



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Función de PpaYTHDF1 y PpaYTHDF2 durante etapas claves del desarrollo de
*Physcomitrella patens***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Daniel Abisaí Jerez Prieto

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Luis Reyes Taboada (IBt UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Svetlana Shishkova (IBt UNAM)

Dra. Verónica Lira Ruan (IBt UNAM)

Ciudad de México. Agosto, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Al apoyo recibido de los proyectos DGAPA-PAPIIT IN202918 y 208421 otorgados al Doctor José Luis Reyes Taboada, porque su apoyo en estos difíciles tiempos de pandemia facilitó mi manutención.

Al posgrado en Ciencias Bioquímicas del Instituto de Biotecnología la UNAM. Formarme en la UNAM fue mi sueño de la adolescencia y hoy veo cumplida esa empresa.

A la M. en C. María Beatríz Pérez Morales, por su apoyo e infinita paciencia para enseñarme las bases del qPCR, así como facilitar mi formación en el laboratorio.

Al M. en C. David Garcias, por fungir como mi primer maestro en el trabajo con *P. patens* y por las muchas técnicas de biología molecular, aprendidas de él, que utilicé durante el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Carlos Chávez, por hacerse cargo del resguardo de las líneas mutantes obtenidas en el presente proyecto.

Al M. en C. David Rendón, por sus consejos y las charlas dentro del laboratorio y fuera de este, asimismo por las técnicas aprendidas de él.

A la M. en C. Ingrid Gonzáles Lemes, por todo el apoyo brindado, por la enseñanza de varias técnicas y por todas las historias sobre Cuba a la hora de la comida.

Por otra parte, agradezco al comité tutorial conformado por las Doctoras Svetlana Shishkova, Verónica Lira Ruan, y el Dr. José Luis Reyes Taboada, por ayudarme a consolidar mi proyecto de maestría.

Finalmente, gracias totales a todos los integrantes del consorcio Covarrubias-Reyes, por sus comentarios tan acertados que permitieron enriquecer el presente proyecto.

Dedicatorias

A mis padres, Jessica Prieto Bustamante y Dimas Jerez Sulvaran, pues siempre han estado para mí, apoyándome en cada una de mis empresas locas y porque siempre que pierdo fuerza, como un huracán en tierra, sé que puedo regresar a ellos, mi bastión de tormentas, y hacerme de bríos para salir a comerme el mundo nuevamente.

A mi hermana y mi sobrino favoritos, Cecy y Leonardo, por ser mi confidente en mis ratos malos, regulares y buenos, y por ser mi salvavidas en mis horas más oscuras, respectivamente.

A mi Lord Comandante, Dr. José Luis Reyes Taboada, porque me dio la oportunidad de equivocarme, aprender de mis errores, continuar con el proyecto y, sobre todo, pero sobre todo, porque nunca perdió la fe en mí, incluso cuando ni yo mismo creía en nada.

A los Locos, Dulce, Edder, Chilo, Marco y Esteban, que estuvimos presos en Allende. Salimos juntos, ustedes saben por todas las que pasamos, porque nunca me han dejado, siempre han estado ahí para vigilar que no me de por vencido. ¡Aguante, Locos!

A mis abuelas, Elvira Sulvaran, Agripina Bustamante, y tía(o)s, Alexandra, Cristian y Tito Jerez; Santa Ana Bustamante y Edgar Prieto, por su apoyo moral y económico durante toda la maestría.

Antes de comenzar, tres cuentos de mi autoría

Sputnik V

Juran los científicos que, por allá, en el 2021, cuando comenzó la campaña masiva de vacunación contra el Covid-19, los rusos, en los empaques de la Sputnik V, ponían los *emojis* de carita sugestiva y un beso rojo al lado de la siguiente leyenda: "Desde Rusia con amor".

Juran...

Aprendices de besos

Después de una larga sesión de besos, y cuando comenzaba a tener una erección, separé mi boca de los labios de la chica. Bastante turbado, con una sonrisa maliciosa y la vista desenfocada aventuré:

—Besas muy rico, ¿dónde aprendiste?

—Aprendí cuando era adolescente, practicaba con un peluche.

—¿Ah, sí? —con socarronería agregué— ¿Con qué peluche?

Respondió sonriendo, al mismo tiempo que con sus manos me depositaba entre los almohadones de la cama, al lado de mis felpudos homólogos —Contigo, bebé.

