueve la fosforilación de TIM por la tirosina quinasa SHAGGY [SGG]. Luego, TIM fosforilado es conducido rápidamente a degradación en el proteasoma. La estimulación prolongada por luz conduce a la eventual degradación de dCRY en el proteasoma (Figura 4).

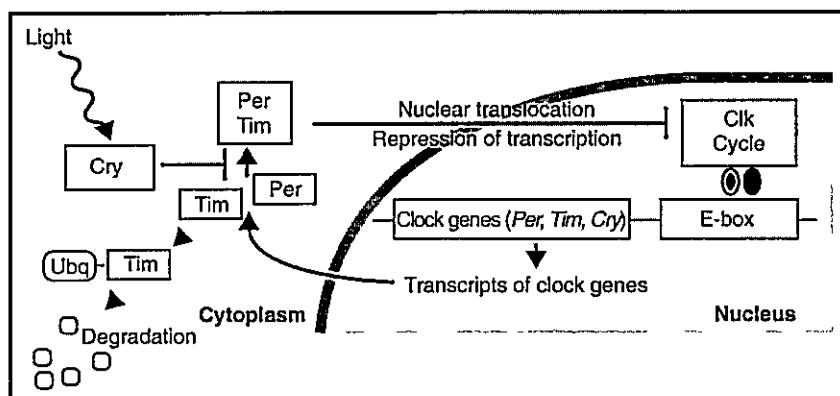


Figura 4. Mecanismo molecular del reloj circadiano en *Drosophila*. En moscas, el ciclo comienza con la activación de la transcripción de los genes *Per* y *Tim* mediada por la unión del heterodímero CLOCK/CYCLE a cajas E presentes en sus promotores. Luego de alcanzar una concentración crítica en el citoplasma, el heterodímero PER/TIM entra al núcleo y apaga su propia síntesis. La degradación de TIM es dependiente de luz y es mediada por CRY. Figura adaptada de (Lin y Todo, 2005).

1.2.2 Organización molecular del reloj circadiano de mamíferos

En la oscuridad, CLOCK y BMAL1 forman un heterodímero que se une a cajas E presentes en los promotores de genes blanco (*Period* [*Per*] y *Criptocromo* [*Cry*]) y activa su transcripción. Las proteínas CRY y PER, a su vez, forman heterodímeros en el citoplasma, se translocan al núcleo, e inhiben la transcripción activada por CLOCK/BMAL1.

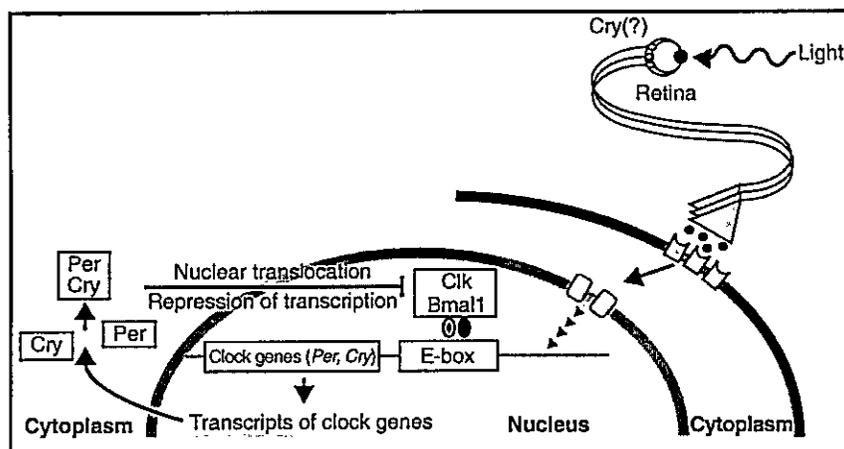


Figura 5. Mecanismo molecular del reloj circadiano en mamíferos. En mamíferos, el heterodímero CLOCK/BMAL1 activa la transcripción de *Per* y *Cry* por unión a cajas E presentes en sus promotores. CRY y PER forman un complejo que es translocado al núcleo e interfiere directamente con la transcripción mediada por CLOCK/BMAL1. A diferencia de lo observado en *Drosophila*, los CRYs de mamíferos son parte integral del loop de retroalimentación negativa. Figura adaptada de (Lin y Todo, 2005).

La señal de luz, recibida por opsinas en la retina externa y, presumiblemente, por CRYs y melanopsina en la retina interna, es transmitida al reloj circadiano "maestro", el SCN, por un grupo especializado de células ganglionares de la retina que constituyen el tracto retino-hipotalámico (Figura 5).

1.3 Vías de Salida

Para entender cómo los transcritos controlados por el reloj circadiano regulan procesos biológicos rítmicos, es importante determinar de qué manera el oscilador regula la variación cíclica de dichos transcritos e identificar los procesos fisiológicos, metabólicos y conductuales que éstos controlan.

1.3.1 Vías de salida en *Drosophila*

En moscas adultas se han identificado una variedad de procesos biológicos que exhiben ritmos circadianos. Entre ellos están: actividad locomotora, receptividad al apareamiento, oviposición y respuesta olfatoria (McCabe y Birley, 1998; Krishnan y col., 1999; Sakai y col. 2004).

En los últimos años, el uso de microarrays de alta densidad ha permitido llevar a cabo un estudio global de los genes controlados por el reloj circadiano en mosca. Así

por ejemplo, un análisis comparativo de muestras de RNA aislado de cabeza ó del cuerpo de *Drosophila* ha permitido establecer que, aún cuando el número de genes que ciclan en ambas muestras es similar, solo una pequeña proporción de genes ciclan en ambas estructuras (Ceriani y col., 2002). Estos datos indican que la mayoría de las vías de salida del oscilador son tejido-específicas y reflejan las distintas funciones de los diferentes órganos.

1.3.2 Vías de salida en mamíferos

El SCN está conectado a muchas regiones del cerebro a través de proyecciones neuronales directas e indirectas. Estas vías neuronales han sido señaladas como importantes vías de salida del reloj circadiano (Klein, 1991). Por ejemplo, proyecciones adrenérgicas a la glándula pineal controlan la síntesis diaria de melatonina. Esta hormona es producida exclusivamente durante la noche bajo el control de la liberación de noradrenalina y constituye el principal blanco endocrino regulado por el reloj circadiano (Korf y col., 1998).

Al igual que en *Drosophila*, el uso de microarrays de alta densidad ha permitido identificar numerosos genes que son expresados rítmicamente en mamíferos (Panda y col., 2002; Storch y col., 2002; Duffield, 2003). Alrededor de un

10% del transcriptoma muestra un ritmo circadiano en acumulación de mRNA en cualquiera de los tejidos estudiados; sin embargo, y similar a lo observado en *Drosophila*, menos del 1% de los genes que ciclan exhiben un patrón de expresión circadiano en múltiples tejidos. Futuros análisis de microarrays permitirán no sólo un estudio detallado de las diferentes vías de salida que son controladas por diversos osciladores tejido-específicos, sino además la identificación de señales que son específicas para el SCN y que le confieren su función de oscilador central.

2 CRIPTOCROMOS Y RELOJ CIRCADIANO

Los criptocromos (CRYs) son flavoproteínas que pertenecen a la familia DNA-fotoliasa/Criptocromo (Todo y col., 1996; Cashmore y col., 1999; Todo, 1999). Estas proteínas presentan un alto grado de homología (25-40%) en secuencia y estructura a la enzima (6-4) fotoliasa, no obstante, carecen de la capacidad de reparar DNA (Figura 6). Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y usan la energía de la luz en el rango UV-cercano/azul para regular una variedad de procesos de crecimiento y adaptación en diferentes organismos.

Los CRYs han sido clasificados en dos subfamilias, CRYs de animales y CRYs de plantas, que se distinguen claramente en el árbol filogenético por una divergencia en la secuencia aminoacídica primaria (Kobayashi y col., 2000; Hitomi y col., 2000; Brudler y col., 2003) (Figura 7). Los últimos están presentes en todas las diferentes especies de plantas y fueron identificados originalmente como fotorreceptores de luz azul, los cuales contribuyen a regular el crecimiento y el período de floración (Ahmad y Cashmore, 1993). Los miembros de la subfamilia animal, por su parte, se encuentran distribuidos desde insectos a vertebrados y están involucrados en ritmos circadianos

(Griffin y col., 1999; Kume y col., 1999; Rosato y col., 2001).

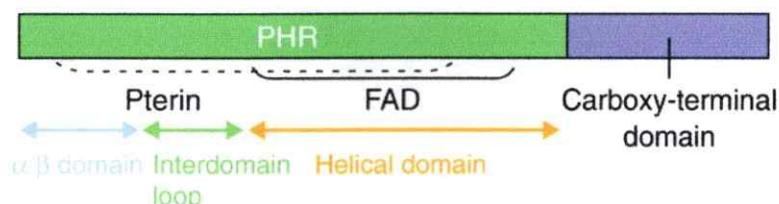


Figura 6. Representación esquemática de una proteína perteneciente a la familia DNA-fotoliasa/criptocromo. El extremo N-terminal es altamente conservado y corresponde a la región de homología con (6-4) fotoliasa (PHR). Se indican las regiones de unión a los cromóforos Pterin (ó MTHF) y FAD, y los diferentes dominios de la proteína. Figura adaptada de (Lin y Todo, 2005).

2.1 Criptocromo de *Drosophila*

dCry fue descubierto a través de un screening genético para mutantes del ritmo circadiano (Stanewsky y col., 1998). El reloj molecular de los mutantes con pérdida de función de dCry, denominados *cry^b*, parece funcionar normalmente, pero pierde sensibilidad a pulsos cortos de luz dados en oscuridad y tarda más tiempo en ajustarse a un nuevo ciclo LD. Estas moscas mantienen actividad rítmica normal bajo luz constante, una condición que causa arritmicidad en moscas silvestres (Stanewsky y col., 1998;

Emery y col., 2000). Por otra parte, la expresión dirigida de dCry silvestre en neuronas marcapasos de moscas mutantes rescata un gran porcentaje de la sensibilidad a la luz de los ritmos conductuales, sugiriendo que dCry es un fotorreceptor celular autónomo suficiente para la mayoría de los aspectos de la sensibilidad circadiana a la luz (Emery y col., 2000).

dCry entrena el reloj molecular de *Drosophila* a través de su interacción, dependiente de luz, con la proteína integral del reloj Timeless (TIM) (Ceriani y col., 1999; Rosato y col., 2001). La sincronización del reloj molecular con el ciclo de luz ocurre cuando dCRY induce la degradación rápida y dependiente de ubiquitinación de TIM (Hunter-Ensor y col., 1996; Naidoo y col., 1999; Lin y col., 2001), lo cual desestabiliza al represor transcripcional PER y permite que ocurra la transcripción mediada por el heterodímero CLOCK/CYCLE (Lee y col., 1999). dCRY también puede contribuir al entrenamiento del reloj regulando la localización subcelular de un complejo CRY/PER/TIM presumiblemente inactivo (Ceriani y col., 1999). Así, dCry funciona en el reloj circadiano de *Drosophila* como un fotopigmento celular autónomo, transmitiendo la información luminosa directamente hacia

los componentes centrales del reloj a través de interacciones proteína-proteína y de degradación proteica regulada por luz (Figura 4).

Además de su rol como fotorreceptor circadiano, dCry también presenta un rol independiente de luz, como represor transcripcional en los osciladores circadianos periféricos (Krishnan y col., 2001; Collins y col., 2006).

2.2 *Criptocromos de mamíferos*

Los criptocromos de mamíferos, mCry1 y mCry2, fueron originalmente identificados por homología de secuencia con criptocromos de otras especies (Hsu y col., 1996).

Los animales que carecen de mCry1 tienen períodos más cortos; los que carecen de mCry2 tienen períodos más largos y, aquellos que carecen de ambos, son arrítmicos bajo oscuridad constante (DD). No obstante, en animales mutantes dobles aún se observa una fotorespuesta circadiana, a juzgar por la conducta de entrenamiento observada bajo ciclos LD y por la inducción de la expresión génica en SCN en respuesta a pulsos de luz (Thresher y col., 1998; Vitaterna y col., 1999; Van der Horst y col., 1999).

La interacción física de mCRYs con otras proteínas del reloj circadiano (PER, CLOCK y BMAL1) afecta su actividad,

interacción, degradación o tráfico nuclear y, consecuentemente, altera la regulación transcripcional de genes regulados por el reloj. Dichas interacciones no son afectadas por luz (Griffin y col., 1999).

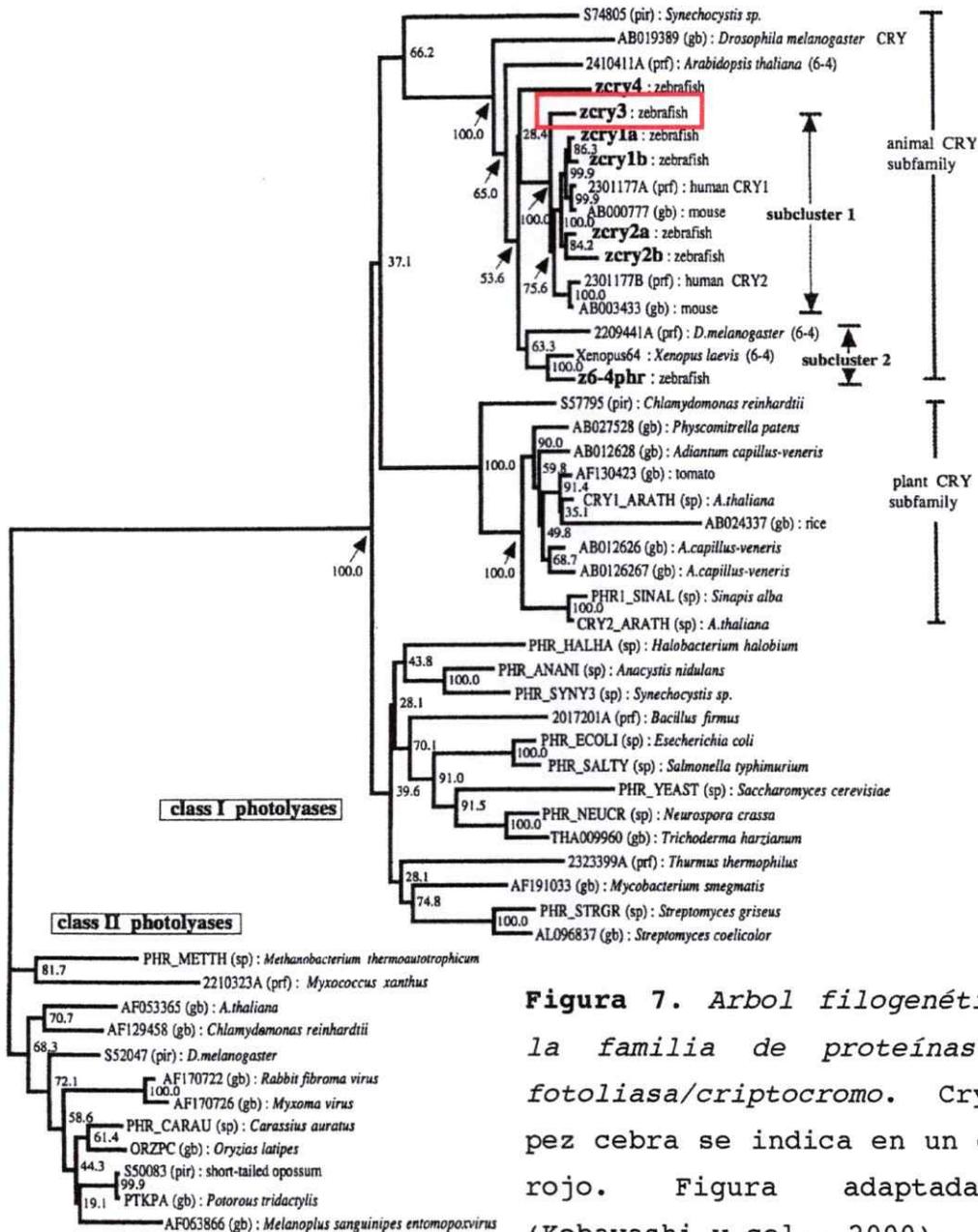


Figura 7. Arbol filogenético de la familia de proteínas DNA-fotoliasa/criptocromo. Cry3 de pez cebra se indica en un cuadro rojo. Figura adaptada de (Kobayashi y col., 2000).

3 PEZ CEBRA COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE RITMOS CIRCADIANOS

El pez cebra, *Danio rerio*, ofrece una amplia variedad de ventajas como sistema modelo para estudiar el reloj circadiano. El fácil acceso a estadios tempranos del desarrollo embrionario y la posibilidad de mutagenizar o de usar métodos transgénicos, lo convierten en un modelo vertebrado atractivo, tanto para el estudio del origen y función del reloj durante el desarrollo temprano, como para la identificación de genes que codifican componentes del reloj o factores que funcionan en las vías de entrada y de salida del reloj en vertebrados (Cahill, 2002).

El sistema circadiano de pez cebra está compuesto por relojes centrales y periféricos (Schibler y Sassone-Corsi, 2002). La glándula pineal y la retina han sido identificados como los marcapasos primarios que regulan su fisiología y comportamiento (Cahill, 1996), ambos tejidos son entrenables directamente por luz y controlan la síntesis rítmica de melatonina. Sin embargo, experimentos de explante y cultivo de órganos y tejidos han demostrado la presencia de osciladores circadianos periféricos en todos los tejidos y órganos del pez estudiados que, al igual que en *Drosophila*, pueden ser directamente entrenados

por luz (Cahill, 1996; Cermakian y col., 2000; Whitmore y col., 1998, 2000).

Paralelamente, se ha establecido el cultivo de líneas celulares embrionarias PAC2 y Z3, que mantienen la característica única de responder a luz y poseen un mecanismo circadiano intrínseco (Whitmore y col., 2000; Pando y col., 2001). Estas células, a diferencia de su contraparte en mamíferos, no requieren un pretratamiento hormonal o con suero para exhibir oscilaciones circadianas (Balsalobre y col., 1998) y sus propiedades de cultivo permiten el análisis de ritmos circadianos por períodos de tiempo prolongados.

3.1 Organización molecular del reloj circadiano de Pez Cebra

La caracterización de los componentes moleculares del sistema circadiano de pez cebra ha revelado duplicaciones para la mayoría de los genes del reloj. A la fecha, se han descrito tres homólogos de genes *clock* (Whitmore y col., 1998; Ishikawa y col., 2002), tres *bmal* (Cermakian y col., 2000; Ishikawa y col., 2002), tres *per* (Pando y col., 2001; Vallone y col., 2004) y seis genes *cry* (Kobayashi y col., 2000). El número de copias de estos genes es el resultado

de una duplicación genómica que ocurrió temprano durante la evolución del linaje teleosto (Postlethwait y col., 1998).

Similar al mecanismo molecular circadiano descrito en mamíferos, los heterodímeros CLOCK/BMAL proveen el potencial transcripcional central que maneja los relojes celulares autónomos de pez cebra. La unión de estos factores de transcripción a través de sus dominios Per-Arnt-Sim (PAS), activa la expresión de otros genes del reloj que codifican para represores transcripcionales, las proteínas PER y CRY. Estos represores interactúan directamente con CLOCK/BMAL e interfieren con la activación transcripcional, lo que conduce a una reducción de su propia expresión y cierra el ciclo de retroalimentación negativa (Figura 8).

Clock y *Bmal* exhiben oscilaciones rítmicas en su expresión génica que, en promedio, presentan un valor máximo durante la fase nocturna temprana. Ambos genes son expresados en la mayoría de los tejidos del pez, pero muestran diferencias en sus niveles y cinética de expresión. De manera similar, los perfiles de expresión, la inducción por luz y la regulación de los genes *per* y *cry* también son diferenciales (Kobayashi y col., 2000; Pando y col., 2001; Cermakian y col., 2002), indicando una alta

complejidad molecular del oscilador de pez cebra y sugiriendo una contribución diferencial de los distintos componentes en la regulación del reloj para los diferentes tejidos periféricos.

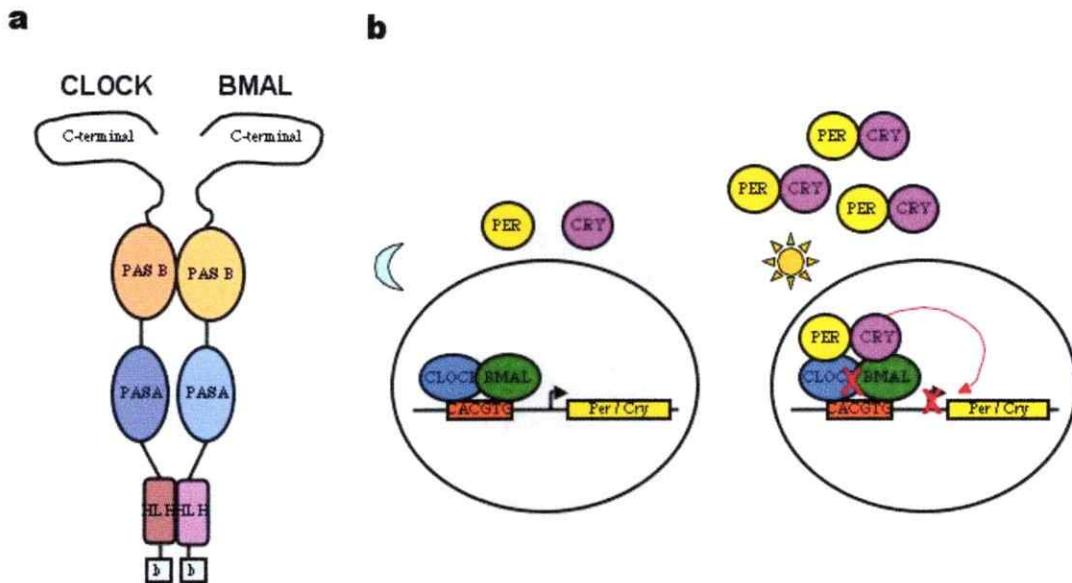


Figura 8. Representación esquemática del mecanismo molecular del reloj circadiano en *Danio rerio*. (a) Ensayos de doble híbrido en levaduras indican una interacción fuerte entre los dominios bHLH y PAS B de CLOCK y BMAL. Figura adaptada de (Tamai y col., 2007). (b) Durante la noche los heterodímeros CLOCK/BMAL activan la transcripción de *Per* y *Cry*. Más tarde, PER y CRY se translocan al núcleo y reprimen su propia transcripción (modelo simplificado).

A diferencia del resto de los genes *Per* y *Cry*, *Per2* y *Cryla* son inducidos por luz y se postula que ambas

moléculas podrían jugar roles importantes en el entrenamiento del reloj a ciclos LD (Cermakian y col., 2002; Hirayama y col., 2005; Tamai y col., 2007).

3.2 Criptocromos de Pez Cebra

El pez cebra expresa seis isoformas de criptocromos (Figura 9), cuatro de las cuales (Cry1a, Cry1b, Cry2a y Cry2b) son homólogas a los criptocromos de mamíferos y pueden actuar como represores de la transcripción mediada por el heterodímero CLOCK/BMAL. Los otros dos criptocromos, Cry3 y Cry4, han perdido la capacidad de actuar como represores transcripcionales de acuerdo a ensayos *in vitro* realizados por el grupo de Takeshi Todo (Kobayashi y col., 2000; Hirayama y col., 2003 a y b).

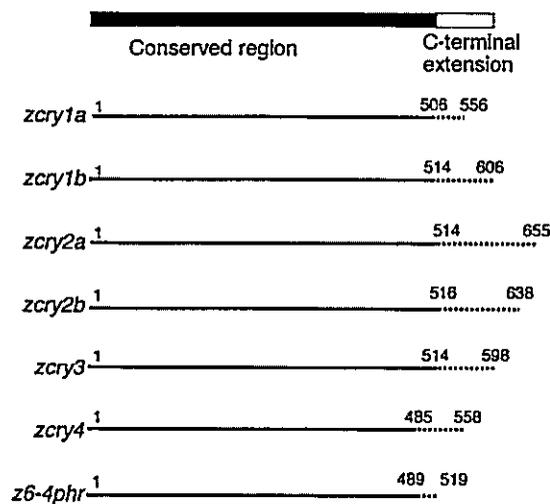


Figura 9. Criptocromos de pez cebra. La línea negra continua indica la secuencia aminoacídica de la región N-terminal conservada por criptocromos y 6,4-fotoliasa; la línea punteada señala la extensión C-terminal. Los números sobre las secuencias indican los aminoácidos respectivos. Figura adaptada de (Kobayashi y col., 2000).

Todos los zCRYs se expresan en los diferentes tejidos del pez adulto y presentan un patrón de expresión rítmico, con mayor amplitud de oscilación en ojo y cerebro que en el resto del cuerpo (Kobayashi y col., 2000). Además, en peces entrenados bajo ciclos LD 14:10, todos los criptocromos oscilan con diferentes fases: *Cry1a* exhibe un valor máximo de expresión a ZT 0-4; *Cry1b*, a ZT 9-13; *Cry2a* y *Cry2b*, a ZT 13-15; *Cry3*, a ZT 23-1 y *Cry4*, a ZT 9.

En las líneas celulares de pez cebra, cada uno de los criptocromos exhibe un patrón de expresión diferente. Aún cuando todos los mRNAs de zCRYs presentan oscilación circadiana y casi todos son fuertemente inducidos por la exposición a ciclos LD, sólo dos de ellos (*Cry1b* y *Cry3*) se expresan abundantemente en células Z3 mantenidas en estricta oscuridad y han sido sugeridos como potenciales fotorreceptores circadianos (Cermakian y col., 2002).

4 OBJETIVOS DEL PROYECTO Y APROXIMACIONES EXPERIMENTALES

Durante los últimos años, nuestro grupo de trabajo ha generado líneas celulares reporteras de los genes *Per1* y *Cry1a* de *Danio rerio* usando una estrategia similar a la desarrollada originalmente por el grupo de Steve Kay en *Drosophila* (Plautz y col., 1997). Este modelo experimental nos ha permitido estudiar en más detalle las oscilaciones circadianas que ocurren a nivel celular y su entrenamiento directo por luz (Carr y Whitmore, 2005; Tamai y col., 2007).

Así, luego de mostrar que cada célula dentro de una población clonal puede ajustarse a una fase común del reloj circadiano en respuesta a un pulso de luz (Carr y Whitmore, 2005), nuestro interés se ha volcado al análisis de los eventos moleculares involucrados en este proceso de entrenamiento, con particular énfasis en el rol que desempeñan los diferentes zCRYs.

La curva fase-respuesta (PRC) del reloj circadiano de pez cebra, evaluada en células PAC2, corresponde a una curva tipo 0 (Vallone y col., 2004). Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que existe una correlación fuerte entre la inducción de la expresión de *Cry1a* (único criptocromo del pez cuya expresión es inducida directamente

por luz) y el ajuste de fase observado en la expresión rítmica de *Per1* en respuesta a pulsos de luz de variada intensidad (Tamai y col., 2007) (Figura 10).

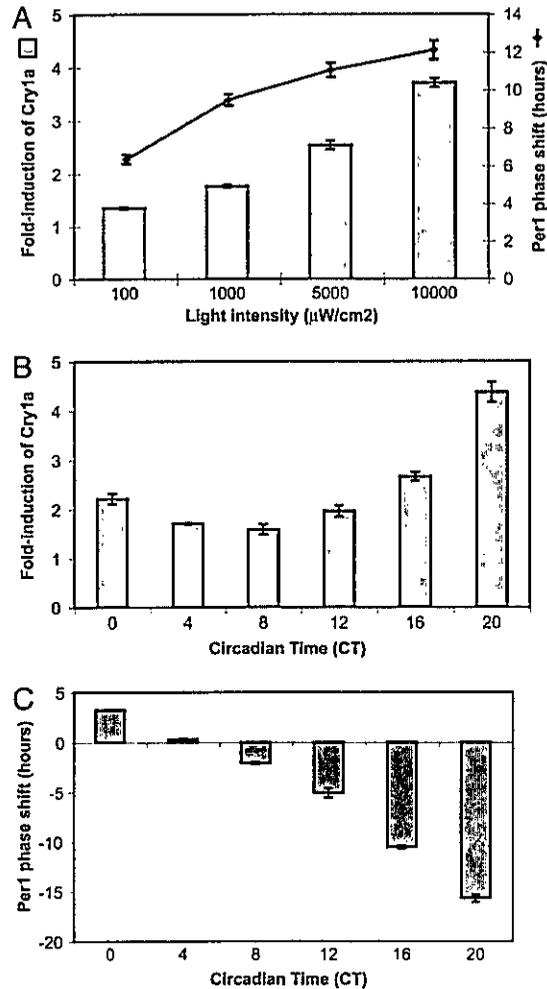


Figura 10. Correlación entre inducción de *Cry1a* y dimensión del cambio de fase de *Per1* en respuesta a pulsos de luz. (A) Las células *Per1*- y *Cry1a*-luciferasa eran expuestas a diferentes intensidades de luz blanca (400-700 nm) a CT 16. Además, células *Cry1a*-luciferasa (B) y células *Per1*-luciferasa (C) eran expuestas a un pulso de luz blanca de 5000 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ de intensidad a diferentes CTs. Figura adaptada de (Tamai y col., 2007).

Toda nuestra evidencia sugiere que *Cry1a* juega un rol crucial tanto en el entrenamiento del reloj circadiano a ciclos LD, como en el establecimiento de la amplitud observada en la PRC. De esta manera, *Cry1a* parece actuar más bien como una molécula de señalización en la vía de entrada de luz y no como un potencial fotorreceptor o componente central del reloj circadiano de pez cebra. De acuerdo a esto, las diferentes copias de genes *Cry* parecen exhibir un grado de especialización en su función y no tratarse de múltiples copias con redundancia funcional.

El objetivo central de este proyecto es estudiar el rol de *Cry3* en el sistema circadiano de *Danio rerio*. Esta molécula ha sido clasificada como "no-represor" de la transcripción mediada por CLOCK/BMAL (Kobayashi y col., 2000; Hirayama y col., 2003 a y b) y ha sido sugerida como un candidato atractivo a fotopigmento (Cermakian y col., 2002), pero a la fecha se desconoce su real función.

En particular, nos proponemos evaluar la potencial participación de *Cry3* en el proceso de detección de luz por parte de las células y de los tejidos periféricos de pez cebra y su posible interacción con proteínas centrales del reloj circadiano.

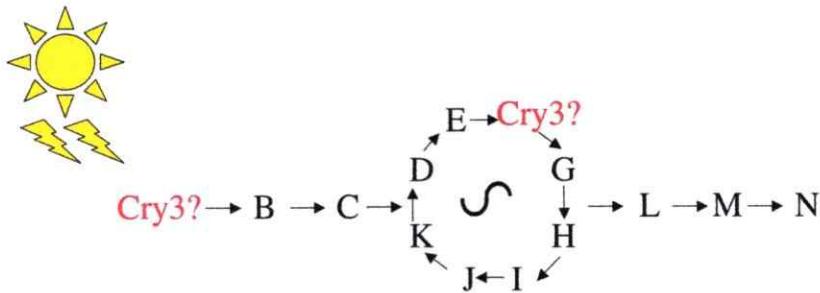
Como primer paso, planeamos caracterizar los patrones de expresión de *Cry3* bajo diferentes regímenes de iluminación, tanto en células PAC2 como en embriones de pez cebra. En esta dirección, la creación de una línea celular reportera de *Cry3*, nos permitirá monitorear *in vivo* las oscilaciones del mensajero y estudiar en detalle su respuesta a pulsos de luz. Luego, analizaremos la interacción de CRY3 con las proteínas centrales del reloj y su posible participación en la regulación de la transcripción mediada por CLOCK/BMAL. Por último, evaluaremos la relevancia de la proteína en el proceso de detección de luz y de entrenamiento del reloj circadiano, sobreexpresando CRY3 en las líneas celulares reporteras Perl- y *Cryla*-luciferasa y, haciendo uso de un morfolino antisentido para bloquear la expresión de la proteína en embriones de pez cebra.

HIPOTESIS

“*Cry3* funciona como fotorreceptor en el reloj circadiano de las células de pez cebra”.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el rol de *Cry3* en el sistema circadiano de pez cebra.



Objetivos Específicos

1. Estudiar el patrón de expresión espacial y temporal de *Cry3*, en términos de ritmicidad e inducción por luz.
2. Evaluar si *Cry3* desempeña un rol como componente central del reloj circadiano en líneas celulares y embriones de pez cebra.
3. Evaluar si *Cry3* actúa como fotorreceptor circadiano en líneas celulares y embriones de pez cebra.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1. Material Biológico

1.1. Embriones de Pez Cebra

Los peces adultos fueron mantenidos en tanques provistos de un sistema que recircula el agua, a una temperatura de 28°C y ciclos LD 14:10 (las luces se encendían a las 9 AM y se apagaban a las 11 PM). Los embriones de pez cebra fueron siempre obtenidos mediante cruces espontáneos y colectados dentro de la primera hora del ciclo LD 14:10 (9-10 AM) en placas Petri de 10 cm que contenían agua suplementada con azul de metileno 0,3 ppm.

1.2. Líneas celulares de Pez Cebra

1.2.1. PAC2

Línea celular publicada por el grupo de Nancy Hopkins (Lin y col., 1994). Estas células derivan de embriones de pez cebra de 36 horas postfertilización y sus propiedades de crecimiento indican un origen fibroblasto. Las

condiciones de cultivo son las mismas anteriormente publicadas por el grupo de Paolo Sassone-Corsi (Whitmore y col., 2000), usando medio L15 (GIBCO/BRL) suplementado con suero fetal de cabra (FCS) 15%, glutamina 2mM, gentamicina, streptomycin y penicilina, a 28°C y concentración atmosférica de CO₂. Cada 5-7 días las células son tripsinizadas y replaqueadas a una dilución 1:7.

1.2.2. *Per1*-luciferasa

Línea celular publicada por el grupo de Nicholas Foulkes (Vallone y col., 2004). El promotor de *Per1* fue amplificado por PCR usando GenomeWalker PCR (Clontech) y subclonado en un constructo que posee luciferasa como reportero, pGL3Basic (Promega). Luego, se generaron líneas celulares estables transfectando células PAC2 con el reportero de luciferasa más pcDNA3.1/mycHis(A) (Invitrogen), linearizados, y a una razón molar de 7:1, respectivamente. La electroporación se realizó a 0,29 kV y a 960 µF, usando un aparato Gene Pulser (BioRad). Al cabo de 3 días se agregó G-418 (GIBCO/BRL) a una concentración final de 800 µg/ml. Después de 2 semanas de selección con Neomicina, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos para ser monitoreadas en el contador de

centelleo. Finalmente, las células provenientes del pocillo con más luminiscencia fueron tripsinizadas y propagadas como un grupo único.

1.2.3. Cry1a-luciferasa

Línea celular creada hace seis años en nuestro laboratorio usando una estrategia similar a la de Perl-luciferasa (Tamai y col., 2007). 4,9 kilobases del promotor de *Cry1a* fueron clonados en el vector pGL3Basic (Promega). Luego, se electroporó células PAC2 con 5 µg del plásmido reportero más 5 µg del plásmido pcDNA3.1/myc-His(A) (Invitrogen), linearizados. Después de seleccionar por dos semanas con neomicina, se monitoreó la bioluminiscencia y se expandieron las células del pocillo más luminiscente.

1.2.4. Cry3-luciferasa

Línea celular creada para el desarrollo de este Proyecto de Tesis de acuerdo al protocolo descrito anteriormente para las líneas celulares Perl- y Cry1a-luciferasa. Se aisló un fragmento de 4,7 Kb del promotor de *Cry3* y se clonó en el reportero de luciferasa pGL3Basic (Promega) (ver detalles en sección 1.2. de RESULTADOS).

2. Lista de oligonucleótidos

NOMBRE	SECUENCIA 5'→3'	PROPOSITO
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Secuenciación
SP6	CGATTTAGGTGACACTATAG	Secuenciación
nFCry3	CTCTACACTGAACCACAATGTGCGT	"nested" PCR
nRCry3	TGAACTTGTCCGACTCGCTTGGTTA	"nested" PCR
FCry3 (HIII)	GTCAAGCTTATCGGAATTGTTTACTC	PCR
RCry3 (ERV)	ATTCAGATATCTGTCATCCATCTTCAGC	PCR
Cry3Seq1	TCTCTAGAGGAGCTGGGTTTT	Secuenciación
Cry3Seq2	AAAACCCAGCTCCTCTAGAGA	Secuenciación
Cry3Seq3	GGAAGTGAATGAAAGTGTTT	Secuenciación
Cry3Seq4	AAACTTTTCATTCCTTTC	Secuenciación
pCLNCX5' seq	ATCCACGCTGTTTTGACCTCC	Secuenciación
Cry3probe-F	CACTGAACCACAATGTGCGTGCAGG	Sonda <i>in situ</i>
Cry3 1,2kb-R	GGATCCATTAACCCTCACTAAAGGGAA ACAGGCTACTGCATGTCG	Sonda <i>in situ</i>
5KCry3SmaIF	TTGTCATCCCGGGAGCCAAGCAT	PCR
5KCry3BglIIR	GTGTAGAGTTTGAGATCTGGAGCAGA	PCR
qF-Per1	ATCCAGACCCCAATACAAC	RT-qPCR
qR-Per1	GGGAGACTCTGCTCCTTCT	RT-qPCR
qF-Per2	TGGCTCTGGACAGAAGTGAG	RT-qPCR
qR-Per2	GGATGTCTCGAGAAGGCAAC	RT-qPCR
qF-Cryla	GTCATGGGCTCCTGCACTAC	RT-qPCR

qR-Cry1a	GTCAAAACCAAGCTCCTCCA	RT-qPCR
qF-Cry3	CAGAGCCTCCCATGTCAGAT	RT-qPCR
qR-Cry3	TTCAGACAGCGGTGGTGTAG	RT-qPCR
qF-6, 4Ph	TGTGGATCATGAGGTTGTCC	RT-qPCR
qR-6, 4Ph	TTGATGGATGGACTCGCTTT	RT-qPCR
qF-RpL13 α	TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC	RT-qPCR
qR-RpL13 α	AGACGCACAATCTTGAGAGCAG	RT-qPCR

3. Morfolinos (Gene Tools)

Cry3_Mo/Fluoresceína: 5' CATAATAGCGCTTTATTCCATCGTA 3'

Std.Ctr_Mo/Fluoresceína: 5' CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA 3'

4. Anticuerpos

Mouse α -myc, α -Flag M2 y α - γ tubulina (Sigma; M5546, F3165 y T5326, respectivamente); Goat α -mouse/HRP (Sigma, A5420) y Alexa Fluor® Goat α -mouse 594 (Molecular Probes, A11005).

METODOS

1. Ensayos de Protección de RNasa

Se extrajo el RNA de células PAC-2 o embriones de pez cebra usando Trizol (Invitrogen). La región codificante de *Cry3* se amplificó por RT-PCR, se subclonó en pGEMTeasy (Promega) y se usó como molde para las sondas de los ensayos. Las ribosondas fueron sintetizadas usando un kit de transcripción *in vitro* (Promega) y ^{32}P -UTP (Amersham). 8 μg de RNA total de cada muestra fueron hibridizados con las sondas de *Cry3* (embriones y células PAC2) ó Tim2 (células PAC2). Para los ensayos de protección de β -actina (embriones), en cambio, sólo 3 μg de RNA total fueron hibridizados con la sonda. Se hibridizó a 55°C toda la noche y se digirió a 30°C por 1 hora. Los fragmentos protegidos se separaron en geles de acrilamida 6%/urea 8 M y se revelaron por autoradiografía.

2. Hibridación *in situ*

Todos los lavados e incubaciones se realizaron con agitación constante. Se trabajó en condiciones libres de RNasa hasta completar el último lavado de la sonda. Con el fin de evitar la pigmentación de los embriones, el agua fue

suplementada con feniltiocarbamida (PTU) 0,2 mM a las 24 horas post-fertilización (hpf).

Los embriones fueron separados en placas Petri de 6 cm (30-40 embriones/placa) y mantenidos en un baño termostatzado bajo ciclos LD 12:12 (las luces se encendían a las 9 AM y se apagaban a las 9 PM; luz blanca, 250 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$), a una temperatura constante de 28°C. Al tercer día, luego de ser decorionados entre las 24-48 hpf, fueron retirados del baño a 4 diferentes horas del día (correspondientes a las 51, 57, 63 y 69 hpf), fijados en PFA 4%/PBS por 24 h a 4°C, transferidos a una solución de metanol 100% y mantenidos a -20°C.

El primer paso del ensayo consistía en la rehidratación de las muestras con tres lavados sucesivos de 5 min de duración en metanol 75%, 50% y 25% v/v en PBST. A continuación, los embriones se lavaron tres veces durante cinco minutos con PBST, se trataron con proteinasa K (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 30 min, se refijaron en PFA 4% durante 20 min, se lavaron con PBST y se prehibridizaron en tampón de hibridación (formamida 50%, SSC 5X, EDTA 5 mM, Tween 20 0,1%, ácido cítrico 9,2 mM, heparina 50 mg/ml y RNA de levadura 1 mg/ml) a 65°C durante 3 h. La incubación con la ribosonda se realizó inmediatamente

después de denaturar a 65°C por 10 min, y se hibridizó durante al menos 16 h a 65°C. Las sondas sentido y antisentido de *Cry3* fueron marcadas con digoxigenina y correspondían a 1,2 kb del cDNA de *Cry3*. Los lavados de la ribosonda se realizaron a 65°C con incubaciones sucesivas en formamida 50% más: SSC 1X (2 lavados de 30 min), SSC 2X (1 lavado de 15 min) y SSC 0,2X (2 lavados de 30 min). Luego de 2 h de bloqueo a temperatura ambiente en MAB/BMBR (Reactivo de bloqueo BMBR (Roche) 2% en MABT [ácido maleico 100mM, NaCl 150mM, Tween 20 0,1%, pH 7,5]), los embriones fueron incubados con el anticuerpo anti-digoxigenina (Roche) 1:5000 en MAB/BMBR a 4°C durante toda la noche. Por último, los embriones fueron lavados con PBST y revelados por incubación con un sustrato púrpura de fosfatasa alcalina (Roche) a 4°C hasta ver la aparición de marca.

3. Doble híbrido en levaduras

Las regiones codificantes de interés se amplificaron por PCR a partir de plásmidos existentes, o bien, se amplificaron por RT-PCR desde células PAC2 usando primers con sitios de restricción diseñados de tal manera que se fusionaron, en el marco de lectura apropiado, con el

dominio de unión de GAL4 en pGBKT7 y/o el dominio de activación de GAL4 en pGADT7 (Clontech). El plásmido pGBKT7 y las fusiones al dominio de unión se transformaron en la cepa AH109 (MAT α), mientras que pGADT7 y las fusiones al dominio de activación se transformaron en la cepa Y187 (MAT α). Las cepas se aparearon en medio enriquecido YPDA y los diploides se seleccionaron en medio sintético que carece de leucina y triptofano, -L/-W (Clontech). Las interacciones entre proteínas se evaluaron por monitoreo del crecimiento en medio sintético carente de adenina, (-Ade), y además, en medio sintético carente de histidina, (-His), a 3 concentraciones diferentes de 3-aminotriazol (1, 5 y 10 mM).

4. Ensayos de Bioluminiscencia

Las células reporteras fueron sembradas por cuadruplicado a una densidad de 0,5-1,0 x 10⁵ células por pocillo en pocillos alternados de una placa p96 (Fluoplate, Nunc) y fueron incubadas toda la noche en oscuridad a 28°C. Al día siguiente se removía el medio de cultivo y se agregaba medio fresco con luciferina 0,5 mM (Promega). Las células fueron entrenadas a ciclos LD 12:12 durante al menos 2 días y luego fueron transferidas a condiciones de oscuridad (DD) o iluminación (LL)

constantes. El monitoreo de la bioluminiscencia se realizaba en un contador de centelleo TopCount NXT (modelo de 2 detectores, Packard) a 28°C. Las placas fueron contadas en un ciclo ininterrumpido, donde cada pocillo fue contado por 10 s a intervalos de 30-50 min, e intercaladas con placas p96 transparentes (Nunc) para asegurar iluminación uniforme sobre las muestras. Los datos fueron importados en EXCEL (Microsoft) usando el programa "Import and Analysis" (S. Kay, Scripps Research Institute).

5. Análisis de Cambios de Fase

Las células reporteras fueron sembradas por cuadruplicado en pocillos alternados de placas p96 en medio suplementado con luciferina. Las placas fueron expuestas por al menos 2 días a ciclos LD 12:12 y luego transferidas a oscuridad constante (DD). Durante el primer día en DD, las placas fueron expuestas individualmente a pulsos de luz de 15 min de duración (luz blanca o monocromática, diferentes intensidades) a diferentes tiempos circadianos (CT, CT 0 designa la hora a la cual se encendía la luz durante el entrenamiento [comienzo del día subjetivo] y CT 12, la hora en que se apagaba la luz [inicio de la noche subjetiva]). Una de las placas

permanecía en DD, para ser usada como control. Una vez finalizados los pulsos de luz, las placas fueron contadas por al menos 2 días en DD, para luego calcular los cambios de fase estables (horas de desplazamiento del valor máximo de expresión en relación al valor máximo de expresión del control mantenido en DD) observados para cada pulso de luz.

6. Inmunocitoquímica

Se utilizaron placas de 4 pocillos con cubreobjetos redondos de 13 mm (en condiciones de esterilidad).

Una vez confluentes, las células sembradas en frascos de 25 cm² fueron tripsinizadas y resuspendidas en igual volumen de medio fresco. Luego, 100 µl de la suspensión más 400 µl de medio fresco (dilución 1:5) fueron sembrados en cada pocillo sobre un cubreobjeto. Las placas fueron incubadas bajo ciclos LD 12:12 en un baño de agua a 28°C. Al cabo de 5 días de entrenamiento, las células fueron fijadas en paraformaldehído (PFA) 4%/sucrosa 4% por 20 min a temperatura ambiente, lavadas con PBS y permeabilizadas en una solución de PBS que contenía Tritón X-100 0,2% por 5 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron lavadas con PBS, bloqueadas en PBS/Albúmina 5% por 45 min - 1 h e incubadas con el anticuerpo primario diluído en

PBS/Albúmina 1% durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, fueron lavadas con PBS e incubadas con el anticuerpo secundario diluido en PBS/Albúmina 1% por 45 min - 1h a temperatura ambiente. Por último, fueron lavadas 3 veces con PBS (5 min/lavado), incubadas con DAPI (1:50000 en PBS) por 5 min y, lavadas nuevamente con PBS antes de ser montadas.