La chancla

En la actualidad, al ser un objeto punitivo entre las abnegadas madres y abuelas, se le ha restado importancia al origen y usos de la chancla dentro de la historia militar del género humano. Para contextualizar la importancia de dicho calzado es necesario remontarnos a los albores de la isla de Creta, puesto que la primera aparición reportada de la chancla ocurrió durante el establecimiento de la talasocracia minoica sobre el mar Egeo y algunas zonas del Asia menor. Los papiros de Areta de Samos señalan a la chancla como pieza indefectible en el uniforme de la marina de guerra minoica (*Dixit calceamentis, consecetur re militari potest fortuna, ab iis versus Cretam defertur imperium*¹), lo cual nos permite asumir que el uso de dicha prenda permitió una mejor estabilidad sobre la cubierta mojada de las naves guerreras. Por otra parte, y como paréntesis cultural, también el desarrollo de la chancla permitió el florecimiento de la tauromaquia en la isla, mejorando el desempeño de los primeros lidiadores durante las corridas de toros.

Así también, la chancla común dio paso a la creación de la caliga, suerte de sandalia claveteada, de uso común por el ejército romano para marchar sobre gran parte de Europa asegurándole al César lo propio; mientras en Mesoamérica, la cultura madre, y ya rumbo a su decadencia (400 d. C.), describe en su código *kaktli*², como en un último acto de piedad, el dios *Balam* le hizo entrega de “la chancla” a los sumos sacerdotes, permitiéndoles iniciar su peregrinación hacia el Yucatán para sentar los cimientos de la cultura maya.

Si bien la chancla no figura más en la historia de la milicia, una buena aproximación a su importancia actual dentro de la cultura mexicana ávida de pulque y rencor ante el ser otrora amado, sea la declamada a voz en cuello por aquel juglar zacatecano, que aseguró en una de sus canciones: *Que la chancla que yo tiro, no la vuelvo a levantar*. Sin embargo, en la actualidad, no existe una mejor definición de la chancla que la establecida por el célebre y efímero filósofo Ferrá-Gome³ –autor de títulos tales como: “Za, Za, Za...y Zazaza (Manual ilustrado de defensa personal ante armas punzo cortantes), y “Cuando estuvimos apresados en Allende” (tragicomedia que relata las aventuras de dos amigos dedicados al latrocinio en una ciudad porteña)–, el cual en su: “Brevísimo tratado sobre balas frías y otros objetos de uso cotidiano utilizados como armas arrojadizas” (volumen de mil quinientas páginas), define a la chancla como: ... *Arma arrojadiza con la capacidad de almacenar tanta energía potencial como fuerza tenga el lanzador; eficaz*

misil balístico de supresión del rebelde infante, y primera línea de defensa ante los asquerosos blatodeos voladores y otras alimañas rastreras –artrópodos, reptiles, mamíferos pequeños, etcétera. Algunas veces agente estabilizador sobre la mayólica del baño, y otras tantas más, diáfana señal de fodonguez de un domingo cualquiera.

¹Dicho calzado, potenció el arte de la guerra, trayendo hegemonía a Creta.

²Chancla.

³En la actualidad se desconoce el paradero de este pensador, quien revolucionó la técnica del discurso. Desgraciadamente, en el mundo existen pocos ejemplares impresos de sus obras, algunas incluso han sido reportadas como desaparecidas, ejemplo de ellas son: “Ahora la bebes o la derramas”, tratado sobre la justicia, el deber y la amistad que logró llevar el pensamiento de Cicerón al siguiente nivel.

Tabla de contenido

Resumen.....	11
Abstract.....	13
Introducción	15
Marco teórico	16
Metilación del RNA.....	17
Metiltransferasas (<i>writers</i>).....	18
Desmetilasas (<i>erasers</i>)	21
Lectoras potenciales (<i>readers</i>).....	23
Proteínas lectoras YTH (<i>readers</i>)	25
Lectoras del subclado DC.....	26
YTHDC1 y su papel como lectora de m ⁶ A en núcleo	26
YTHDF1 y YTHDF2. Lectoras del mismo subclado, funciones distintas	27
¿El cisma del arquetipo?	28
<i>Physcomitrella patens</i>	30
Antecedentes directos	33
Pregunta de investigación e Hipótesis, y Objetivo general y Particulares.....	34
Pregunta de investigación.....	35
Hipótesis.....	35
Objetivo general	35
Objetivos particulares	35
Materiales y métodos	36
Material biológico: <i>P. patens</i> – Gransden. Cultivo y propagación.....	37
Determinación de la estructura 3D de las proteínas PpaYTHDF y PpaYTHDC de <i>P. patens</i> utilizando RaptorX (un modelador de proteínas)	37
Determinación de la acumulación de los transcritos <i>PpaYths</i> con base en datos de microarreglos y bases de datos de expresión en <i>P. patens</i>	37
Determinación de la acumulación de los genes <i>PpaYths</i> en diferentes etapas del desarrollo del musgo mediante qPCR.....	38
Diseño y clonación de los plásmidos para la transformación de protoplastos	38
Transformación de protoplastos y cultivo de <i>Physcomitrella patens</i> -Gransden.....	43

Genotipificación de mutantes	46
Generación de la proteína de fusión dCas13b-YTHDF ^N y su gRNA	47
Resultados y Discusión	53
Determinación de las PpaYTH de <i>P. patens</i> como potenciales lectoras.....	54
Efecto de eliminar los genes <i>PpaYthdf</i> de interés durante el desarrollo de <i>P. patens</i>	68
Diseñar y obtener construcciones genéticas para estudiar la función del extremo amino de las proteínas PpaYTHDF en el metabolismo de los mRNAs	72
Conclusiones	76
Perspectivas	78
Determinación de las PpaYTH de <i>P. patens</i> como lectoras <i>bona fide</i> y expresión diferencial de los genes <i>PpaYth</i> bajo diferentes tratamientos y estadios de desarrollo del musgo	79
Efecto de eliminar los genes <i>PpaYthdf</i> de interés durante el desarrollo de <i>P. patens</i>	80
Diseñar y obtener construcciones genéticas para estudiar la función del extremo amino de las proteínas PpaYTHDF en el metabolismo de los mRNAs	80
Bibliografía	81
Anexos	93
Anexo I. Soluciones utilizadas en esta tesis.....	93
Preparación del medio PpNH ₄	93
Solución 3M para transformar protoplastos (50 ml).....	94
Preparación de soluciones para miniprep de DNA.....	94
CTAB 2% (30ml)	95
Anexo II. Genes analizados en esta tesis	96
Anexo III. Oligonucleotidos empleados en esta tesis	98
Anexo IV. Resultados del modelador RaptorX.....	100
Anexo V. Figuras suplementarias.....	101

Resumen

Durante el proceso de maduración del mRNA este experimenta múltiples modificaciones químicas en su estructura original, desde las ampliamente conocidas, tales como, la adición del cap-5' (m⁷G) y la cola poli-A hasta las menos estudiadas como pseudouridilación y los diferentes tipos de metilación, siendo la más representativa de estas últimas la modificación en la posición N6 de la adenosina (m⁶A). Esta ha sido conocida desde hace cincuenta años, empero su estudio ha adquirido relevancia en últimas fechas gracias al desarrollo de técnicas bioquímicas y de biología molecular apropiadas para su análisis. De esta marca de metilación se sabe es catalizada por el complejo formado, entre otras proteínas, por METTL3, METTL14 y WTAP conocidas como complejo *escritor* (*writer*), mientras que m⁶A puede ser removido por otro grupo de proteínas, tales como ALKBH5 y FTO, nombradas proteínas *borradoras* (*erasers*). Finalmente, esta marca debe ser reconocida e interpretada por un tercer colectivo de proteínas denominado *lector*, que se encuentra dividido en dos subclados: YTHDF y YTHDC, siendo el mejor estudiado en vertebrados el subclado YTHDF. Estas proteínas *lectoras* (*readers*) cuentan con un dominio llamado YTH (*YT521-B homology*) en su extremo carboxilo que contiene tres triptófanos formando una caja aromática que reconoce la modificación m⁶A en el mRNA, por otra parte, en su porción amino terminal se han encontrado otros dominios, de los cuales no se ha elucidado completamente su función.

El modelo clásico describe que las proteínas *lectoras* YTH, en humanos, tienen dos funciones principales, por un lado, la proteína YTHDF1 promueve la traducción de sus mensajeros blancos, y en contraposición, YTHDF2 se ha vinculado al decaimiento de sus mRNAs blancos, mientras, YTHDF3 potencia la actividad de las dos anteriores. Sin embargo, en la actualidad se ha propuesto un nuevo modelo, en el que se ha unificado la función de estas tres proteínas como promotoras del decaimiento de los mRNAs blancos por igual. En plantas la función de estas proteínas sólo ha sido estudiado en *A. thaliana*, no obstante, el mayor número de proteínas presentes en esta especie dificulta su estudio, aunado a una posible redundancia de funciones. Por su parte, en el grupo de plantas basales, el musgo *Physcomitrella patens* tiene sólo dos proteínas YTHDF (YTHDF1 y YTHDF2), así como dos en el clado YTHDC (YTHDC1A y YTHDC1B), convirtiéndola en un mejor modelo para el estudio de estas proteínas, que además aporta una perspectiva evolutiva sobre esta vía de regulación.