7. Western Blot

Las proteínas fueron separadas por 10%SDS/PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher y Schuell, Dassel, Alemania). Para la detección se usó el kit ECL Plus (GE Healthcare, Chalfont, St. Giles, U.K.).

8. Transfección retroviral

Las regiones codificantes de interés fueron marcadas con un "tag" en el extremo N- ó C-terminal y amplificadas por PCR usando primers diseñados para introducir sitios de restricción que permitieran subclonarlas en el vector retroviral pCLNCX.

Los constructos retrovirales fueron transfectados por precipitación calcio-fosfato en la línea celular GP2-293 (Clontech, Palo Alto, CA) junto a los plásmidos pMD.G (que

codifica la glicoproteína del virus de estomatitis vesicular, VSV-G) (Zufferey y col., 1997) y pBS-SK⁻ (usado como vector no específico). Al cabo de 2 días, los retrovirus fueron colectados, filtrados y diluidos en medio L-15 / FCS 15%. Las células Per1- ó Cryla-luciferasa fueron infectadas 2 veces al día durante 2 días seguidos, cambiando el medio de cultivo cada vez por suspensión viral fresca. Finalizado el proceso de infección, las células fueron lavadas con medio de cultivo fresco y se dejaban crecer por un período de 5-7 días. Luego, fueron tripsinizadas y seleccionadas por FACS en pocillos individuales de placas p96. Después de aproximadamente un mes en cultivo, se monitoreó la bioluminiscencia, se expandieron varios clones y se examinó la sobreexpresión por Western e inmunocitoquímica.

9. Bloqueo transitorio de la traducción de *Cry3* en embriones de pez cebra.

Estos experimentos se realizaron usando un oligonucleótido-morfolino antisentido diseñado de acuerdo a las recomendaciones de Gene Tools (Philomath, OR, USA) para unirse a la secuencia inmediatamente río arriba de *Cry3*, incluyendo el codón de inicio de la traducción (ATG). Como

control se utilizó el morfolino control estándar que provee el mismo fabricante. Con el objetivo de verificar que ninguno de los morfolinos se uniera a otras secuencias génicas que no fueran las deseadas, se desarrollaron análisis de alineamiento BLAST (basic local alignment search tool) contra la secuencia del genoma de pez cebra de la base de datos NCBI.

10 μ l de morfolino fueron inyectados en el citoplasma de cigotos silvestres de pez cebra (en estadio de 1 célula) a partir de una solución "stock" de concentración 0,5mM (5 pmoles/embrión). Bajo estas condiciones, la mayoría de los embriones inyectados se desarrollaba normalmente, en comparación a sus pares silvestres sin inyectar (ver RESULTADOS, sección 2.3, Figura 26).

Las inyecciones con el morfolino antisentido de Cry3 se llevaban a cabo inmediatamente después de la colección, entre las 9-10 AM (0-1 hpf). Los embriones fueron separados en placas Petri de 6 cm (30-40 embriones/placa) y mantenidos en un baño termostatzado bajo ciclos LD 12:12 (las luces se encendían a las 9 AM y se apagaban a las 9 PM; luz blanca, 250 μ W/cm²), a una temperatura constante de 28°C. Al tercer día, luego de ser decorionados entre las 24-48 hpf, fueron retirados del baño a 4 diferentes horas

del día (correspondientes a las 51, 57, 63 y 69 hpf; ZT 3, 9, 15 y 21, respectivamente), homogenizados en 500 μ l de Trizol (Invitrogen) durante 5 minutos e inmediatamente congelados a -80°C .

10. Extracción de RNA, síntesis de cDNA y cuantificación por RT-qPCR

Las muestras fueron descongeladas al día siguiente y homogenizadas a máxima velocidad por 5 minutos. Luego fueron mezcladas con 125 μ l de cloroformo, agitadas por 15 segundos, incubadas a temperatura ambiente por 3 min y centrifugadas a 12000 g for 5 min. La fase acuosa fue transferida cuidadosamente a un nuevo tubo, mezclada con un volumen equivalente de etanol 70% (precipitación del RNA) y cargada en una columna del kit RNeasy (Qiagen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA total de cada muestra fue determinada usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, USA).

El cDNA fue producido a partir de 2 μ g de RNA total usando el kit Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen).

Las reacciones de qRT-PCR fueron plaqueadas por triplicado en placas de 96 pocillos y consistían de una mezcla de 9 μ l de SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix (Invitrogen), 1 μ l de cada partidor (10 μ M), 2 μ l de una dilución 1:10 del cDNA y 7 μ l de agua DEPC (20 μ l volumen final). La plataforma utilizada (Mastercycler® ep *realplex*, Eppendorf) fue programada para desarrollar 40 ciclos de amplificación (95°C por 15 s, 55°C por 15 s y 68°C por 20 s) seguidos de una curva de disociación (gradiente 60°C-95°C en 20 min).

11. Análisis estadístico

Los resultados analizados correspondían al valor promedio de, al menos, tres experimentos independientes, cada uno ensayado por triplicado. De acuerdo a la naturaleza de los datos y los parámetros sujetos a comparación, se realizaron análisis estadísticos ANOVA ó t-Student (www.physics.csbsju.edu/stats/).

RESULTADOS

1. Caracterización general de *Cry3* de pez cebra

Al inicio de este proyecto, la información relativa a criptocromos de pez cebra disponible era escasa. Aún cuando existían un par de artículos que describían el patrón de expresión espacial y temporal de criptocromos en tejidos de pez adulto y en la línea celular Z3 (Kobayashi y col., 2000; Cermakian y col., 2002), las condiciones experimentales detalladas en éstos presentaban algunas diferencias con el diseño experimental de nuestro trabajo. Por lo anterior, decidimos evaluar el patrón de expresión de *Cry3* bajo regímenes de iluminación y horas circadianas que nos permitieran comparar los resultados de los experimentos diseñados en la línea celular PAC2 con aquellos que involucrarían entrenamiento de embriones de pez cebra.

1.1 Expresión de *Cry3* en embriones de pez cebra.

La distribución espacial de la expresión de *Cry3* en embriones de pez cebra fue estudiada por ensayos de

hibridación *in situ* (ISH). Los embriones fueron mantenidos a 28°C en un baño termorregulado, tratados con feniltiourea (PTU) a las 24 hpf para evitar pigmentación y expuestos a ciclos LD 12:12 durante el transcurso del experimento. Al tercer día de entrenamiento, cuatro grupos de embriones fueron fijados cada 6 h, a tiempos zeitgeber (ZT) 3, 9, 15 y 21, respectivamente (ZT 0 corresponde al instante en que se enciendía la luz).

Bajo estas condiciones, observamos que *Cry3* se expresa en todos los tejidos del embrión, pero con mayor intensidad en la cabeza (cerebro y ojos), los primordios de las aletas y el tubo digestivo primitivo. Aún cuando la distribución de la tinción no variaba considerablemente entre las diferentes muestras, el nivel más alto de expresión fue observado a ZT 3 (Figura 11). Los controles ensayados con la sonda sentido de *Cry3* no mostraron una señal positiva de hibridación (resultado no mostrado).

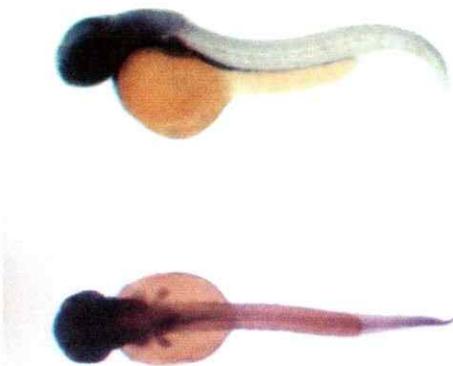


Figura 11. *Análisis de la expresión del mRNA de Cry3 por hibridación in situ.* Los embriones fueron entrenados durante tres días a ciclos LD 12:12 y fijados a ZT 3 (51 hpf).

A continuación, desarrollamos ensayos de protección de RNasa para estudiar los niveles de expresión temporal de *Cry3* en embriones entrenados durante cuatro días a ciclos LD 12:12 y, en paralelo, en embriones mantenidos por el mismo tiempo en oscuridad constante (DD). Así, desde el primer día de entrenamiento se evaluaron cuatro diferentes puntos, separados por intervalos de 6 h y correspondientes a ZT (ó CT en condiciones DD) 3, 9, 15 y 21 (Figura 12).

Los embriones expuestos a ciclos LD 12:12 bajo condiciones constantes de temperatura, exhiben transcripción rítmica de *Cry3* durante los primeros días de desarrollo (Figura 12a). El valor máximo de expresión ocurre en las primeras horas del día, a juzgar por la intensidad de las bandas observadas a ZT 21 y ZT 3. Cuando los embriones son mantenidos bajo condiciones de temperatura y oscuridad constantes, en cambio, los niveles de expresión de *Cry3* observados a partir de las 3 hpf son menores que los observados en embriones entrenados a ciclos LD 12:12 y no parecen oscilar rítmicamente (Figura 12b). El primer punto, tomado a las 3 hpf, exhibe elevada expresión de *Cry3* por contribución del mRNA materno. Estos resultados sugieren que la exposición temprana a la luz modula el nivel de expresión basal de *Cry3* en los embriones.

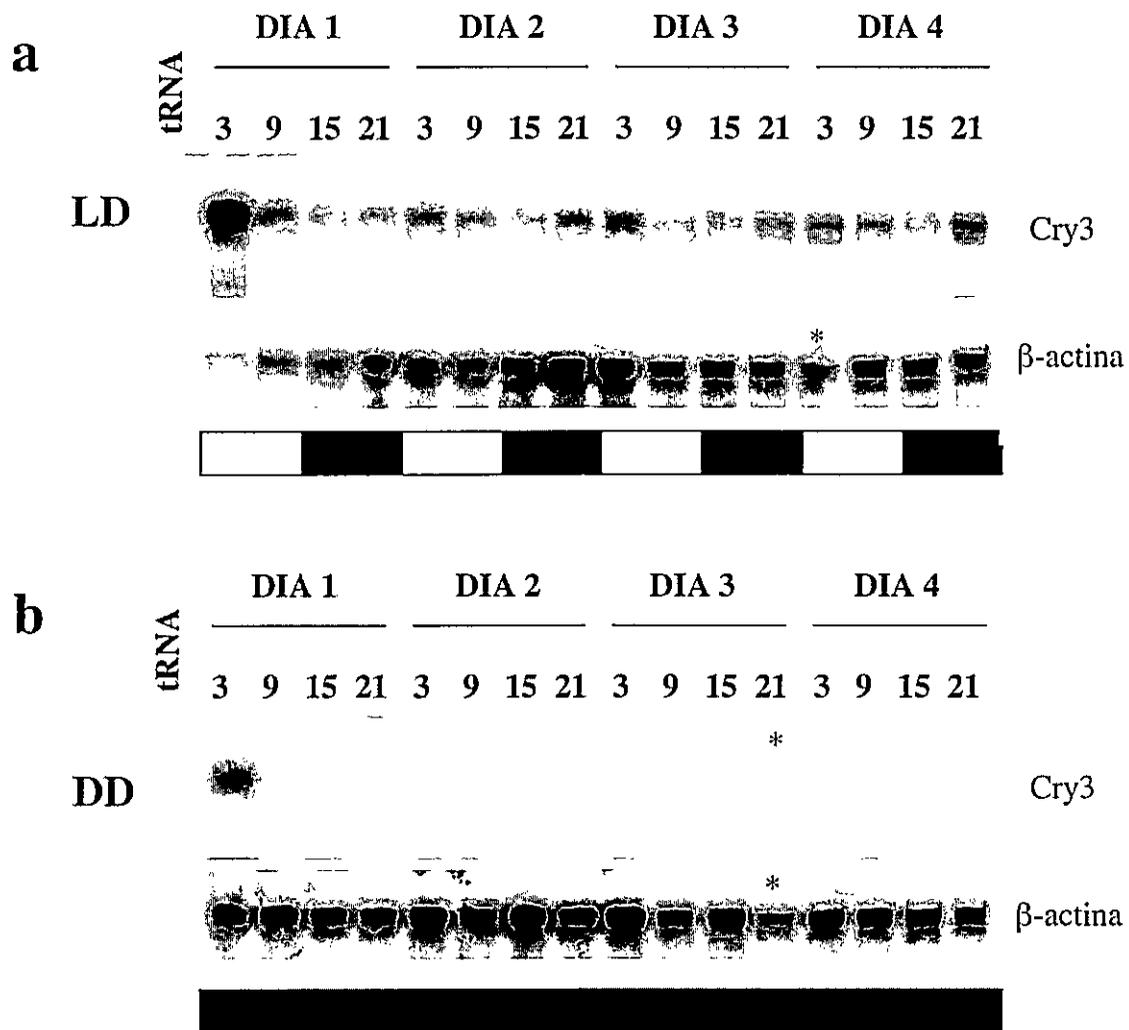


Figura 12. Análisis de la expresión de *Cry3* en embriones por ensayos de protección de RNasa. Los embriones fueron entrenados a ciclos LD 12:12 (a) o mantenidos en DD (b) durante cuatro días. Las muestras fueron obtenidas cada 6 horas a partir de las 3 hpf, a ZT (ó CT) 3, 9, 15 y 21, respectivamente. Las barras muestran los períodos de luz (blanco) y oscuridad (negro); el asterisco indica una muestra que no fue cargada correctamente en el gel. La detección del mRNA de β -actina fue usada como control de carga y el tRNA, como control negativo.

1.2 Expresión de *Cry3* en células PAC2.

Se ha mostrado previamente que la línea celular PAC2 posee relojes directamente entrenables por luz (Whitmore y col., 2000; Pando y col., 2001) y por ello representa una valiosa herramienta de cultivo celular para estudiar las bases moleculares de la sensibilidad periférica a la luz.

Antes de crear una línea celular reportera de *Cry3* en células PAC2, decidimos evaluar el patrón de expresión temporal del mensajero de *Cry3* y su respuesta a un pulso de luz suministrado en oscuridad por ensayos de protección de RNasa. Para evaluar la expresión temporal, las células fueron entrenadas bajo ciclos LD 12:12 a 28°C por 9 días y luego se extrajo el RNA a ZT 3, 9, 15 y 21. De acuerdo a lo anterior y, similar a lo observado en embriones de pez cebra, el mRNA de *Cry3* en células PAC2 entrenadas a ciclos LD 12:12 exhibe expresión rítmica con un valor máximo alrededor de ZT 21-3 (Figura 13).

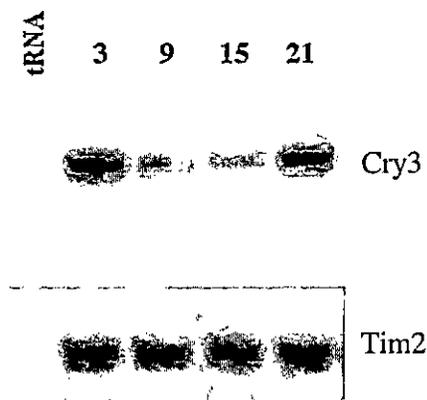


Figura 13. *Oscilación de la expresión de *Cry3* en células PAC2.* Ensayo de protección de RNasa en células PAC2 entrenadas durante nueve días a ciclos LD 12:12. El RNA se extrajo el noveno día cada 6 h a ZT 3, 9, 15 y 21. *Tim2* fue usado como control de carga.

Con el fin de evaluar la expresión de *Cry3* en respuesta a un pulso de luz, las células fueron entrenadas por 3 días a ciclos LD 12:12 y luego transferidas a DD. Al día siguiente, a CT 16, las células fueron expuestas a luz blanca (250 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) por 1 hora, ó mantenidas en DD como control, y el RNA se extrajo a las 0, 1, 2, 4 y 6 horas después del tratamiento (Figura 14). De acuerdo a los resultados obtenidos, los niveles de mRNA de *Cry3* parecen no verse alterados en respuesta al pulso de luz otorgado y permanecen equivalentes a los observados en las células mantenidas en DD.

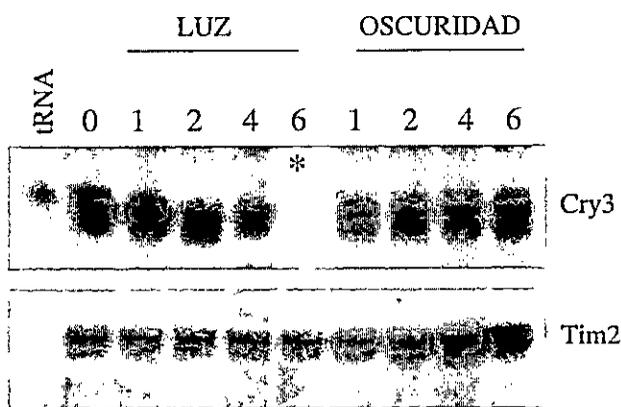


Figura 14. Efecto de un pulso de luz en los niveles de expresión de *Cry3* en células PAC2. Ensayo de protección de RNasa en células PAC2 entrenadas durante 3 días a ciclos LD 12:12 y luego transferidas a DD. Al cuarto día, las células

recibieron un pulso de luz por 1 hora (luz blanca, 250 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) a CT 16 o fueron mantenidas bajo DD. La extracción de RNA se inició inmediatamente después del tratamiento, a las 0, 1, 2, 4 y 6 horas. El asterisco indica una muestra que no fue cargada correctamente en el gel. *Tim2* fue usado como control de carga.

1.3 Establecimiento de una línea celular reportera de *Cry3*.

Con el fin de explorar la expresión de *Cry3* bajo distintas aproximaciones experimentales, decidimos aislar el promotor del gen y desarrollar una línea reportera de luciferasa en células PAC2. La principal ventaja de esta estrategia experimental, es que permite monitorear en tiempo real las oscilaciones de los mRNA de genes de interés con resultados altamente reproducibles (Vallone y col., 2004; Carr y Whitmore, 2005; Tamai y col., 2007).

1.3.1 Diseño del constructo reportero y transfección estable en células PAC2.

Un fragmento de 4,7 Kb del promotor de *Cry3* fue amplificado por PCR a partir del clon BAC DKEY-28J3 (número de acceso a GeneBank: AL844193) usando partidores diseñados para introducir sitios de restricción en sus extremos 5' y 3'. El fragmento fue luego subclonado en el vector pGEMTeasy, para el análisis de su secuencia, y en los sitios Sma I y Bgl II del sitio de múltiple clonamiento del vector de expresión pGL3basic, río arriba de la secuencia del cDNA de luciferasa (Figura 15).

Las células PAC2 fueron cultivadas en frascos de 75 cm², crecidas a confluencia, tripsinizadas, centrifugadas (1000 rpm, 5 min, 20°C) y resuspendidas en 500 µl de una

solución Nucleofector® (Amaya biosystems). 100 µl de la suspensión celular fueron cotransfectados, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con 10 µg del plásmido pGL3.5Kcry3 y 5 µg de pcDNA3.1/myc-His(A), ambos linealizados con Sal I.

5'- TTGTCATCCCGGGAGCCAAGCAT -3' **5Kcry3SmaIF**
 -4633 pb **CTTGTTCATCCCGACAGCCAAGCAT**TGGAATCAGTAACAGGATCTGACCAGGCACAA
 ATACAATAGGGACTTTTGCACCTGAGGAACCTTTTCACAG.....-4401 pb AATAATTTGCA
Caja E (-1386)
 TCAG**CACGTG**CTAGGGACACCTGTTGGTCAAAACTGTGTGAATGCAGCAAAAACATGCA.....
Caja E (-75)
 -86 pb TCCGTAC**CACGTG**TCCGCCCGCTGGCCAATGAACGCGGGGAGAGGCGGAAAAAACCA
 3'- ACGAGGGTCTAGAGTTTGTAGATGTG -5' **5Kcry3BglIIR**
 TTGCGTCTGCTGTGCT**TGCTCCCCATCTCAAACCTCTACACT**GAACCACAATGTGCGTGCAGGA
 CGGCTGAAATCGCGAATTGTTACTCTTCTGGATTTCCTTGGAACCTTTTACGATGGAATAAAG
 CGCTATT**ATG**GTGGTGAAT.....
Inicio del marco de lectura

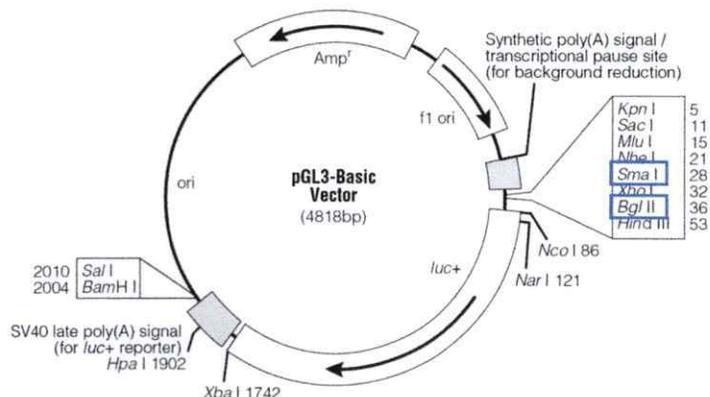


Figura 15. Diseño del constructo reportero pGL3.5Kcry3. 4,7 Kb de la secuencia genómica río arriba del inicio del marco de lectura de Cry3 fueron subclonados en los sitios Sma I y Bgl II del sitio de múltiple clonamiento del vector de expresión pGL3basic. Se indica la posición de las 2 cajas E presentes en el fragmento subclonado (amarillo) y de los partidores diseñados para introducir los sitios de restricción mencionados (gris).

Una vez realizada la electroporación, las células fueron transferidas a un frasco de 25 cm² con medio de cultivo fresco, crecidas a confluencia y seleccionadas por dos semanas con neomicina. Finalmente, se evaluó la expresión del reportero de luciferasa en la población de células resistentes al antibiótico por un ensayo de bioluminiscencia, previo a la selección clonal por citometría de flujo (Figura 16).

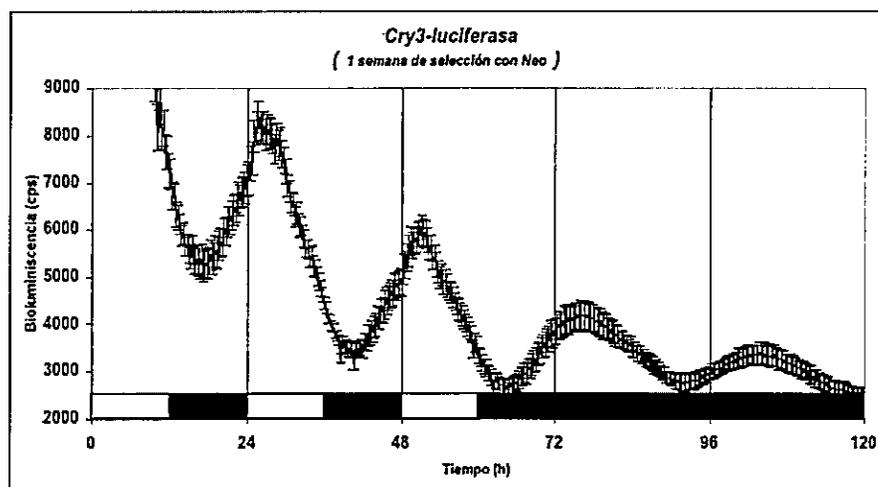


Figura 16. Ensayo de bioluminiscencia en células reporteras *Cry3-luciferasa*, previo a la selección clonal. La bioluminiscencia fue evaluada después de una semana de selección con neomicina. La figura representa el valor promedio (\pm SD) de cuatro pocillos observado durante 3 días de entrenamiento a ciclos LD 12:12 y 2 días en DD.

1.3.2 Análisis *in vivo* de la expresión de *Cry3*.

Se analizó la expresión de bioluminiscencia de 96 clones aislados mediante citometría y, aún cuando todos

ellos exhibían un patrón oscilatorio semejante, se observó un amplio rango de intensidades de la señal luminiscente. Lo anterior reflejaría diferencias en el número de copias o en los sitios de integración genómica del plásmido entre los diferentes clones. Uno de los clones que presentó una intensidad de bioluminiscencia similar a la de la población original de células, fue seleccionado para evaluar en detalle el patrón de oscilación del mensajero de *Cry3* bajo diferentes regímenes de luz y su respuesta a pulsos de luz de diferente intensidad. Todos los experimentos de análisis de bioluminiscencia incluyeron como referencia las líneas celulares reporteras *Perl-* y *Cryla-luciferasa*.

1.3.2.1 Ritmicidad bajo condiciones de oscuridad constante (DD)

Las células *Cry3-luciferasa* fueron plaqueadas por cuadruplicado, entrenadas por tres días a ciclos LD 12:12 y luego transferidas a DD. Durante el entrenamiento, se observa que la expresión del reportero alcanza un valor máximo alrededor de ZT 2-3 y un mínimo 12 h después, al inicio de la fase oscura. Este resultado coincide con los niveles de expresión endógenos de *Cry3* observado por ensayos de protección de RNasa en embriones y en células PAC2 entrenados bajo ciclos LD 12:12. Una vez transferidas

a oscuridad constante, las células continúan oscilando con un período (τ) promedio de $26 \pm 0,5$ horas y con tendencia a perder amplitud de oscilación (Figura 17a).

Los valores máximo y mínimo de expresión de *Cry3* en ciclos LD coinciden con aquellos observados para el reportero de *Per1*, sin embargo, la amplitud de oscilación del primero es más discreta. La mantención del ritmo en DD confirma que la expresión de *Cry3* es regulada por el reloj circadiano. Finalmente, a diferencia de lo observado en la línea *Cry1a*-luciferasa, el reportero de *Cry3* no parece exhibir una inducción aguda de su expresión al momento en que se enciende la luz, resultado que se suma a la ausencia de respuesta a un pulso de luz observada por ensayos de protección de RNasa.

1.3.2.2 Ritmicidad bajo condiciones de iluminación constante (LL)

Al cabo de tres días de entrenamiento, las células fueron transferidas a un régimen de iluminación constante (luz blanca 400-700 nm, $2500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). Como resultado de la exposición a LL, se observa una marcada disminución de la amplitud de oscilación de los reporteros de *Per1* y *Cry3*, con tendencia a permanecer en los niveles mínimos de expresión respectivos (Figura 17).

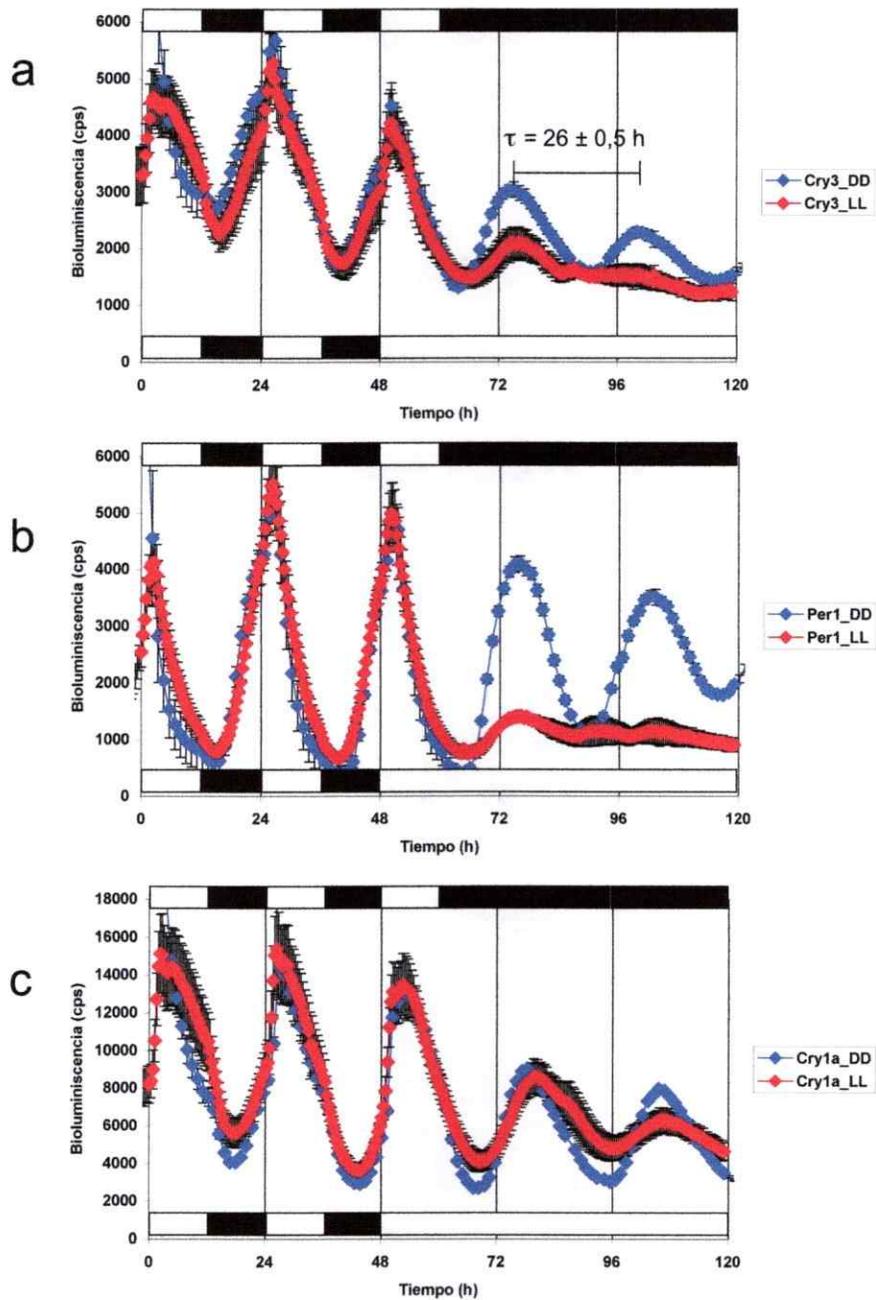


Figura 17. Niveles de expresión de *Cry3* bajo condiciones de oscuridad ó iluminación constantes (DD versus LL). Ensayos de bioluminiscencia con los reporteros de *Cry3* (A), *Per1* (B) y *Cry1a* (C). Los trazados representan el valor promedio (\pm SD) de 4 pocillos observado durante 3 días de entrenamiento a ciclos LD 12:12, seguidos por 2 días de DD (en azul) ó LL (en rojo).

El reportero de *Cryla*, en cambio, continua oscilando con tendencia a perder amplitud y a permanecer en un nivel de expresión intermedio. Lo anterior, apoya la idea de que la luz actúa como una señal que "detiene" el reloj circadiano y que *Cryla* podría jugar un rol en la vía de entrada de la señal de luz al reloj (Tamai y col., 2007).

1.3.2.3 Respuesta a pulsos de luz de variada intensidad.

Luego de ser entrenadas, las células fueron expuestas durante 15 minutos a un rango de intensidades (0, 25, 250 y 2500 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) de luz blanca (400-700 nm) durante el primer ciclo DD, a CT 16. Bajo estas condiciones, se observa una inducción aguda del mensajero de *Cryla* en respuesta al pulso de luz que, según ha sido documentado recientemente (Tamai y col., 2007), es proporcional a la intensidad de luz administrada. Para los reporteros de *Per1* y *Cry3*, en cambio, sólo se observan cambios de fase que provocan un retraso en el valor máximo de expresión, cuya dimensión en horas, se correlaciona directamente a la intensidad del pulso de luz aplicado (Figuras 18 y 19).

Durante el desarrollo de este proyecto, la respuesta del reportero de *Cry3* a pulsos de luz fue evaluada repetidas veces, a diferentes CTs y diversas intensidades

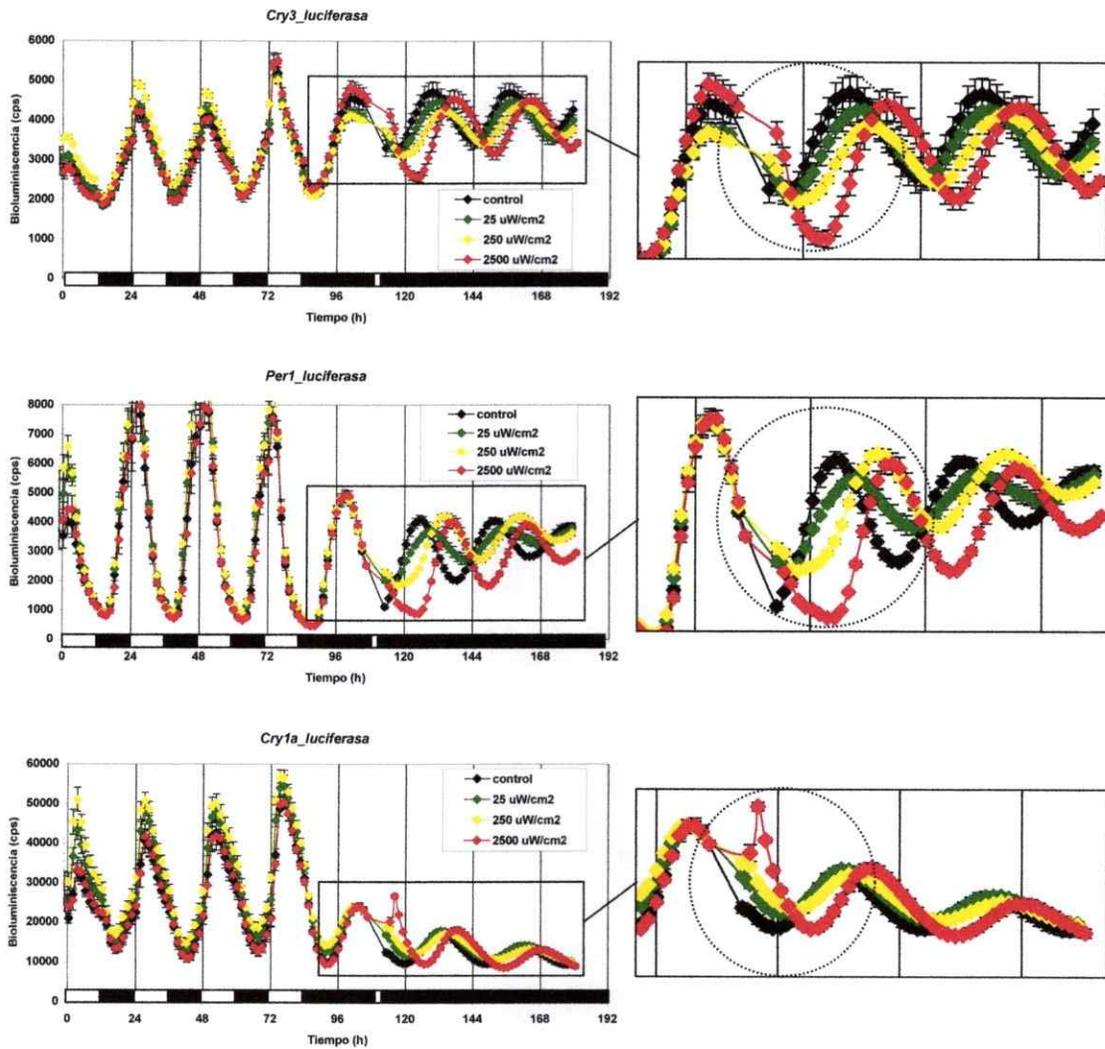


Figura 18. Respuesta del reportero de *Cry3* a pulsos de luz. Ensayos de bioluminiscencia con los reporteros de *Cry3* (panel superior), *Per1* (en medio) y *Cry1a* (panel inferior). Los trazados representan el valor promedio (\pm SD) de 4 pocillos observado durante 3 días de entrenamiento a ciclos LD 12:12, seguidos por 3 días de DD. Los pulsos de luz de 15 min de duración (luz blanca, 400–700 nm) fueron administrados durante el primer ciclo DD, a CT 16. Las intensidades de luz aplicadas correspondieron a 0 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (negro), 25 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (verde), 250 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (amarillo) y 2500 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (rojo), respectivamente.

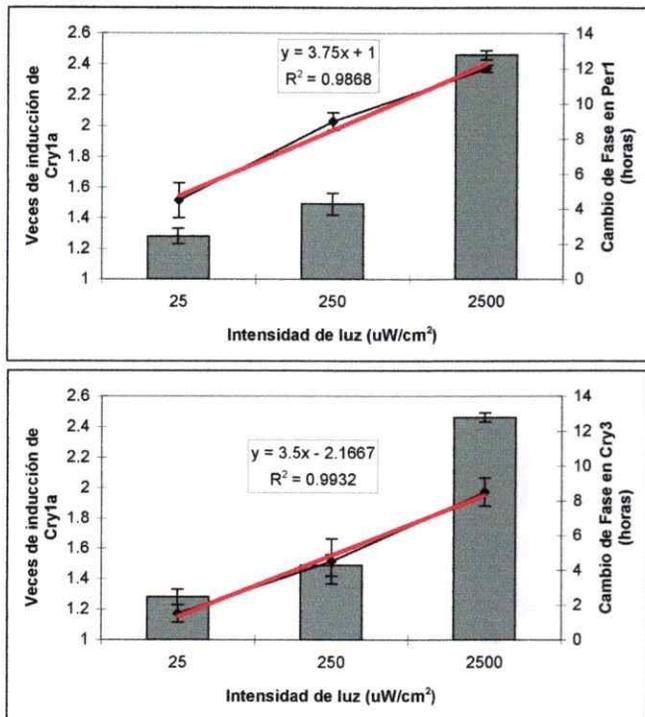


Figura 19. Correlación entre cambios de fase e intensidad de luz. Las células *Cry3-*, *Perl-* y *Cry1a*-luciferasa fueron expuestas a pulsos de luz blanca (400-700 nm) a CT 16 por 15 min a las intensidades de luz indicadas. Cada condición representa el valor promedio (\pm SD) de 4 pocillos. El gráfico de barras representa las veces de inducción del reportero de *Cry1a* en

respuesta a los pulsos de luz; los gráficos lineales representan los cambios de fase en horas observados para los reporteros de *Perl* (arriba) y *Cry3* (abajo).

de luz blanca (400-700 nm) ó monocromática (rango azul, 400-450 nm). Bajo todas las condiciones ensayadas, la expresión del reportero de *Cry3* experimenta un cambio de fase cuya magnitud en horas es proporcional a la intensidad de luz administrada. Además, tanto la magnitud como el sentido del cambio de fase muestran dependencia del tiempo circadiano (CT) al que se administra el pulso (Figura 20).

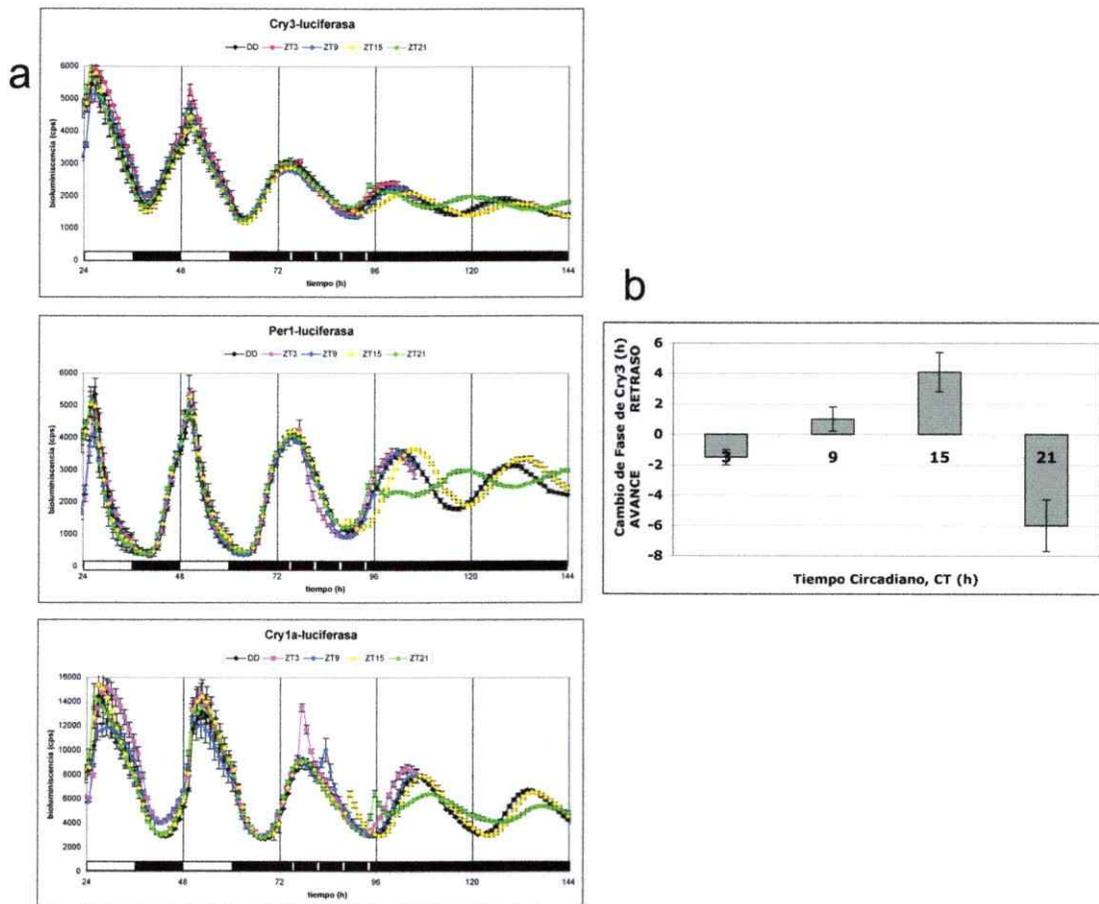
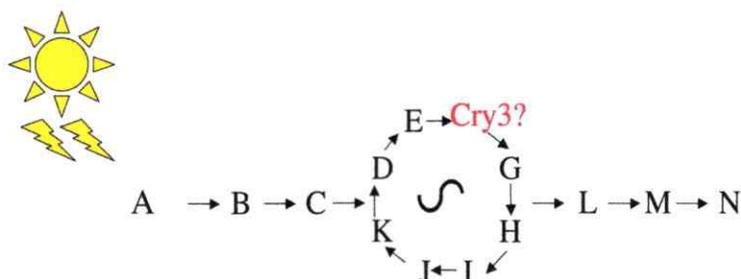


Figura 20. Cambios de fase de *Cry3* en respuesta a pulsos de luz administrados a diferentes tiempos circadianos. (a) Ensayos de bioluminiscencia con los reporteros de *Cry3* (arriba), *Perl* (en medio) y *Cry1a* (abajo). Los trazados representan el valor promedio (\pm SD) de 4 pocillos observado durante 2 días de entrenamiento a ciclos LD 12:12, seguidos por 3 días de DD. Los pulsos de luz de 15 min de duración (luz azul, 400-450 nm; 750 μ W/cm²) fueron administrados durante el primer ciclo DD, a CT 3 (rosado), 9 (azul), 15 (amarillo) ó 21 (verde). Como control, una de las placas se mantuvo en DD (negro). (b) Gráfico de barras representativo de los cambios de fase del reportero *Cry3*-luciferasa observados en (a). Los valores negativos y positivos corresponden a avances o retrasos en la fase, respectivamente.

Conclusiones Parciales (Primer Objetivo Específico)

- *Cry3* se expresa en todos los tejidos del embrión, pero con mayor intensidad en la cabeza, los primordios de las aletas y el tubo digestivo primitivo.
- Embriones y células PAC2 entrenados a ciclos LD 12:12 exhiben transcripción rítmica de *Cry3*, con niveles máximos de expresión entre ZT 21-3.
- Embriones mantenidos en oscuridad constante exhiben bajos niveles de *Cry3*. En ausencia de entrenamiento a ciclos LD 12:12, no se observa oscilación del mensajero.
- La línea celular reportera de *Cry3* muestra que la expresión de este gen oscila de manera circadiana.
- El patrón de oscilación exhibido por las células reporteras entrenadas a ciclos LD 12:12 coincide con el patrón de expresión endógeno de *Cry3*.
- En respuesta a pulsos de luz, la expresión del reportero de *Cry3* experimenta cambios de fase proporcionales a la intensidad de luz administrada. Además, tanto la magnitud como el sentido del cambio de fase muestran dependencia del tiempo circadiano (CT) al que se administra el pulso.

2. Participación de Cry3 en el mecanismo central del reloj circadiano de pez cebra.



2.1 Interacción con proteínas centrales del reloj circadiano.

Estudios *in vitro* publicados por el grupo de Takeshi Todo (Hirayama y col., 2003b) han sugerido que Cry3, a diferencia de Cry1a, no se une directamente a los componentes centrales del reloj, CLOCK y BMAL. A partir de este antecedente, decidimos evaluar las interacciones de Cry3 con las proteínas centrales del reloj circadiano de pez cebra haciendo uso de ensayos de doble híbrido en levaduras. Para comenzar, evaluamos la interacción de Cry3 con el heterodímero CLOCK1/BMAL1 y, de acuerdo a nuestros resultados, Cry3 sí es capaz de interactuar con estas proteínas (Figura 21a). Un análisis más detallado de dichas interacciones sugiere que Cry3 interactúa con el dominio PAS B de CLOCK1 y los dominios C-terminal y bHLH de BMAL1 (Figura 21b).

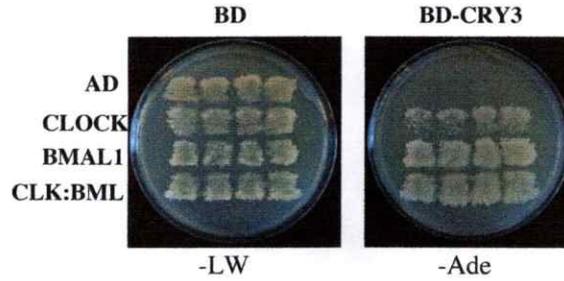
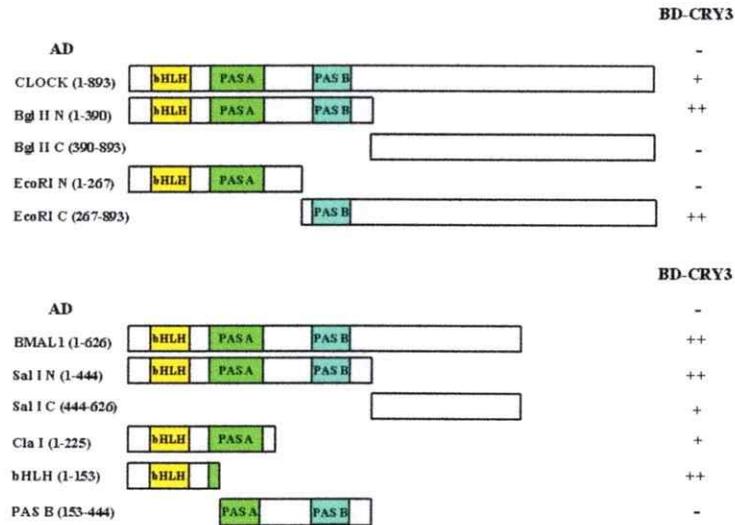
a**b**

Figura 21. Análisis de la interacción de *Cry3* con las proteínas *CLOCK1* y *BMAL1*. (a) La región codificante de *Cry3* fue fusionada al dominio de unión a DNA de GAL4 (BD) para evaluar su interacción con las proteínas *CLOCK1* ó *BMAL1* fusionadas al dominio de activación de GAL4 (AD). (b) Constructos con diferentes deleciones de las proteínas *CLOCK1* y *BMAL1* fueron fusionados al dominio AD de GAL4 para ensayar su interacción con *Cry3*. ++ representa interacción fuerte, y - indica ausencia de interacción.