En el presente trabajo se caracterizó *in silico* la estructura de las proteínas YTH (DF y DC) de *P. patens*, demostrando la formación del dominio YTH y a la marca m⁶A como su ligando, al igual que la presencia de otros dominios en el extremo amino de estas proteínas; por otra parte, también se determinó la presencia de regiones desordenadas en las cuatro proteínas YTH, las cuales podrían permitir a estas proteínas llevar a cabo la separación líquido-líquido en el ambiente subcelular, como se ha reportado para otras proteínas de este grupo. Adicionalmente, mediante la consulta de distintas fuentes de datos transcriptómicos, se documentó la acumulación de los transcritos de los genes *PpaYth* en los diferentes estadios de desarrollo de *P. patens*; así como en otras condiciones de crecimiento del musgo.

Adicionalmente, se reporta la obtención de una línea mutante sencilla para el gen *PpaYthdf2* mediante el sistema CRISPR-Cas9 para edición genómica. Finalmente, también reporto la generación de herramientas encaminadas al estudio de la función efectora de las proteínas YTHDF de *P. patens*, a través de diseñar una proteína de fusión conformada por la proteína Cas13 con su dominio endonucleasa mutado (dCas13b), unida al extremo amino de la proteína YTHDF1 o YTHDF2 respectivamente. Dirigir esta proteína de fusión a un transcrito blanco, en este caso el que codifica para GFP, expresado de forma endógena por la línea NLS4 de *P. patens* nos permitirá evaluar el efecto sobre el metabolismo de un transcrito específico. Los avances obtenidos en este trabajo de tesis establecen las bases para continuar el estudio de las proteínas lectoras de la metilación en mRNA tipo m⁶A en el musgo *P. patens* y así explorar las bases evolutivas de esta vía de regulación post-transcripcional en plantas.

Abstract

During the mRNA maturation process, transcripts undergo multiple chemical modifications on its original structure, including the widely known addition of the cap at its 5'-end (m⁷G) and poly-A tail at the 3'-end, as well as those less studied as pseudouridylation and the different kinds of methylation, the most representative being the methylation at position N6 of adenosine or m⁶A. Even though m⁶A was identified over fifty years ago, its study has acquired recent relevance thanks to the improvement of biochemical and molecular biology techniques for its analysis. Addition of this methylation mark to mRNA is catalyzed by the complex formed, among other proteins, by METTL3, METTL14 and WTAP known as the *writer* complex, while m⁶A can be removed by another group of proteins, such as ALKBH5 and FTO, named as *eraser* proteins. Finally, this mark must be recognized and interpreted by a third group of proteins called *readers*, which in turn are divided into two subclasses: YTHDF and YTHDC, with the first being the best studied in vertebrates. These *reader* proteins have a domain called YTH (YT521-B homology) at their carboxy-end, generally including three tryptophan residues that form an aromatic cage for m⁶A recognition. Furthermore, other domains have been found in the amino end of these proteins, but their function has not been fully elucidated.

The classical model describes that human YTH *readers* have two main functions, on the one hand, it was established that the YTHDF1 protein promotes the translation of its target messenger; in contrast, YTHDF2 has been linked to the decay of its target mRNAs, while YTHDF3 is proposed to enhance the activity of the previous two. However, a new model has been proposed, in which these three proteins possess a similar function to promote target mRNA decay. In plants the function of these proteins has only been studied in *A. thaliana*, however, the large number of genes encoding for these proteins present in this plant, together with a possible redundancy of functions, hinders its study in this organism. Alternatively, in the basal group of plants, the moss *Physcomitrella patens* has only two YTHDF proteins (YTHDF1 and YTHDF2), as well as two in the YTHDC clade (YTHDC1A and YTHDC1B), making it a better model for the study of these proteins, and with the advantage of offering an evolutionary perspective to the study of this regulatory pathway.

In the present work, I characterized *in silico* the structure of the YTH proteins (DF and DC) of *P. patens*, demonstrating the formation of the YTH domain and the m⁶A mark as its ligand. In

addition, I identified the presence of other domains in the amino terminal portion of these proteins; moreover, I also determined the presence of disordered regions of the four YTH, which could allow these proteins to carry out liquid-liquid phase separation in the cellular environment as has been shown for other YTH proteins. In addition, using different sources of expression data, I documented mRNA accumulation for *PpaYth* genes in the different developmental stages of *P. patens* and under different growth conditions.