Luego, evaluamos la interacción de Cry3 con los 3 diferentes PERs de pez cebra. De acuerdo al crecimiento de los transformantes en medio -Ade se observa que, aún cuando Cry3 es capaz de unirse directamente a todos ellos, su interacción con Per1 parece más bien débil. Al ensayar la interacción de Cry3 con 2 diferentes constructos de Per2, correspondientes a deleciones de sus dominios N- ó C-terminal, se observa que Cry3 interactúa con el dominio C-terminal de esta proteína (Figura 22).

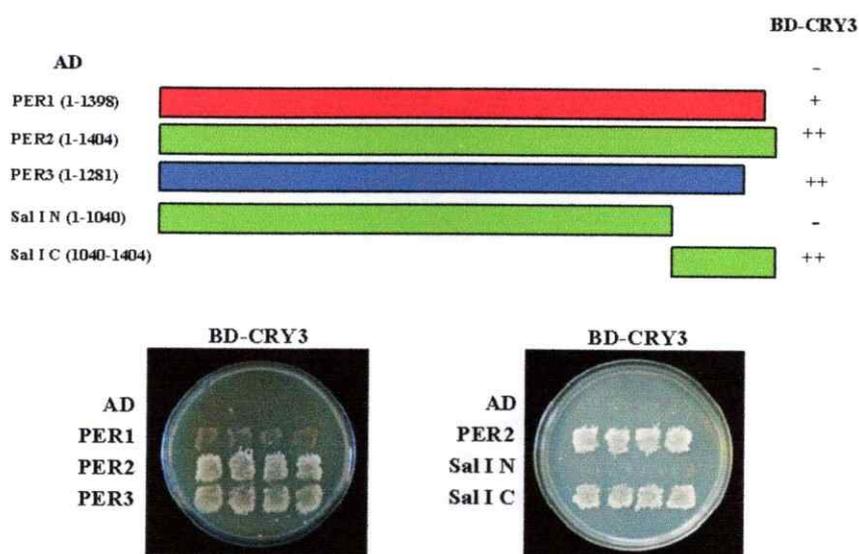


Figura 22. Análisis de la interacción de Cry3 con las proteínas PERs. Las regiones codificantes de Per1 (rojo), Per2 (verde) y Per3 (azul) fueron fusionadas al dominio de activación de GAL4 (AD) para evaluar su interacción con Cry3 fusionado al dominio de unión a DNA de GAL4 (AD). En paralelo, se evaluó la interacción de Cry3 con los dominios N- ó C-terminal de Per2. ++ representa interacción fuerte, y - indica ausencia de interacción.

2.2 Efecto de la sobreexpresión de Cry3 en líneas celulares reporteras.

Cry3 ha sido clasificado como un criptocromo del tipo no-represor de la transcripción activada por CLOCK/BMAL (Kobayashi y col., 2000). Entonces, luego de mostrar que la proteína es capaz de interactuar con proteínas centrales del reloj, nos concentramos en estudiar cuál es la relevancia funcional de dichas interacciones. Para ello, transfectamos las líneas celulares Perl- y Cryla-luciferasa con la proteína Cry3 fusionada al epítipo myc en su extremo C-terminal (CRY3-myc), haciendo uso de un constructo retroviral. En paralelo, las células fueron transfectadas con el vector vacío (pCLNCX) ó con uno de los constructos de CLOCK1 evaluados previamente en los ensayos de doble híbrido en levaduras (delección Bgl II, Figura 21b). En este constructo retroviral, denominado Flag-CLOCKDN, la proteína Clock está fusionada al epítipo Flag en su extremo N-terminal y conserva los dominios de unión a DNA y de heterodimerización con la proteína Bmal (Tamai y col., 2007), pero carece del dominio C-terminal de transactivación. Las transfecciones fueron realizadas en poblaciones clonales de ambos reporteros y la expresión de los constructos fue evaluada por análisis de

bioluminiscencia y Western Blot, antes de proceder con la selección de clones por citometría de flujo (Figura 23).

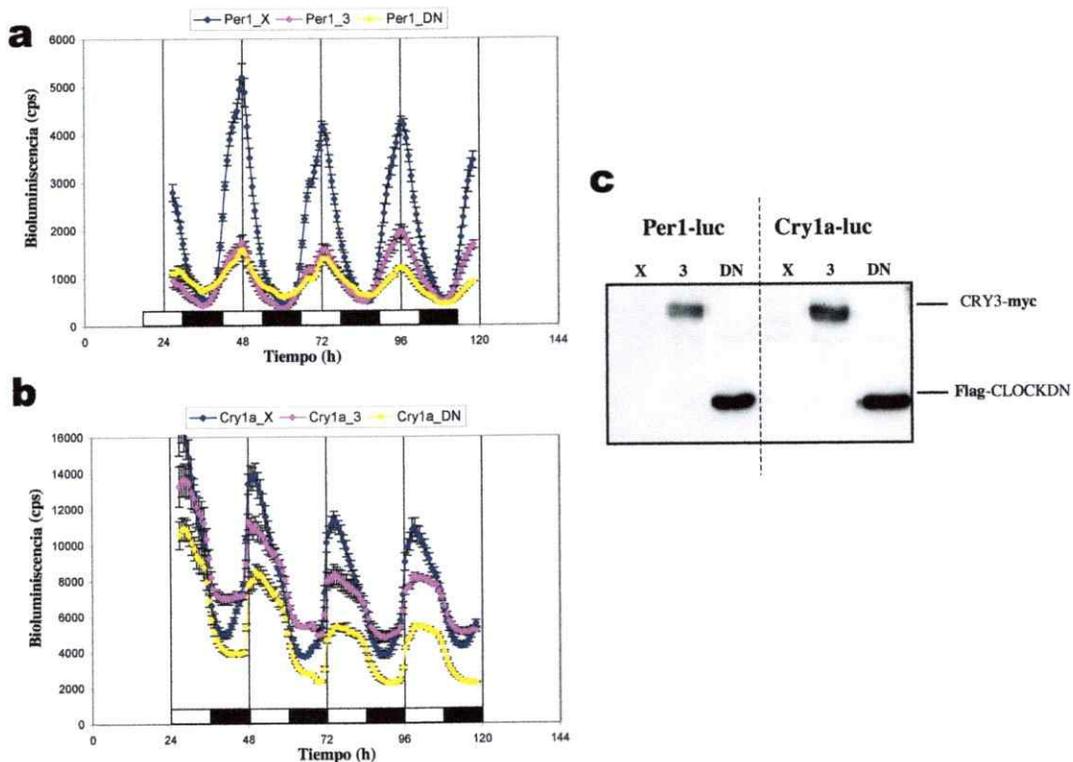


Figura 23. Sobreexpresión de *Cry3* en líneas celulares de pez cebra. A la izquierda, ensayos de bioluminiscencia en poblaciones clonales de células *Per1*- (a) ó *Cry1a*-luciferasa (b) transfectadas con los constructos retrovirales *CRY3*-myc (rosa), *Flag-CLOCKDN* (amarillo) ó el vector retroviral vacío *pCLNCX* (azul). Los trazados representan el valor promedio (\pm SD) de 4 pocillos observado durante 4 días de entrenamiento a ciclos LD 12:12. (c) Análisis de la expresión de los constructos retrovirales transfectados en lisados totales de células reporteras de *Per1* ó *Cry1a* por Western Blot con anticuerpos anti-myc (1:2000) y anti-Flag (1:1000).

2.2.1 Sobreexpresión en células *Per1*-luciferasa

Los clones de células reporteras de *Per1* transfectadas con los constructos de CRY3 ó CLOCKDN fueron analizados por inmunocitoquímica y ensayos de bioluminiscencia (Figura 24). La sobreexpresión de ambos constructos provoca una disminución dramática en la amplitud de oscilación del reportero *Per1*-luciferasa durante el entrenamiento a ciclos LD 12:12 y, elimina por completo la expresión rítmica de éste cuando las células son transferidas a DD. La localización subcelular de CRY3-myc es predominantemente nuclear y Flag-CLOCKDN parece distribuirse de manera uniforme entre núcleo y citoplasma (Figura 24).

2.2.2 Sobreexpresión en células *Cry1a*-luciferasa

En paralelo, evaluamos el efecto de la sobreexpresión de *Cry3* en la línea celular reportera de *Cry1a*, cuya expresión no sólo es controlada por el reloj circadiano, sino además, es directamente inducida por luz. En este caso, los ensayos de bioluminiscencia revelan que *Cry3*, al igual que CLOCKDN, elimina por completo el componente circadiano del patrón de expresión de *Cry1a* (Figura 25). Así, con niveles constantemente elevados de *Cry3* y bajo un régimen LD 12:12, el perfil de expresión de las células *Cry1a*-luciferasa adopta la forma del ciclo LD administrado,

con 12 h de inducción seguidas por 12 h de expresión basal. Una vez transferidas a DD, las células exhiben ausencia absoluta de ritmo.

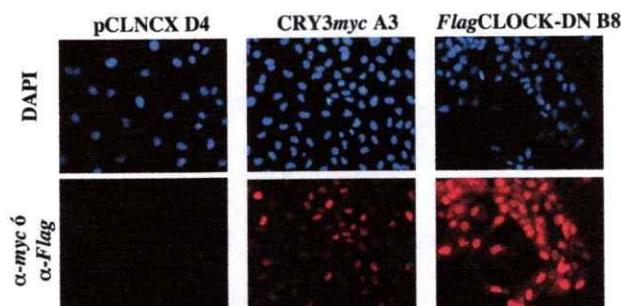
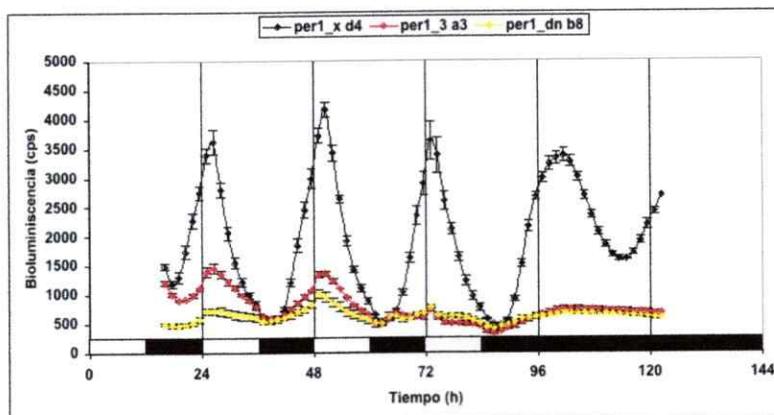


Figura 24. Efecto de la sobreexpresión de *Cry3* en células *Per1*-luciferasa. El panel superior corresponde a un ensayo de bioluminiscencia en clones de células reporteras de *Per1* transfectadas con el vector retroviral vacío (negro), *CRY3*-myc (rojo) ó *Flag*-*CLOCKDN* (amarillo). Los trazados representan el valor promedio (\pm SD) de 4 pocillos observado durante 3 días de entrenamiento a ciclos LD 12:12, seguidos por DD. El panel inferior muestra las distribuciones subcelulares de *CRY3* y *CLOCKDN* en células *Per1*-luciferasa, evaluadas por inmunocitoquímica con anticuerpos anti-myc (1:2000) y anti-Flag (1:1000), respectivamente. Ambos anticuerpos fueron conjugados con el anticuerpo secundario AlexaFluor 594 (rojo). Los núcleos fueron teñidos con 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1:50000).

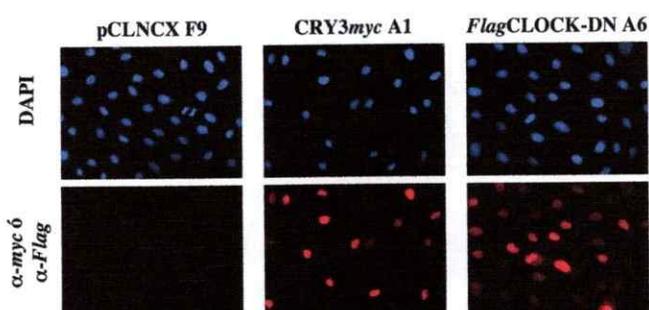
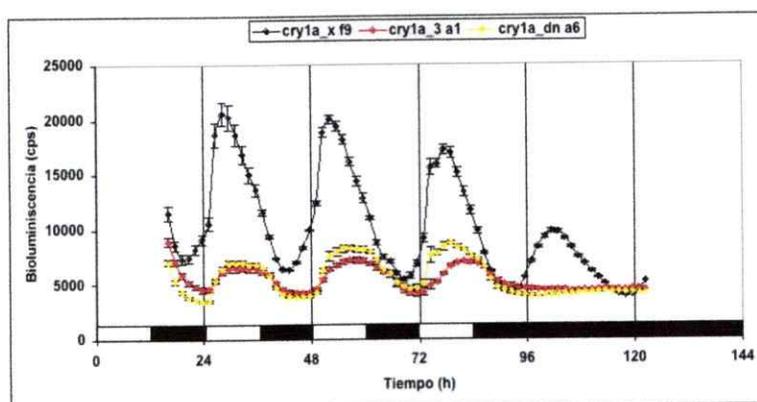


Figura 25. Efecto de la sobreexpresión de *Cry3* en células *Cry1a*-luciferasa. El panel superior corresponde a un ensayo de bioluminiscencia en clones de células reporteras de *Cry1a* transfectadas con el vector retroviral vacío (negro), *CRY3*-myc (rojo) ó *Flag*-CLOCKDN (amarillo). Los trazados representan el valor promedio (\pm SD) de 4 pocillos observado durante 3 días de entrenamiento a ciclos LD 12:12, seguidos por DD. El panel inferior muestra las distribuciones subcelulares de *CRY3* y *CLOCKDN* en células *Cry1a*-luciferasa, evaluadas por inmunocitoquímica con anticuerpos anti-myc (1:2000) y anti-Flag (1:1000), respectivamente. Ambos anticuerpos fueron conjugados con el anticuerpo secundario AlexaFluor 594 (rojo). Los núcleos fueron teñidos con 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1:50000).

2.3 Efecto del bloqueo transitorio de la traducción de *Cry3* en la expresión relativa de genes controlados por el reloj.

Con el fin de evaluar qué ocurre con los transcritos controlados por el reloj circadiano en ausencia de la proteína *Cry3*, decidimos hacer uso de un oligonucleótido morfolino complementario a la región del codón de inicio de la traducción de *Cry3* para bloquear de modo transitorio la expresión de la proteína en embriones de pez cebra (Figura 26).

Embriones inyectados con el morfolino de *Cry3* ó con un morfolino control, fueron entrenados a 2 ciclos LD 12:12 y al tercer día, se extrajo el RNA cada 4 h, a partir de las 51 hpf. Las muestras fueron procesadas bajo las condiciones de iluminación del ciclo LD administrado (ZT 3, 9, 15 y 21), o bien, en absoluta oscuridad (CT 3, 9, 15 y 21). Los morfantes no presentaron fenotipo visible comparado con los embriones no inyectados.

Los niveles de expresión de *Per1* y *Cry3* fueron analizados por qRT-PCR y normalizados contra los niveles de expresión del gen endógeno *RpL13 α* , gen de referencia validado para análisis de expresión temporal y tejido-específica en pez cebra (Tang y col., 2007) (Figura 27).

Los valores graficados corresponden a la inducción de la expresión de los mensajeros relativa al valor de expresión absoluto observado a ZT (ó CT) 15 en embriones inyectados con el morfolino control.

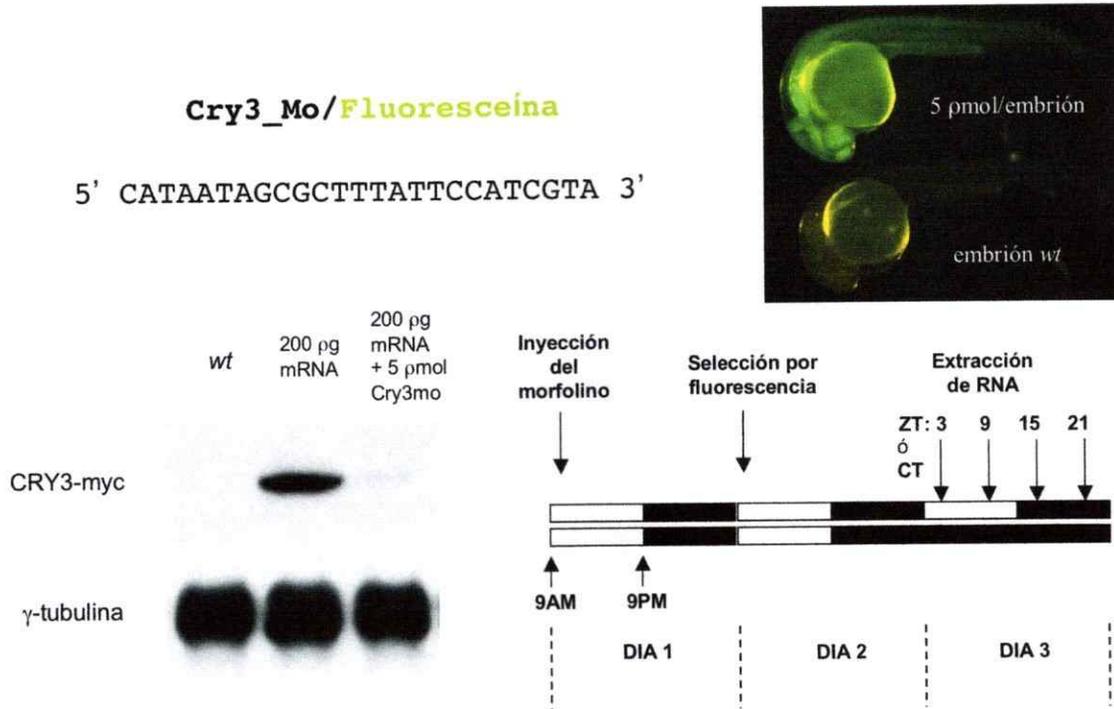


Figura 26. Bloqueo transitorio de la expresión de *Cry3* en embriones de pez cebra. La figura superior derecha muestra un embrión de pez cebra silvestre no inyectado (*wt*) y uno de sus pares inyectado con 5 µmoles del morfolino de *Cry3*, observados bajo una lupa de disección. La fluorescencia del morfante se debe a que el morfolino está acoplado a fluoresceína. El panel inferior izquierdo corresponde a un Western Blot usando anticuerpo anti-myc en embriones silvestres y sus pares inyectados con 200 µg del mRNA de CRY3-myc, o co-inyectados con 5 µmoles del morfolino de *Cry3*. A la derecha, un diagrama del protocolo experimental. Los períodos de luz ó oscuridad han sido representados por barras blancas o negras, respectivamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la ausencia de Cry3 en las primeras horas de desarrollo del pez afecta significativamente los niveles de expresión de *Perl*, con tendencia a disminuir la amplitud de oscilación de este gen bajo un régimen LD (Figura 27a). La Tabla 1 resume los valores obtenidos en el análisis de varianza de 2 factores (efecto del morfolino de Cry3 y/o efecto del tiempo circadiano [CT]) aplicado a los datos graficados en la Figura 27. Así, por ejemplo, bajo el ciclo LD, existe una diferencia significativa ($F=326,269$; $p<0,001$) en los valores promedio de expresión relativa de *Perl* entre los diferentes tiempos circadianos (ZT). A su vez, la inyección del morfolino de Cry3 tiene un efecto significativo ($F=16,032$; $p=0,001$) en los valores de expresión observados para los diferentes ZTs. Además, existe una interacción estadísticamente significativa ($F=13,513$; $p<0,001$) entre ambos factores, es decir, el efecto del morfolino de Cry3 depende de la hora circadiana evaluada.

Bajo condiciones de oscuridad constante (DD), ambos factores afectan significativamente los niveles de expresión de *Perl*. Los embriones inyectados con el morfolino control conservan el patrón de expresión observado en LD, pero con una amplitud de oscilación muy

disminuida. Los morfantes de Cry3, en cambio, exhiben niveles de expresión relativamente constantes durante el día subjetivo (CT 3 y 9) que duplican el valor de la expresión observado durante la noche subjetiva (CT 15 y 21).

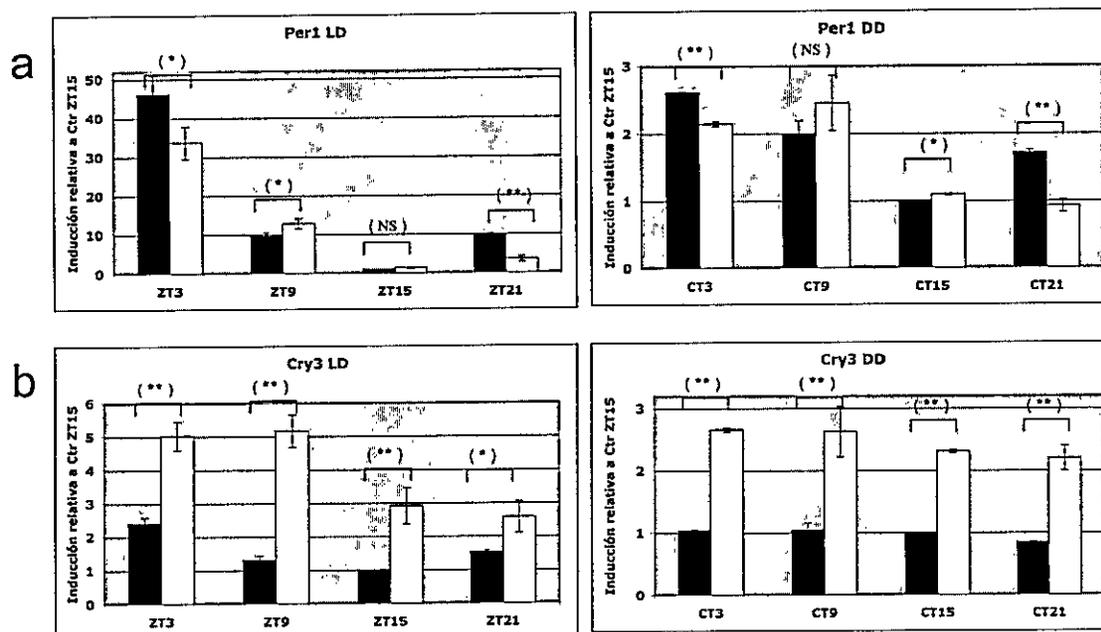


Figura 27. Patrón de expresión de genes regulados por el reloj en ausencia de Cry3. La expresión rítmica de *Per1* (a) y *Cry3* (b) fue evaluada por qRT-PCR en embriones inyectados con 5 pmoles del morfolino de Cry3 (blanco) ó igual cantidad de un morfolino control (negro). Cada una de las barras corresponde al promedio (\pm SD) de 3 experimentos independientes desarrollados por triplicado. Los valores presentados en los gráficos fueron comparados por análisis estadístico t-Student [(**)= $P < 0.01$; (*)= $P < 0.05$; (NS)= diferencia no significativa].

Es importante mencionar que en los embriones inyectados con el morfolino control, los valores de inducción de *Per1* durante las primeras horas del día en LD (ZT 3) son, al menos, 10 veces superiores a los observados durante la fase oscura del ciclo (ZT 15). Esta conducta es similar a la observada en los trazados de bioluminiscencia con la línea celular reportera *Per1-luciferasa*.

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de varianza para dos factores (2-way ANOVA) de los datos graficados en la Figura 27. M, corresponde al efecto de la inyección del morfolino de *Cry3*; CT, corresponde al efecto del tiempo circadiano y MxCT, corresponde a la interacción entre ambos factores.

		LD			DD		
		Grados de libertad	F	p	Grados de libertad	F	p
Per1	M	1	16,032	0,001	1	14,993	0,001
	CT	3	326,269	<0,001	3	76,113	<0,001
	M x CT	3	13,513	<0,001	3	16,680	<0,001
Cry3	M	1	268,789	<0,001	1	390,054	<0,001
	CT	3	36,471	<0,001	3	6,247	0,005
	M x CT	3	17,223	<0,001	3	1,877	0,174

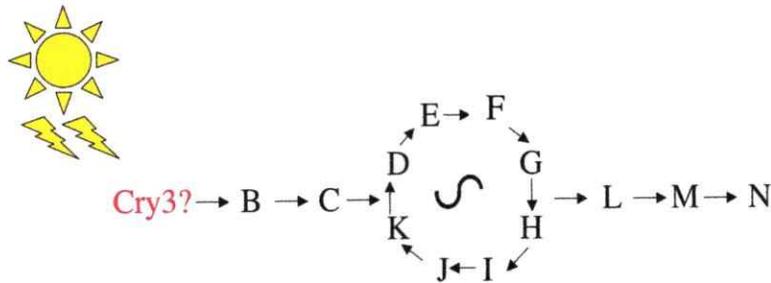
El análisis por qRT-PCR del patrón de expresión del mensajero de *Cry3* en embriones inyectados con el morfolino

control, confirma que la amplitud de oscilación de *Cry3* es mucho más discreta que la observada para *Perl*. El bloqueo transitorio de la expresión de la proteína, provoca un aumento significativo en los niveles de expresión del mensajero de *Cry3* a todas las horas evaluadas, sin importar el régimen de luz administrado (Figura 27b). Además, bajo un ciclo LD, los niveles de expresión de *Cry3* observados durante el período en que se enciende la luz casi duplican en valor a aquellos observados en oscuridad.

Conclusiones Parciales (Segundo Objetivo Específico)

- *Cry3* interactúa directamente con CLOCK1, BMAL1 y con las 3 proteínas PER descritas en pez cebra.
- La sobreexpresión de *Cry3* en líneas celulares del pez reduce o detiene la oscilación de genes como *perl* y *cryla*.
- La localización subcelular de la proteína es predominantemente nuclear.
- El bloqueo transitorio de la expresión de *Cry3* en embriones de pez cebra provoca un aumento significativo en los niveles de expresión del mRNA de *Cry3*.

3. Rol de Cry3 en fotorrecepción circadiana.



Los resultados de la sobreexpresión de Cry3 en las líneas celulares reporteras de *Per1* y *Cry1a*, sugieren que Cry3 es capaz de actuar como un represor del mecanismo central del reloj circadiano de pez cebra. Lo anterior, dificulta la posibilidad de diseñar experimentos "limpios", que permitan evaluar un posible rol de la proteína en fotorrecepción, excluyendo su rol como represor.

En esta dirección, decidimos estudiar la curva de intensidad de respuesta a un pulso de luz monocromática (luz azul, 400-450 nm) en células *Cry1a*-luciferasa, comparando el efecto de la sobreexpresión de Cry3 (CRY3-myc) versus el efecto de la sobreexpresión del dominante negativo de la proteína CLOCK (Flag-CLOCKDN) en dicha respuesta. De esta manera, si Cry3 actúa sólo como un represor del reloj circadiano, la respuesta esperada en ambos casos sería semejante, es decir, la inducción de la expresión de *Cry1a* frente a un pulso de luz de determinada intensidad debería

permanecer constante, sin importar la hora subjetiva (CT) a la que se administre, puesto que el reloj está "detenido". Por otra parte, si Cry3 cumple algún rol en fotorrecepción, es de esperar que los clones que sobreexpresan Cry3 respondan con mayor sensibilidad que sus pares que sobreexpresan CLOCKDN a los pulsos de luz azul administrados. En paralelo, también decidimos evaluar el efecto del bloqueo transitorio de Cry3 en la expresión temprana de genes inducidos por luz, en embriones de pez cebra inyectados con el morfolino de Cry3.

3.1 Efecto de la sobreexpresión de Cry3 en la respuesta de células *Cryla*-luciferasa a pulsos de luz monocromática.

La respuesta de inducción aguda de *Cryla* frente a un pulso de luz ha sido descrita previamente (Tamai y col., 2004; Hirayama y col., 2005; Tamai y col., 2007). La magnitud de la inducción varía de acuerdo a la intensidad de luz aplicada y a la fase del ciclo circadiano en que el pulso es administrado.

En nuestros experimentos, hemos decidido comparar la inducción de *Cryla* bajo dos condiciones que, en base a los ensayos de bioluminiscencia aquí documentados, deberían

eliminar el fenómeno de dependencia de fase descrito. Por otra parte, decidimos utilizar luz monocromática (filtro 400-450 nm, 750 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) para restringir la respuesta observada al rango de luz azul y, así evaluar un posible rol de Cry3 como fotopigmento en células Cry1a-luciferasa que sobreexpresan la proteína.

Los resultados obtenidos confirman que, tanto la sobreexpresión de Cry3, como la del dominante negativo de Clock, eliminan por completo la dependencia de fase de la respuesta. Así, de acuerdo a análisis de varianza (ANOVA), la hora circadiana en que se administra el pulso de luz afecta significativamente la inducción aguda de Cry1a en células reporteras tranfectadas con el vector retroviral vacío ($F_{3,11}=8,739$; $P=0,007$) y NO afecta la respuesta de las células transfectadas con CRY3-myc ($F_{3,11}=0,2262$; $P=0,876$) ó con Flag-CLOCKDN ($F_{3,11}=0,3802$; $P=0,770$) (Figura 25).

Al comparar los valores promedio de inducción de Cry1a en las dos diferentes condiciones, se observa claramente que la sobreexpresión de Cry3 no aumenta la sensibilidad de las células a los pulsos de luz administrados, sino más bien, mantiene una respuesta discreta (~1,5 veces) respecto de la observada en células que sobreexpresan el dominante negativo de Clock (~2 veces).

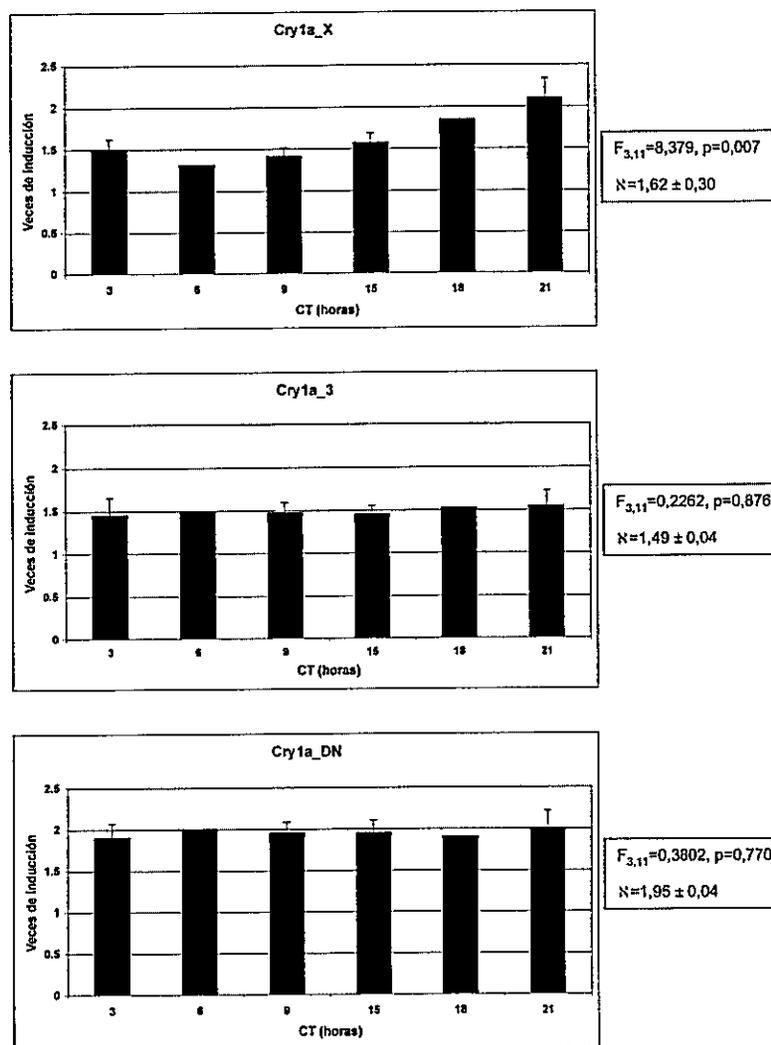


Figura 28. Efecto de la sobreexpresión de *Cry3* en la respuesta de células *Cry1a*-luciferasa a pulsos de luz monocromática. Células reporteras de *Cry1a* transfectadas con pCLNCX (panel superior), *CRY3*-myc (en medio) ó Flag-CLOCKDN (panel inferior) fueron entrenadas por 3 días a ciclos LD 12:12, transferidas a DD y expuestas por 15 min a un pulso de luz azul (400-450 nm, 750 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) a CT 3, 6, 9, 15, 18 ó 21. Los valores de cada barra corresponden al promedio de 3 experimentos independientes ($\pm\text{SD}$) realizados por cuadruplicado, excepto en CT 6 y 18, que corresponden a experimentos únicos. Los datos fueron analizados por ANOVA.

En conjunto, estos resultados sugieren que niveles constantemente elevados de *Cry3* detienen el reloj circadiano y que *Cry3* no parece actuar como un simple fotopigmento en las células de pez cebra, al menos no en forma directa.

3.2 Efecto del bloqueo transitorio de la traducción de *Cry3* en la expresión relativa de genes inducidos por luz.

Los niveles de expresión de *Cry1a*, *Per2* y *6,4-fotoliasa* (*6,4Ph*) fueron analizados por qRT-PCR y normalizados contra los niveles de expresión de *RpL13 α* . Todos los valores graficados corresponden a la inducción de la expresión de los mensajeros relativa al valor de expresión absoluto observado a ZT (ó CT) 15 en embriones inyectados con el morfolino control (Figura 29).

De acuerdo a los resultados obtenidos bajo ciclos LD, la ausencia de *Cry3* en estadios tempranos del desarrollo del pez parece provocar una disminución significativa en los niveles de expresión de *Cry1a* y *6,4Ph* a las horas en que *Cry3* alcanza su máxima expresión (ZT 21-3) (Figura 29a,c; Tabla 2). Lo anterior no ocurre con el mensajero de *Per2*, cuyos niveles de expresión se mantienen inalterados

en embriones inyectados con el morfolino de Cry3 (Figura 29b; Tabla 2).

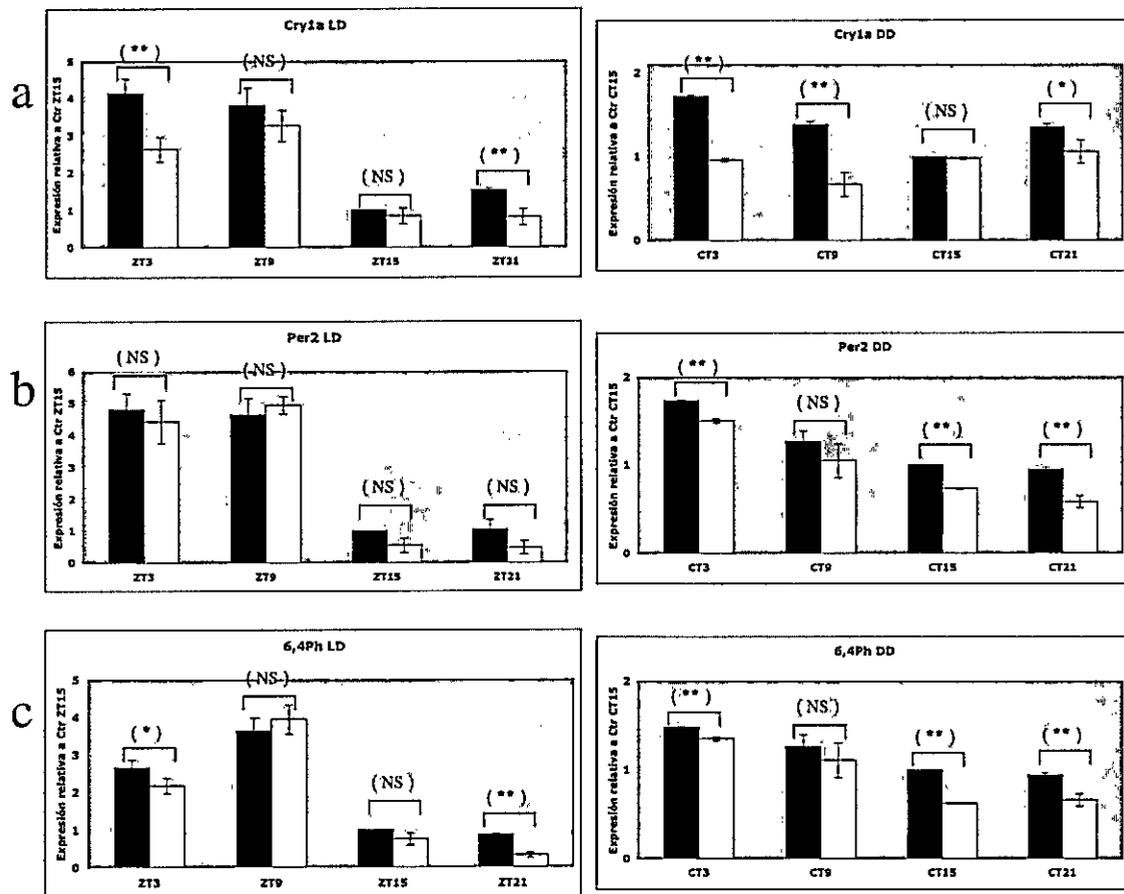


Figura 29. Patrón de expresión de genes inducidos por luz en ausencia de Cry3. La expresión rítmica de *Cry1a*, *Per2* y 6,4-fotoliasa fue evaluada por qRT-PCR en embriones inyectados con 5 pmoles del morfolino de Cry3 (blanco) ó igual cantidad de un morfolino control (negro). Cada una de las barras corresponde al promedio (\pm SD) de 3 experimentos independientes desarrollados en triplicado. Los valores fueron comparados por análisis estadístico t-Student [(**)= $P < 0.01$; (*)= $P < 0.05$; (NS)= diferencia no significativa].

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de varianza para dos factores (2-way ANOVA) de los datos graficados en la Figura 29. M, corresponde al efecto de la inyección del morfolino de Cry3; CT, corresponde al efecto del tiempo circadiano y MxCT, corresponde a la interacción entre ambos factores.

		LD			DD		
		Grados de libertad	F	p	Grados de libertad	F	p
Cryla	M	1	33,934	<0,001	1	137,149	<0,001
	CT	3	122,864	<0,001	3	10,512	<0,001
	M x CT	3	5,012	0,012	3	18,293	<0,001
Per2	M	1	2,931	0,106	1	82,604	<0,001
	CT	3	198,985	<0,001	3	117,481	0,005
	M x CT	3	1,464	0,262	3	2,082	0,143
6,4Ph	M	1	7,539	0,014	1	58,586	<0,001
	CT	3	276,299	<0,001	3	62,197	<0,001
	M x CT	3	4,775	0,015	3	2,631	0,086

En condiciones DD, en cambio, los 3 genes evaluados ven disminuidos sus niveles máximos de expresión en forma significativa respecto de la situación control. Esto último refuerza la idea de que Cry3 actúa más bien como un componente central del reloj y, que bajo condiciones de

entrenamiento a ciclos LD, su función puede verse enmascarada por el efecto directo de la luz sobre la expresión de genes blanco del reloj.

Conclusiones Parciales (Tercer Objetivo Específico)

- La sobreexpresión de Cry3 NO aumenta la sensibilidad de éstas en respuesta a pulsos de luz azul.
- La sobreexpresión de Cry3 en células Cryla-luciferasa elimina la regulación circadiana de la vía de entrada de luz.
- El bloqueo transitorio de la expresión de Cry3 en embriones de pez cebra entrenados bajo ciclos LD, NO afecta significativamente los niveles de expresión de genes predominantemente inducidos por luz, como *period2*.

DISCUSION

1. Ventajas que ofrece el Pez Cebra como modelo para el estudio del reloj circadiano.

El estudio del sistema circadiano en ratón ha permitido demostrar que la organización básica del mecanismo del reloj en *Drosophila* ha sido conservada en vertebrados, razón por la cual no es sorprendente que los teleostos y la mayoría de los otros vertebrados expresen homólogos de *Clock*, *Bmal*, *Per* y *Cry*. Sin embargo, una peculiaridad del sistema circadiano de pez cebra es la presencia de múltiples copias de los genes del reloj que, en teoría, genera 3 posibles escenarios: 1) las múltiples copias son funcionalmente redundantes, 2) cada copia cumple una función especializada ó 3) una combinación de ambos procesos. La evidencia actual apoya la idea de que el sistema circadiano de pez cebra ha experimentado una "división de tareas" y que las diversas copias de los genes del reloj contribuyen diferencialmente en la regulación de éste (Cermakian y col., 2000 y 2002; Kobayashi y col., 2000; Pando y col., 2001; Hirayama y col., 2005; Tamai y col., 2007).

Uno de los hallazgos más relevantes relacionado a la organización del sistema circadiano de pez cebra ha sido el descubrimiento de relojes periféricos directamente entrenables por exposición a ciclos LD en la mayoría de sus tejidos y órganos. El pez cebra fue el primer modelo vertebrado en el que se demostró la presencia de relojes circadianos periféricos (Whitmore y col., 1998). A la fecha, los teleostos son los únicos vertebrados que poseen relojes periféricos independientes que, al igual que en *Drosophila*, pueden ser entrenados directamente por luz. Aún cuando diversos tejidos de mamíferos también han mostrado poseer relojes circadianos, éstos no responden directamente a entrenamiento por luz y requieren del marcapasos central para ser sincronizados (Yoo y col., 2004). Una excepción interesante, sin embargo, es la retina de mamíferos que ha mostrado no sólo contener un reloj, sino además responder directamente a entrenamiento por luz (Tosini y Menaker, 1996; Tosini y col., 2007). En este sentido, el sistema circadiano de mamíferos parece haber conservado un tejido con características similares a las exhibidas por los tejidos periféricos de pez cebra. No obstante, la retina es un tejido muy difícil de cultivar y degenera relativamente rápido; se trata de una estructura altamente diferenciada y

todos los intentos realizados para obtener líneas celulares a partir de ella han fracasado. Actualmente, algunos grupos en University College London (Reino unido) están comenzando a estudiar los relojes circadianos en líneas celulares troncales de retina con el propósito de establecer, en principio, si efectivamente éstas poseen un reloj.

Al igual que la mayoría de los tejidos, las líneas celulares derivadas de embriones de pez cebra disociados por tratamiento con tripsina (células PAC2 ó Z3) poseen relojes directamente entrenables por luz y, por lo tanto, representan una herramienta valiosa para explorar las bases moleculares de la sensibilidad periférica a la luz. Una de las principales ventajas del uso de ensayos de bioluminiscencia en estas células fotosensibles es que no requieren de la exposición a luz para la visualización de la expresión del reportero. Sin embargo, una complicación potencial de esta técnica es la posibilidad de que la bioluminiscencia emitida por el reportero pueda influenciar directamente el reloj. Ensayos de protección de RNasa han demostrado que este fenómeno de "auto-entrenamiento" en células PAC2 es poco probable, puesto que al agregar luciferina en el medio de cultivo bajo condiciones de oscuridad constante, no se observa activación de la

expresión de *Per2*, gen inducido por luz (Vallone y col., 2004). Además, nuestro grupo de trabajo ha realizado ensayos de bioluminiscencia en células PAC2 transfectadas con diversos reporteros de luciferasa, como por ejemplo TOPflash (Upstate Biotechnology) [Figura 30], para mostrar que los patrones de expresión exhibidos por los diferentes genes reporteros del reloj son efectivamente el reflejo de la regulación rítmica de la expresión controlada por el reloj y no un mero artefacto de la exposición de las células reporteras a diferentes regímenes de iluminación.

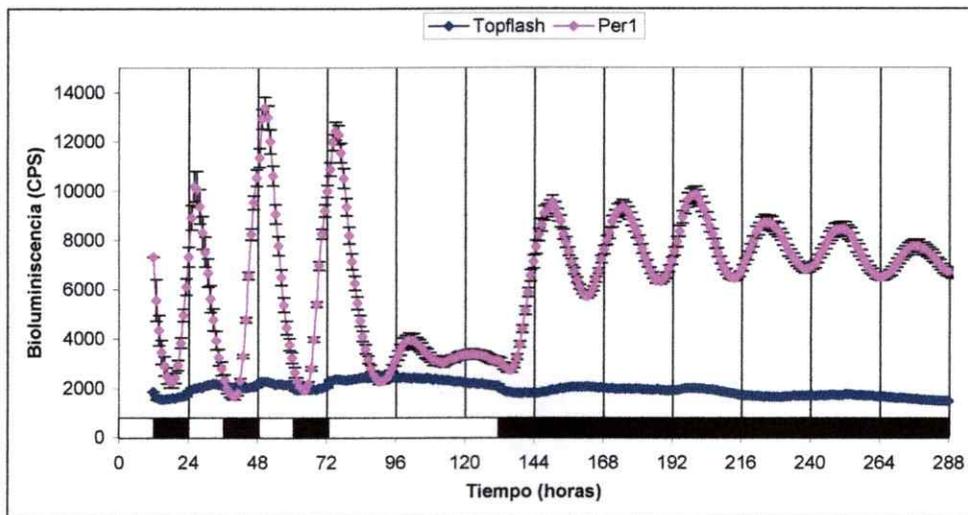


Figura 30. Control de bioluminiscencia con el reportero TOPflash. Ensayo de bioluminiscencia que compara los patrones de expresión de los reporteros TOPflash (azul) y Per1-luciferasa (rosado) bajo diferentes regímenes de iluminación. Los trazados representan el valor promedio (\pm SD) de 4 pocillos observado durante 3 días de entrenamiento a ciclos LD 12:12, seguidos por 2 días bajo LL y 6 días bajo DD.

Una de las observaciones que más destaca en los trazados de bioluminiscencia previamente publicados en células de pez cebra (Vallone y col., 2004; Tamai y col, 2007) y en aquellos documentados en esta tesis, es que exhiben un alto grado de reproducibilidad y estabilidad de la señal emitida por los reporteros, en comparación a aquellos publicados para moscas transgénicas (Plautz y col., 1997). Esta cualidad se debe a la emisión de luz proveniente de una monocapa de células que expresa uniformemente el reportero de luciferasa. En *Drosophila*, en cambio, la cuantificación precisa de la señal emitida por el reportero resulta problemática, puesto que las moscas normalmente se mueven dentro de los pocillos y la eficiencia de detección del fotón varía con las distintas posiciones del animal dentro del pocillo. A la fecha, no ha sido posible obtener líneas celulares reporteras de *Drosophila* que exhiban propiedades similares a las observadas en los tejidos de la mosca.

Otra característica importante de las células PAC2, es que conservan viabilidad por largos períodos de tiempo a confluencia. Esto, sumado a la estabilidad del sustrato (luciferina) en el medio de cultivo y la facilidad con que éste puede difundirse en las monocapas de células, nos

permite monitorear ritmos de gran amplitud por períodos prolongados de tiempo, que contrastan con los ritmos transitorios y de baja amplitud descritos para las líneas celulares de mamíferos (Izumo y col, 2003).

2. ¿Por qué estudiar *Cry3*?

Una de las preguntas básicas que surgen en relación al entrenamiento directo por luz en tejidos y líneas celulares de pez cebra es: ¿cuál es la naturaleza del fotorreceptor presente en cada una de las células?. Actualmente, sabemos que las células PAC2 no expresan los fotorreceptores clásicos presentes en el ojo del pez (Moutsaki y col., 2003) y, por lo tanto, los candidatos favoritos para esta función incluyen a nuevas opsinas y a criptocromos (Cermakian y col., 2002; Moutsaki y col., 2003).

A partir del clonamiento y análisis molecular de los seis genes *cry* de *Danio rerio* (Kobayashi y col., 2000), éstos han sido agrupados en dos categorías: unos capaces de inhibir la transcripción mediada por CLOCK/BMAL de manera similar a como funcionan sus ortólogos mamíferos (CRY tipo represor: *Cry1a*, *-1b*, *-2a* y *-2b*) y otros sin capacidad inhibitoria de la transcripción (CRY tipo no-represor: *Cry3* y *Cry4*), cuya función se desconoce. La posibilidad de que

éstos últimos desempeñen un rol similar al de su ortólogo en *Drosophila*, aún no ha sido estudiada.

Todos los zCRYs se expresan en los diferentes tejidos y en las líneas celulares del pez con patrones de expresión rítmicos y diferentes fases (Kobayashi y col., 2000; Cermakian y col., 2002). En peces entrenados a ciclos LD 14:10, *Cry3* alcanza sus niveles máximos de expresión entre ZT 21 y ZT 1 (Kobayashi y col., 2000), esto es, durante la transición noche-día. Así, *Cry3* es el único de los criptocromos del pez que exhibe expresión abundante en el momento en que se enciende la luz.

Los primeros análisis estructurales y de la distribución subcelular de zCRYs en cultivos celulares mostraron que, a diferencia de los CRY tipo represor, *Cry3* es una proteína citoplasmática que no se asocia a Clock ó Bmal y, por lo tanto, no influencia sus localizaciones subcelulares (Hirayama y col., 2003a y 2003b). Su posible interacción con otras proteínas centrales del reloj no ha sido evaluada.

Por último, un espectro de acción de baja resolución en células Z3, basado en la inducción de *Per2* en respuesta a pulsos de luz monocromática, sugiere la presencia de un fotorreceptor de luz azul en el entrenamiento periférico,

posiblemente un criptocromo. Así, en base a los diferentes patrones de expresión en células no entrenadas y mantenidas en estricta oscuridad, *Cry1b* y *Cry3* han sido propuestos como candidatos atractivos para el rol de fotopigmento circadiano (Cermakian y col., 2002).

3. Patrones de expresión espacial y temporal de *Cry3* en embriones y líneas celulares de pez cebra.

De acuerdo a nuestros ensayos de hibridación *in situ*, *Cry3* se expresa en todo el cuerpo, pero con mayor intensidad en la cabeza, los primordios de las aletas y el tubo digestivo primitivo del embrión. Este resultado sugiere que la función de *Cry3* podría ser tejido-específica, situación que requiere de una evaluación más detallada.

A su vez, los resultados del análisis de la expresión temporal de *Cry3* en embriones por ensayos de protección de RNasa, revelan algunos aspectos interesantes de su regulación durante el desarrollo temprano del pez. En embriones entrenados a ciclos LD 12:12 se observa una gran cantidad inicial de transcrito. Esta muestra corresponde a un estadio de sólo 3 hpf y se considera normalmente como depósito de mRNA materno, puesto que la transcripción

cigótica parece iniciarse durante la transición de mid-blástula (Kane y Kimmel, 1993; Zamir y col., 1997). Dichos embriones muestran una oscilación circadiana robusta de *Cry3*, que se hace evidente a partir de las 48 hpf, con un nivel máximo de expresión similar al que observamos en la línea celular PAC2 con el reportero luminiscente *Cry3-luciferasa*. Sin embargo, la situación observada para embriones mantenidos en estricta oscuridad es muy diferente. Aún se observa un depósito "putativo" inicial de *Cry3* materno, pero los niveles de expresión permanecen muy reducidos y no se detecta un patrón de expresión oscilatorio. El trabajo realizado por Dekens y Whitmore en nuestro laboratorio, por observación de la expresión de *Perl* en embriones bajo distintos regímenes de iluminación, ha mostrado que en estadios tempranos del desarrollo embrionario efectivamente existe un reloj circadiano funcional, pero que en la oscuridad no está sincronizado y, por lo tanto, los niveles de expresión de *Perl* permanecen en un nivel intermedio (Dekens y Whitmore, en revisión). Lo anterior es exactamente el resultado esperado para un embrión donde todas sus células existen simplemente en diferentes fases circadianas; no obstante, la situación para *Cry3* parece ser más complicada, puesto que los niveles

de expresión de este gen observados bajo condiciones DD son mucho más bajos que aquellos observados bajo ciclos LD y, ciertamente están por debajo de lo que podríamos considerar un valor intermedio. Este hallazgo sugiere que la expresión de *Cry3* refleja algo más que la simple desincronización del oscilador circadiano. Un dato clave proviene de la evaluación del nivel de RNA inicial, por contribución materna "putativa" entre las condiciones LD y DD. Bajo DD, la cantidad total de mRNA de *Cry3* parece menor que la observada en LD y, por consiguiente, esto sugiere que la exposición a la luz podría estar estabilizando los transcritos de *Cry3* ó bien retardando su degradación en el embrión.

A pesar de que los ensayos de protección de RNasa en células PAC2 y los diferentes estudios realizados con la línea celular reportera de *Cry3* muestran que la luz no parece influenciar directamente la transcripción del gen, éstos no descartan la posibilidad de que la luz esté actuando a nivel post-transcripcional para mantener niveles elevados del mRNA de *Cry3* en las células. Los ensayos de bioluminiscencia resultan útiles para evaluar activación y represión de la transcripción, pero no reflejan necesariamente el nivel total de mRNA. Los constructos reporteros

producen el mRNA de *luciferasa*, no el del gen nativo y es posible que los procesos regulatorios a nivel post-transcripcional sean diferentes para las dos especies de RNA.

La generación de células reporteras Cry3-luciferasa nos ha permitido mostrar *in vivo* que la expresión de este gen es rítmica y que está bajo el control del reloj circadiano. Gran parte de la literatura clásica relacionada con biología circadiana ha sido dedicada al estudio de la curva fase-respuesta (PRC) en los diferentes organismos (Johnson, 1999). En células PAC2, los pulsos de luz administrados en DD a diferentes fases del reloj circadiano producen una PRC de gran amplitud, tipo 0 (Vallone y col. 2004; Tamai y col. 2007). En el presente trabajo hemos podido evaluar el efecto directo de la luz en la expresión de *Cry3* aplicando pulsos de luz de variada intensidad y a diferentes fases circadianas sobre las monocapas de células reporteras. Así por ejemplo, en la Figura 18 observamos que el mRNA de *Cry3* experimenta cambios de fase de igual sentido que aquellos exhibidos por el reportero de *Per1*; sin embargo, existen diferencias en la magnitud de los cambios de fase entre los dos reporteros (ver Figura 13). Esta discrepancia podría ser el reflejo de diferencias

biológicas entre las líneas celulares, puesto que cada una de ellas ha sido generada independientemente y, por lo tanto, es única. Una forma de confirmarlo sería con el seguimiento de la expresión de los dos genes dentro de la misma línea celular que, en teoría, es posible si se fusiona cada uno de ellos a un reportero luminiscente diferente (como luciferasa de *renilla* ó de luciérnaga) y se dispone de un filtro de ancho de banda entre las células y el sistema detector para seguir en forma separada la emisión de cada reportero. De esta manera, uno podría esperar que los cambios de fase observados para cada uno de los reporteros fueran idénticos, puesto que la luz estaría actuando sobre la misma fase del reloj circadiano contenido en las células. En caso contrario, el escenario aumentaría en complejidad, puesto que sugeriría la presencia de múltiples osciladores dentro de la misma célula. Actualmente, nuestro laboratorio no cuenta con la infraestructura necesaria para llevar a cabo estos experimentos.

4. Posible rol de *Cry3* como componente central del reloj circadiano en células y tejidos periféricos de pez cebra.

Los ensayos de interacción de proteínas, evaluados por ensayos de doble híbrido en levaduras, muestran que *Cry3*

puede unirse directamente a Clock1 y Bmal1, dos de los componentes centrales del reloj circadiano presentes en la mayoría de los modelos animales estudiados a la fecha. Nosotros creemos que a través de su interacción directa con regiones específicas de Clock y Bmal, durante las primeras horas del día, Cry3 interfiere en el proceso de dimerización de estas proteínas y, por lo tanto, afecta la regulación transcripcional de genes controlados por el reloj (Figura 31). Además, al igual que mCRYs, Cry3 puede interactuar directamente con las proteínas PERs y, específicamente con el dominio C-terminal de Per2, proteína cuya expresión es directamente inducida por luz. Estudios *in vitro* han mostrado que Per2 es capaz de inhibir la transcripción mediada por CLOCK/BMAL de manera diferente a la observada para Cry1a, por secuestro de Clock y Bmal recién sintetizados en el citoplasma y no por interacción directa con el dímero en el núcleo (Ishikawa y col., 2002; Hirayama y col., 2003a y b). Entonces, sería interesante evaluar si, a través de su interacción con Per2, Cry3 afecta la localización subcelular de los componentes del heterodímero.

Los resultados de los experimentos de sobreexpresión de Cry3 en líneas celulares de pez cebra apoyan el modelo

anteriormente planteado, puesto que la sobreexpresión de Cry3 claramente reduce ó detiene la oscilación de otros genes del reloj circadiano, como *Period1* y *Cry1a*. De esta manera, hemos podido confirmar que Cry3 puede actuar como un potente represor transcripcional de genes controlados por el reloj, al menos en las líneas celulares.

En la misma dirección, los ensayos de inmunocitoquímica muestran que la localización subcelular de la proteína es predominantemente nuclear y no citoplasmática, como ha sido descrita previamente. Cabe mencionar que en los análisis de sobreexpresión realizados por el grupo de Takeshi Todo (Hirayama y col., 2003a y 2003b) se transfectaron células NIH3T3 de ratón y no líneas celulares del pez, como en nuestro caso. Otra posible explicación para esta discrepancia, se basa en el rol descrito para la extensión C-terminal de criptocromos en vertebrados. Si por alguna razón (ej. modificación post-transcripcional que ocurre específicamente en células de ratón) esta región de CRYs se ve truncada o alterada conformacionalmente, las proteínas permanecen en el citoplasma de la célula y no son capaces de reprimir la transcripción activada por CLOCK/BMAL (Zhu y col., 2003).

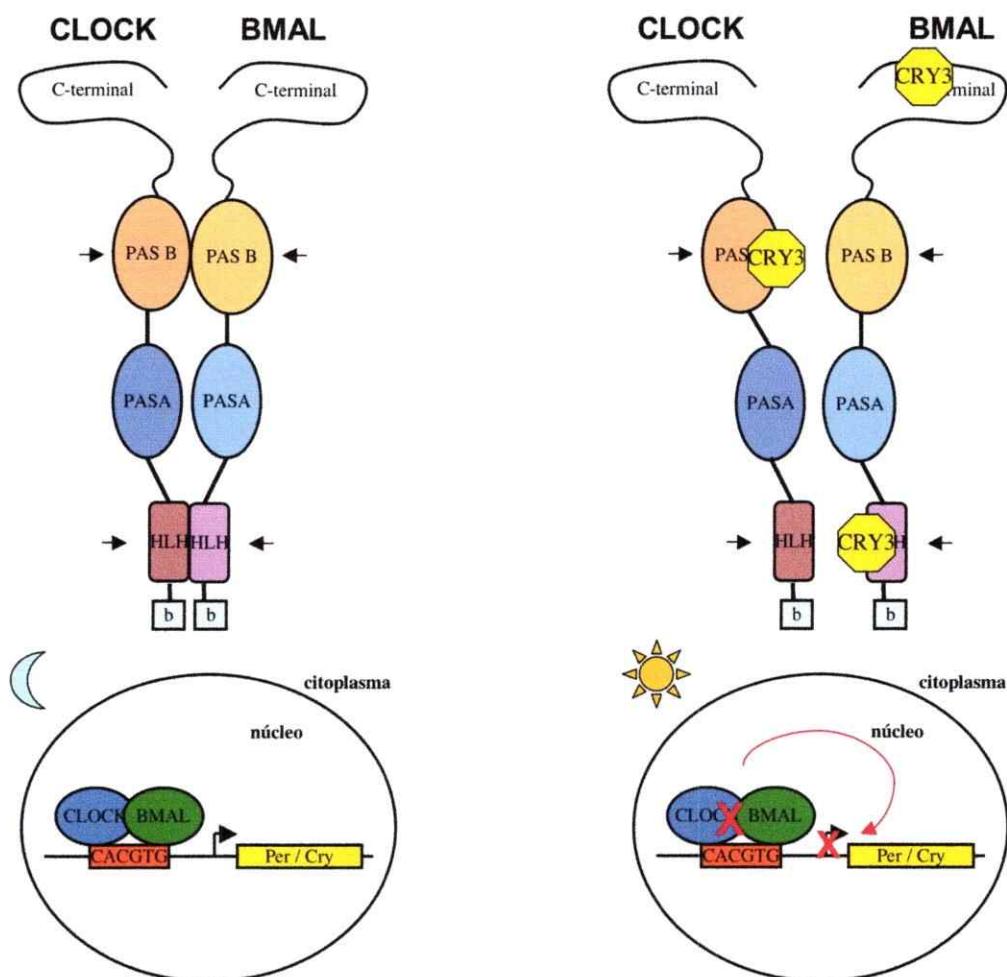


Figura 31. Representación esquemática del rol de Cry3 en el sistema circadiano de pez cebra. Durante la noche el heterodímero CLOCK/BMAL se une a cajas E presentes en los promotores de genes blanco del reloj circadiano y activa su transcripción. En las primeras horas del día, Cry3 se une a dominios específicos de Clock y Bmal, impidiendo su correcta dimerización y, con ello, su normal funcionamiento.

Por otra parte, la sobreexpresión de Cry3 en la línea reportera Cryla-luciferasa parece bloquear la regulación de la vía de entrada de luz hacia el reloj. Está descrito que

el marcapasos central es capaz de autorregular su sensibilidad a la luz por retroalimentación negativa sobre sus vías de entrada, fenómeno conocido clásicamente como "zeitnehmer" (Roenneberg y Merrow, 1999; McWatters y col., 2000). Así entonces, al detener el reloj mediante la sobreexpresión de *Cry3*, la sensibilidad rítmica a la luz es eliminada por completo. Lo anterior también ocurre al sobreexpresar un constructo dominante negativo de *Clock*, aún cuando los valores promedio de inducción de *Cry1a* bajo ambas condiciones parecen ser diferentes.

5. El bloqueo transitorio de la expresión de *Cry3* en embriones sugiere un alto grado de complejidad del sistema circadiano de pez cebra.

En general, los resultados de las inyecciones del morfolino antisentido de *Cry3* en embriones de pez cebra, apoyan el rol de *Cry3* como un regulador central del reloj circadiano. Sin embargo, sólo la respuesta observada para el mensajero de *Cry3* se ajusta al resultado esperado, en términos de eliminar un componente represor del reloj, y revela que el sistema circadiano a nivel celular puede ser más complejo de lo que imaginamos en un comienzo. Los estudios de sobreexpresión de la proteína realizados

inicialmente en líneas celulares del pez no revelaron este grado de complejidad principalmente porque este tipo de tratamiento, al ser comparado con las inyecciones del morfolino, carece de todo grado de sutileza a nivel molecular.

Así, al reducir los niveles de *Cry3* por inyección del morfolino en embriones, se observa un aumento significativo en los niveles de expresión del mRNA de *Cry3* bajo todas las condiciones ensayadas, presumiblemente por desrepresión de la transcripción regulada por el heterodímero CLOCK/BMAL, resultado que sugiere la presencia de un ciclo de retroalimentación negativa de *Cry3* sobre su propia regulación transcripcional. Otra posible explicación es que el morfolino podría estar afectando la estabilidad del mensajero de *Cry3*, impidiendo o retrasando su degradación. Sin embargo, este fenómeno de acumulación del mRNA de *Cry3* parece ser afectado por luz puesto que, bajo condiciones LD, los niveles de expresión durante el día corresponden aproximadamente al doble de los niveles observados durante la noche y, bajo condiciones DD, los niveles permanecen constantemente elevados sin importar la hora circadiana (día o noche subjetivos) evaluada.

Los genes que son predominantemente regulados por luz, como en el caso de *Per2*, no muestran cambios significativos de su expresión en respuesta a las inyecciones del morfolino de *Cry3* bajo condiciones LD. Un dato importante, es que a la fecha no se ha descrito la presencia de cajas E en el promotor de este gen y, por ello, es esperable que su expresión no se vea afectada al reducir o eliminar por completo la expresión de un componente central del reloj circadiano.

Los genes que experimentan una regulación transcripcional combinada (por luz y por el reloj circadiano), en cambio, muestran un efecto más complejo y difícil de explicar apelando a un modelo simplificado. A pesar de que las inyecciones del morfolino antisentido de *Cry3* afectan significativamente los niveles de expresión de *Perl*, *Cryla* ó *6,4-fotoliasa* bajo ciclos LD, estos genes no muestran un incremento sostenido en sus niveles de expresión como los observados para *Cry3* sino, por el contrario, a ciertas horas muestran un efecto directamente opuesto.

La complejidad del sistema circadiano observada en la variedad de respuestas obtenidas por las inyecciones con el morfolino puede explicarse, al menos en parte, por el número de copias de los diferentes genes del reloj

presentes en pez cebra. Con 3 diferentes genes *clock* e igual cantidad de *bmal* descritos a la fecha, existen 9 posibles diferentes combinaciones de estas proteínas con capacidad de activar la transcripción de genes blanco del reloj. La evidencia actual muestra que dicha capacidad de formar combinaciones clave de proteínas no es simplemente el reflejo de redundancia a nivel génico, sino que algunas combinaciones específicas pueden estar más favorecidas que otras. Tal es el caso para la proteína Cry1a, que puede interactuar con todas menos una de las combinaciones del dímero CLOCK/BMAL (Tamai y col, 2007). Nuestros resultados de interacción con las proteínas PERs también sugieren que Cry3 se une preferentemente a Per2 y Per3. Bajo este escenario, es posible que combinaciones específicas de Clock y Bmal exhiban mayor o menor afinidad de unión a diferentes cajas E (contexto-dependiente) y/o a los diferentes criptocromos. Un análisis del promotor de *per1*, ha revelado que la fase de los ritmos dirigidos por cajas E, así como también su respuesta a luz, son directamente influenciados por el contexto local del promotor (Vallone y col., 2004). Lo anterior refuerza la idea de que la regulación génica controlada por el reloj circadiano y/o por la luz está determinada por interacciones complejas

entre múltiples elementos del promotor. Sumado a lo anterior, es muy probable que además de Cry3 y de los criptocromos clasificados como "represores", existan otros reguladores negativos de la expresión activada por CLOCK/BMAL no descritos a la fecha. De esta manera, al remover Cry3 de la "ecuación" a nivel celular, otros represores pueden ver aumentado su acceso al heterodímero CLOCK/BMAL y, de esta manera, puede incrementar la represión de genes como *perl* ó *cry1a* (Figura 32).

Más allá de la complejidad generada por diferentes combinaciones de moléculas, aún podemos introducir otro nivel de complejidad si consideramos las observaciones hechas recientemente por el grupo de Marina Antoch (Kondratov y col., 2006). Ellos han propuesto que en mamíferos el heterodímero CLOCK/BMAL podría funcionar como un interruptor que enciende ("transactivación") o apaga ("transrepresión") la expresión de genes, dependiendo de las condiciones celulares y del contexto del promotor del gen blanco. De esta manera, si consideramos las 9 combinaciones de CLOCK/BMAL posibles y asumimos que algunas de ellas tienen un rol represor de la transcripción, luego la probabilidad de que exista un sistema circadiano

altamente complejo, compuesto de múltiples ciclos de retroalimentación regulatorios es elevada.

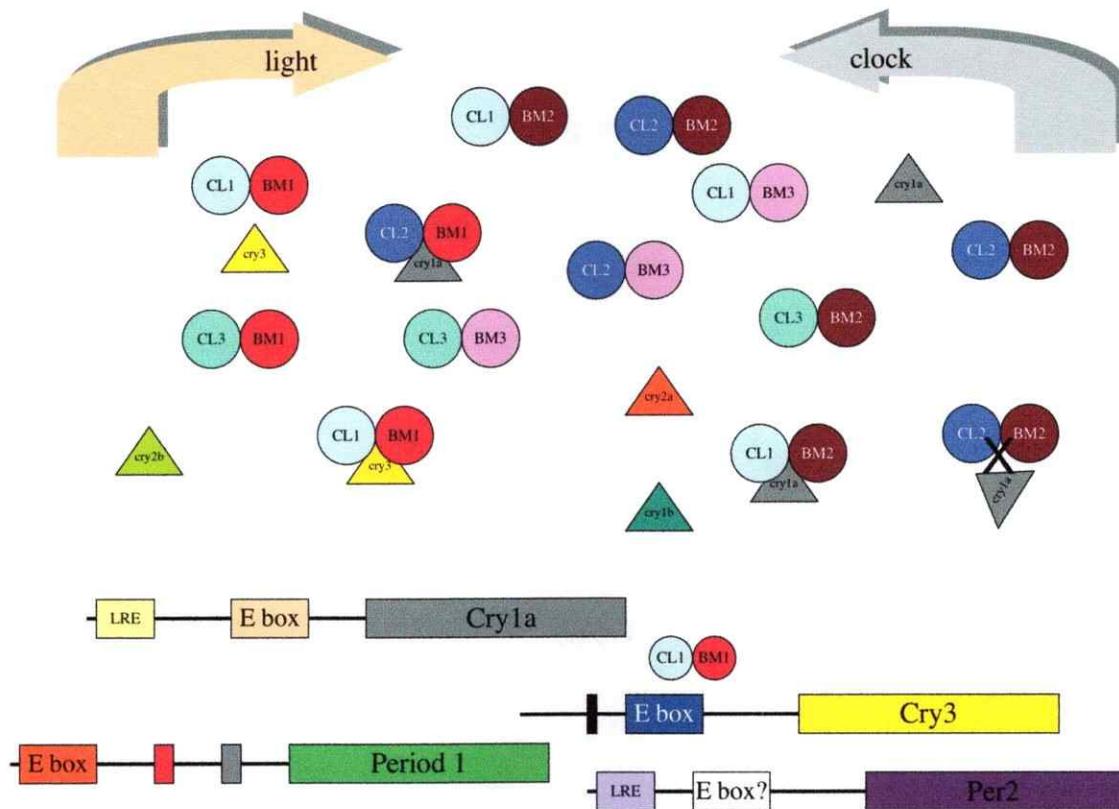


Figura 32. Representación esquemática de un modelo circadiano con múltiples ciclos de retroalimentación negativa. De acuerdo al número de copias de Clock y Bmal descritas a la fecha, existen 9 combinaciones diméricas posibles capaces de regular la expresión de genes blanco del reloj circadiano de pez cebra. Bajo este escenario, es posible que combinaciones específicas de Clock y Bmal exhiban mayor o menor afinidad de unión a diferentes cajas E, dependiendo del contexto del promotor, y/o a los diferentes criptocromos. LRE=elemento de respuesta a luz, E box=caja E.

Algunos de los resultados controversiales obtenidos en los experimentos de inyección del morfolino de *Cry3* en embriones, pueden explicarse de forma simple si aceptamos que las observaciones del grupo de Antoch son extrapolables al sistema circadiano del pez. La cuantificación por qRT-PCR de los niveles de expresión de diferentes genes controlados por el reloj en embriones de pez cebra entrenados a ciclos LD 12:12, ha revelado que los niveles endógenos del mensajero de *Cry3* se mantienen relativamente elevados en comparación al resto de los genes evaluados. Esto, sumado al hecho de que la amplitud de la oscilación rítmica de *Cry3* es muy discreta, sugiere la existencia de otros factores de transcripción, no-circadianos, que regulan su expresión y, por lo tanto, activan constitutivamente su promotor. Si lo anterior fuese correcto, entonces la regulación transcripcional mediada por unión de CLOCK/BMAL a las cajas E presentes en su promotor debería tener un efecto modesto en los niveles de expresión del mensajero, capaz de generar un ritmo de baja amplitud, como el observado para *Cry3*. De esta misma forma, es posible explicar la marcada amplitud de oscilación observada para *Per1*, asumiendo una mayor contribución de la "transactivación" mediada por CLOCK/BMAL en el patrón de

expresión de este gen. Además, si asumimos que la interacción de Cry3 con CLOCK/BMAL es capaz de encender el estado de trans-represión del heterodímero, la sobreexpresión de la proteína debería disminuir o eliminar por completo el ritmo de mensajeros regulados por el reloj, conduciendo a niveles basales de expresión de éstos. Bajo la misma premisa, el bloqueo de la expresión de Cry3 con el morfolino debería liberar la represión ejercida normalmente por la proteína, pero el heterodímero CLOCK/BMAL aún podría funcionar activando la transcripción de genes blanco. De esta manera, los genes controlados principalmente por "transactivación" (*perl?*, *cry1a?*) no experimentarían cambios significativos, pero aquellos controlados predominantemente por "transrepresión" (*Cry3?*) exhibirían un aumento significativo en sus niveles de expresión.

Por último, en base al patrón de expresión espacial de *Cry3* observado en el embrión por ensayos de hibridación *in situ*, no podemos descartar la posibilidad de que la función de la proteína sea tejido-específica y que, por consiguiente, el efecto del bloqueo transitorio de su expresión se vea reflejado en cambios de los niveles de expresión de otros genes sólo en algunos tejidos del embrión. Más aún, un gen podría responder aumentando

significativamente su expresión en un tejido y disminuyéndola en otro, efectos que no pueden ser detectados por la cuantificación de mRNA total del embrión por qRT-PCR.

6. Rol de *Cry3* en fotosensitividad circadiana.

Aún cuando todos nuestros ensayos muestran ausencia de respuesta aguda en la expresión del mRNA de *Cry3* frente a pulsos de luz, no sabemos qué ocurre con los niveles de la proteína bajo condiciones similares. En *Drosophila*, el mRNA de *dCry* oscila de manera circadiana y los niveles de la proteína muestran sensibilidad a la luz (Emery y col.,1998). Actualmente no existe un anticuerpo comercial específico para *Cry3* de pez cebra, por lo tanto, nos resulta difícil estudiar un posible efecto de la luz en la regulación de la expresión de este gen a nivel post-transcripcional.

Los resultados obtenidos a partir de la sobreexpresión de *Cry3* en células *Cry1a*-luciferasa sugieren que esta proteína no actúa como un fotopigmento, puesto que NO parece aumentar la sensibilidad de las células reporteras en respuesta a pulsos de luz de corta duración. No obstante, existe la posibilidad de que la sobreexpresión de

este fotorreceptor "putativo" esté causando una saturación de la respuesta. Durante el desarrollo de este proyecto intentamos implementar diferentes estrategias experimentales para bloquear la expresión de la proteína en las líneas celulares Cry1a-luciferasa, pero ninguna de ellas resultó satisfactoria.

Por otra parte, el bloqueo transitorio de la expresión de la proteína en embriones de pez cebra entrenados a ciclos LD 12:12, muestra que la ausencia de Cry3 no afecta significativamente la expresión de genes inducidos por luz como *Per2*, pero sí altera los niveles de expresión de genes controlados por el reloj circadiano. En conjunto, estos resultados apoyan un rol de Cry3 como componente central del reloj circadiano de pez cebra, pero no descartan un posible rol de la proteína como fotorreceptor de luz azul, puesto que los embriones fueron entrenados a luz blanca y probablemente existe contribución de otros fotorreceptores en la respuesta al entrenamiento LD 12:12. Una situación experimental ideal sería administrar pulsos de luz monocromática en peces mutantes de la proteína para evaluar los cambios de fase en la expresión de genes controlados por el reloj, o bien, generar líneas celulares reporteras

de los diferentes genes controlados por el reloj a partir de una línea celular del mutante.

7. Perspectivas

Muchas de las alternativas aquí discutidas pueden ser evaluadas experimentalmente a futuro: ¿tienen las diferentes combinaciones de Clock y Bmal roles diferenciales en la regulación transcripcional de los genes controlados por el reloj? y, de ser así, ¿se unen a proteínas represoras alternativas?. Las cajas E presentes en los promotores de los genes controlados por el reloj ¿exhiben afinidad de unión preferencial frente a activadores específicos?.

Debido a la relevancia de la información que podemos obtener a partir de un mutante, nuestro grupo ha contactado al Consorcio ZF-MODELS (<http://www.zf-models.org>) para la obtención de un mutante de *Cry3* por TILLING.

Además, en base a los resultados obtenidos por la inyección del morfolino antisentido de *Cry3* en embriones, resulta atractiva la idea de determinar por microarray aquellos genes que ven alterada su expresión por efecto del bloqueo transitorio de la proteína en busca de elementos

comunes presentes en sus promotores. Estos experimentos se están llevando a cabo actualmente.

Por otra parte, un análisis detallado del promotor de *Cry3* por transfección estable de células PAC2 con constructos reporteros de éste permitiría determinar los elementos mínimos requeridos para su expresión rítmica (ej. distintas deleciones en el promotor), o bien, evaluar la verdadera contribución de la regulación transcripcional mediada por CLOCK/BMAL en los niveles de expresión del mensajero (ej. mutaciones puntuales en las cajas E).

Gracias a las múltiples ventajas que ofrecen las líneas celulares reporteras, parece relativamente sencillo realizar un análisis detallado de la contribución del dominio C-terminal de la proteína en el efecto represor observado, por sobreexpresión de constructos de diferente longitud (deleciones) o por mutaciones puntuales que afecten su conformación. Finalmente, la sobreexpresión de CRY3-myc y Flag-CLOCKDN en células *Cry3*-luciferasa aportaría mayor información al fenómeno observado en embriones.

CONCLUSIONES

Nuestra conclusión general es que *Cry3* actúa como un componente central del reloj circadiano en células y embriones de pez cebra.

Muchas diferentes líneas de evidencia basadas en los datos aquí presentados nos han conducido a esta conclusión:

- *Cry3* se expresa en todos los tejidos del embrión, pero con mayor intensidad en la cabeza, los primordios de las aletas y el tubo digestivo primitivo.
- Embriones y células PAC2 entrenados a ciclos LD 12:12 exhiben transcripción rítmica de *Cry3*, con niveles máximos de expresión entre ZT 21-3.
- Embriones mantenidos en oscuridad constante exhiben bajos niveles de *Cry3*. En ausencia de entrenamiento a ciclos LD 12:12, no se observa oscilación del mensajero.
- La línea celular reportera de *Cry3* muestra que la expresión de este gen oscila de manera circadiana.
- El patrón de oscilación exhibido por las células reporteras entrenadas a ciclos LD 12:12 coincide con el patrón de expresión endógeno de *Cry3*.
- En respuesta a pulsos de luz, la expresión del reportero de *Cry3* experimenta cambios de fase

proporcionales a la intensidad de luz administrada. Además, tanto la magnitud como el sentido del cambio de fase muestran dependencia del tiempo circadiano (CT) al que se administra el pulso.

- Cry3 interactúa directamente con CLOCK1, BMAL1 y con las 3 proteínas PER descritas en pez cebra.

- La sobreexpresión de Cry3 en líneas celulares del pez reduce o detiene la oscilación de genes como *perl* y *cry1a*.

- La localización subcelular de la proteína es predominantemente nuclear.

- El bloqueo transitorio de la expresión de Cry3 en embriones de pez cebra provoca un aumento significativo en los niveles de expresión del mRNA de *Cry3*.

- La sobreexpresión de Cry3 NO aumenta la sensibilidad de éstas en respuesta a pulsos de luz azul.

- La sobreexpresión de Cry3 en células *Cry1a*-luciferasa elimina la regulación circadiana de la vía de entrada de luz.

- El bloqueo transitorio de la expresión de Cry3 en embriones de pez cebra entrenados bajo ciclos LD, NO afecta significativamente los niveles de expresión de genes predominantemente inducidos por luz, como *period2*.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, M. y Cashmore, A. R. (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366, 162-166.
- Balsalobre, A., Damiola, F. y Schibler, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93, 929-937.
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas, T. L. y Zoran, M. J. (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet* 6, 544-556.
- Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V. A., Todo, T., Tainer, J. A. y Getzoff, E. D. (2003). Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *Mol Cell* 11, 59-67.
- Cahill, G. M. (1996). Circadian regulation of melatonin production in cultured zebrafish pineal and retina. *Brain Res* 708, 177-181.
- Cahill, G. M. (2002). Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res* 309, 27-34.
- Carr, A. J. y Whitmore, D. (2005). Imaging of single light-responsive clock cells reveals fluctuating free-running periods. *Nat Cell Biol* 7, 319-321.
- Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y. J. y Liu, D. (1999). Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284, 760-765.
- Ceriani, M. F., Darlington, T. K., Staknis, D., Mas, P., Petti, A. A., Weitz, C. J. y Kay, S. A. (1999). Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science* 285, 553-556.
- Ceriani, M. F., Hogenesch, J. B., Yanovsky, M., Panda, S., Straume, M. y Kay, S. A. (2002). Genome-wide expression analysis in *Drosophila* reveals genes controlling circadian behavior. *J Neurosci* 22, 9305-9319.

Cermakian, N., Whitmore, D., Foulkes, N. S. y Sassone-Corsi, P. (2000). Asynchronous oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal differential clock control and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4339-4344.

Cermakian, N., Pando, M. P., Thompson, C. L., Pinchak, A. B., Selby, C. P., Gutierrez, L., Wells, D. E., Cahill, G. M., Sancar, A. y Sassone-Corsi, P. (2002). Light induction of a vertebrate clock gene involves signaling through blue-light receptors and MAP kinases. *Curr Biol* 12, 844-848.

Collins, B., Mazzoni, E. O., Stanewsky, R. y Blau, J. (2006). *Drosophila* CRYPTOCHROME is a circadian transcriptional repressor. *Curr Biol* 16, 441-449.

Devlin, P. F. y Kay, S. A. (2000). Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* 12, 2499-2510.

Duffield, G. E. (2003). DNA microarray analyses of circadian timing: the genomic basis of biological time. *J Neuroendocrinol* 15, 991-1002.

Dunlap, J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96, 271-290.

Ebihara, S. y Tsuji, K. (1980). Entrainment of the circadian activity rhythm to the light cycle: effective light intensity for a Zeitgeber in the retinal degenerate C3H mouse and the normal C57BL mouse. *Physiol Behav* 24, 523-527.

Emery, P., Stanewsky, R., Hall, J. C. y Rosbash, M. (2000). A unique circadian-rhythm photoreceptor. *Nature* 404, 456-457.

Foster, R. G. y Helfrich-Forster, C. (2001). The regulation of circadian clocks by light in fruitflies and mice. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 1779-1789.

Griffin, E. A., Jr., Staknis, D. y Weitz, C. J. (1999). Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science* 286, 768-771.

Hall, J. C. (2000). Cryptochromes: sensory reception, transduction, and clock functions subserving circadian systems. *Curr Opin Neurobiol* 10, 456-466.

Hattar, S., Lucas, R. J., Mrosovsky, N., Thompson, S., Douglas, R. H., Hankins, M. W., Lem, J., Biel, M., Hofmann, F., Foster, R. G. y Yau, K. W. (2003). Melanopsin and rod-cone

photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 424, 76-81.

Helfrich-Forster, C. (1997). Development of pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 380, 335-354.

Helfrich-Forster, C., Winter, C., Hofbauer, A., Hall, J. C. y Stanewsky, R. (2001). The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron* 30, 249-261.

Hirayama, J., Fukuda, I., Ishikawa, T., Kobayashi, Y. y Todo, T. (2003a). New role of zCRY and zPER2 as regulators of sub-cellular distributions of zCLOCK and zBMAL proteins. *Nucleic Acids Res* 31, 935-943.

Hirayama, J., Nakamura, H., Ishikawa, T., Kobayashi, Y. y Todo, T. (2003b). Functional and structural analyses of cryptochrome. Vertebrate CRY regions responsible for interaction with the CLOCK:BMAL1 heterodimer and its nuclear localization. *J Biol Chem* 278, 35620-35628.

Hirayama, J., Cardone, L., Doi, M. y Sassone-Corsi, P. (2005). Common pathways in circadian and cell cycle clocks: light-dependent activation of Fos/AP-1 in zebrafish controls CRY-1a and WEE-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10194-10199.

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

Hsu, D. S., Zhao, X., Zhao, S., Kazantsev, A., Wang, R. P., Todo, T., Wei, Y. F. y Sancar, A. (1996). Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. *Biochemistry* 35, 13871-13877.

Hunter-Ensor, M., Ousley, A. y Sehgal, A. (1996). Regulation of the *Drosophila* protein timeless suggests a mechanism for resetting the circadian clock by light. *Cell* 84, 677-685.

Ishikawa, T., Hirayama, J., Kobayashi, Y. y Todo, T. (2002). Zebrafish CRY represses transcription mediated by CLOCK-BMAL heterodimer without inhibiting its binding to DNA. *Genes Cells* 7, 1073-1086.

Izumo, M., Johnson, C. H. y Yamazaki, S. (2003). Circadian gene expression in mammalian fibroblasts revealed by real-time luminiscence reporting: temperature compensation and damping. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 16089-16094.

Johnson, C. H. (1999). Forty years of PRCs: What have we learned?. *Chronobiol Int* 16, 711-743.

Kane, D. A. y Kimmel, C. B. (1993). The zebrafish midblastula transition. *Development* 119, 447-456.

Klein, W., Zweiker, R., Eber, B., Dusleag, J., Brussee, H. y Rotman, B. (1991). Circadian blood pressure pattern in patients with treated hypertension and left ventricular hypertrophy. *Angiology* 42, 379-386.

Kobayashi, Y., Ishikawa, T., Hirayama, J., Daiyasu, H., Kanai, S., Toh, H., Fukuda, I., Tsujimura, T., Terada, N., Kamei, Y. y col. (2000). Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes Cells* 5, 725-738.

Kondratov, R. V., Shamanna R. K., Kondratova, A. A., Gorbacheva, V. Y. y Antoch, M. P. (2006). Dual role of the CLOCK/BMAL1 circadian complex in transcriptional regulation. *FASEB J.* 20, 530-532.

Korf, H. W., Schomerus, C. y Stehle, J. H. (1998). The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 146, 1-100.

Krishnan, B., Dryer, S. E. y Hardin, P. E. (1999). Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 400, 375-378.

Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H. y Reppert, S. M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98, 193-205.

Lee, C., Bae, K. y Edery, I. (1999). PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/dBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Mol Cell Biol* 19, 5316-5325.

Lin, C. y Todo, T. (2005). The cryptochromes. *Genome Biol* 6, 220.

Lin, F. J., Song, W., Meyer-Bernstein, E., Naidoo, N. y Sehgal, A. (2001). Photic signaling by cryptochrome in the *Drosophila* circadian system. *Mol Cell Biol* 21, 7287-7294.

Lin, S., Gaiano, N., Culp, P., Burns, J. C., Friedmann, T., Yee, J. K. y Hopkins, N. (1994). Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. *Science* 265, 666-669.

Lucas, R. J., Hattar, S., Takao, M., Berson, D. M., Foster, R. G. y Yau, K. W. (2003). Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* 299, 245-247.

McCabe, C. y Birley, A. (1998). Oviposition in the period genotypes of *Drosophila melanogaster*. *Chronobiol Int* 15, 119-133.

Moutsaki, P., Whitmore, D., Bellingham, J., Sakamoto, K., David-Gray, Z. K. y Foster, R. G. (2003). Teleost multiple tissue (tmt) opsin: a candidate photopigment regulating the peripheral clocks of zebrafish?. *Brain Res Mol Brain Res*. 112, 135-145.

Naidoo, N., Song, W., Hunter-Ensor, M. y Sehgal, A. (1999). A role for the proteasome in the light response of the timeless clock protein. *Science* 285, 1737-1741.

Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., Schultz, P. G., Kay, S. A., Takahashi, J. S. y Hogenesch, J. B. (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 109, 307-320.

Panda, S., Provencio, I., Tu, D. C., Pires, S. S., Rollag, M. D., Castrucci, A. M., Pletcher, M. T., Sato, T. K., Wiltshire, T., Andahazy, M. y col. (2003). Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 301, 525-527.

Pando, M. P., Pinchak, A. B., Cermakian, N. y Sassone-Corsi, P. (2001). A cell-based system that recapitulates the dynamic light-dependent regulation of the vertebrate clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10178-10183.

Pittendrigh, C. S. y Daan, S. (1974). Circadian oscillations in rodents: a systematic increase of their frequency with age. *Science* 186, 548-550.

Plautz, J. D., Kaneko, M., Hall, J. C. y Kay, S. A. (1997). Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* 278, 1632-1635.

Postlethwait, J. H., Yan, Y. L., Gates, M. A., Horne, S., Amores, A., Brownlie, A., Donovan, A., Egan, E. S., Force, A., Gong, Z. y col. (1998). Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat Genet* 18, 345-349.

Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W. J., Hayes, W. P. y Rollag, M. D. (1998). Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 340-345.

Roenneberg, T. y Foster, R. G. (1997). Twilight times: light and the circadian system. *Photochem Photobiol* 66, 549-561.

Rosato, E., Codd, V., Mazzotta, G., Piccin, A., Zordan, M., Costa, R. y Kyriacou, C. P. (2001). Light-dependent interaction between *Drosophila* CRY and the clock protein PER mediated by the carboxy terminus of CRY. *Curr Biol* 11, 909-917.

Sakai, T., Tamura, T., Kitamoto, T. y Kidokoro, Y. (2004). A clock gene, period, plays a key role in long-term memory formation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16058-16063.

Sancar, A. (2004). Regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome. *J Biol Chem* 279, 34079-34082.

Schibler, U., and Sassone-Corsi, P. (2002). A web of circadian pacemakers. *Cell* 111, 919-922.

Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S. A., Rosbash, M. y Hall, J. C. (1998). The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95, 681-692.

Storch, K. F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F. C., Wong, W. H. y Weitz, C. J. (2002). Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 417, 78-83.

Tamai, T. K., Vardhanabhuti, V., Foulkes, N. S. y Whitmore, D. (2004). Early embryonic light detection improves survival. *Curr Biol* 14, R104-105.

Tamai, T. K., Young, L. C. y Whitmore, D. (2007). Light signaling to the zebrafish circadian clock by Cryptochrome 1a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14712-14717.

Tang, R., Dodd, A., Lai, D., McNabb, W. C. y Love, D. R. (2007). Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 39, 384-390.

Thresher, R. J., Vitaterna, M. H., Miyamoto, Y., Kazantsev, A., Hsu, D. S., Petit, C., Selby, C. P., Dawut, L., Smithies, O., Takahashi, J. S. y Sancar, A. (1998). Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses. *Science* 282, 1490-1494.

Todo, T., Ryo, H., Yamamoto, K., Toh, H., Inui, T., Ayaki, H., Nomura, T. y Ikenaga, M. (1996). Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *Science* 272, 109-112.

Todo, T. (1999). Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family. *Mutat Res* 434, 89-97.

Tosini, G. y Menaker, M. (1996). Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 272, 419-421.

Tosini, G., Davidson, A. J., Fukuhara, Ch., Kasamatsu, M. y Castanon-Cervantes, O. (2007). Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *FASEB J.* 21, 3866-3871.

Vallone, D., Gondi, S. B., Whitmore, D. y Foulkes, N. S. (2004). E-box function in a period gene repressed by light. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4106-4111.

van der Horst, G. T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A. P., van Leenen, D. y col. (1999). Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398, 627-630.

van Gelder, R. N. y Sancar, A. (2003). Cryptochromes and inner retinal non-visual irradiance detection. *Novartis Found Symp* 253, 31-42; discussion 42-55, 102-109, 281-104.

Vitaterna, M. H., Selby, C. P., Todo, T., Niwa, H., Thompson, C., Fruechte, E. M., Hitomi, K., Thresher, R. J., Ishikawa, T., Miyazaki, J. y col. (1999). Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12114-12119.

Wheeler, D. A., Hamblen-Coyle, M. J., Dushay, M. S. y Hall, J. C. (1993). Behavior in light-dark cycles of *Drosophila* mutants that are arrhythmic, blind, or both. *J Biol Rhythms* 8, 67-94.

Whitmore, D., Foulkes, N. S., Strahle, U. y Sassone-Corsi, P. (1998). Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Nat Neurosci* 1, 701-707.

Whitmore, D., Foulkes, N. S. y Sassone-Corsi, P. (2000). Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* 404, 87-91.

Yang, Z., Emerson, M., Su, H. S. y Sehgal, A. (1998). Response of the timeless protein to light correlates with behavioral entrainment and suggests a nonvisual pathway for circadian photoreception. *Neuron* 21, 215-223.

Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, Ch., Buhr, E. D., Siepk, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M. y Takahashi, J. S. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5339-5346.

Zamir, E., Kam, Z. y Yarden, A. (1997). Transcription-dependent induction of G1 phase during the zebrafish midblastula transition. *Mol Cell Biol* 17, 529-536.

Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L. y Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15, 871-875.