Furthermore, I successfully generated a mutant line for the *PpaYthdf2* gene using the CRISPR-Cas9 system for genomic editing. Finally, I report the generation of tools aimed at studying the effector function of the YTHDF proteins of *P. patens*, using a system employing a chimeric protein made up of the Cas13 protein with its mutated endonuclease domain (dCas13b), fused to the amino end of YTHDF1 or YTHDF2 respectively. Targeting of this fusion protein to the reporter GFP transcript, endogenously expressed by the NLS4 line of *P. patens*, will allow us to monitor its effect on the metabolism of a specific target mRNA. The progress reported in this thesis work establishes the groundwork to continue the analysis of the m⁶A methylation pathway, focused on the *reader* proteins and their role during the development of the moss *P. patens* and provides the basis to further study the evolutionary significance of this post-transcriptional regulatory system in plants.

Introducción

El estilo de vida sésil al que están sometidas las plantas les ha permitido desarrollar una gran elasticidad fenotípica para afrontar las relaciones con los factores bióticos y abióticos que las rodean, los cuales de manera negativa o positiva moldean la vida de la planta, obligándola a responder para mantenerse con vida. Para que esta elasticidad fenotípica se manifieste es necesaria la participación de diversos mecanismos moleculares, tales como las modificaciones químicas reversibles ocurridas en la cromatina, las modificaciones postraduccionales en las proteínas y las modificaciones postranscripcionales en el mRNA. En cuanto a las modificaciones en la estructura de la cromatina se refiere, éstas no sólo ayudan al empaquetamiento del DNA dentro del núcleo sino también regulan la recombinación, la replicación, y la transcripción al permitir, o no, el acceso al DNA a la RNA Pol II (Venkatesh & Workman, 2015); asimismo las modificaciones postraduccionales juegan un rol importante, puesto que con ellas los residuos de aminoácidos de las proteínas se modifican covalentemente permitiéndoles cambiar sus propiedades químicas. Cabe mencionar que las modificaciones en actúan en respuesta a los requerimientos a nivel fisiológico y del desarrollo de un organismo en momentos específicos. (Prabakaran, Lippens, Steen, y Gunawardena, 2012). Finalmente, las modificaciones químicas reversibles del RNA mensajero responden al contexto celular, además, son de suma importancia, un ejemplo de ellas son la incorporación del cap al extremo 5' (m^7G), la cola de poli-A en el extremo 3' y la metilación en algunas de las bases de sus nucleótidos, constituyendo otro nivel de regulación de la expresión genética, e influyendo fuertemente en el metabolismo de los organismos (Edmonds, Vaughan, y Nakazato, 1971; Muthukrishnan, Both, y Furuichi, 1975; Shatkin, 1976). De manera relevante, recientemente se ha descrito que la metilación de las adenosinas en la posición N6 (marca m^6A) influye en el procesamiento de los RNA mensajeros, brindándoles estabilidad y promoviendo su traducción o, por otra parte, su decaimiento (Zhao, Roundtree, y He, 2016; Zheng et al., 2013), tal como ocurre durante la maduración de líneas germinales (Batista et al., 2014; Mansour et al., 2015), y en la defensa ante patógenos (Martínez-Pérez et al., 2017), entre muchos otros procesos. A pesar de que todas estas modificaciones han sido previamente conocidas de manera general desde hace 50 años, aún no se ha logrado elucidar por completo su función.

Marco teórico

Metilación del RNA

Durante la década de los 70 el descubrimiento de la estructura del cap, el cual consiste de una guanosina metilada en la posición N7, ligada al primer nucleótido del mRNA por un enlace reverso 5' a 5'trifosfato (Muthukrishnan et al., 1975; Ramanathan et al., 2016), trajo consigo el descubrimiento de más modificaciones dentro de la estructura interna del rRNA, 2'-O-metilación y pseudouridilación (Ψ) (Sloan et al., 2017), tRNA, m^1A y m^3C (Su et al., 2020), y mRNA, tales como metil-base-nucleósidos, m^6Am , m^1A , m^6A , m^5C , entre otras, (Figura 1; Desrosiers, Friderici, y Rottman, 1974), como puede verse muchas de estas marcas son compartidas entre los diferentes tipos de RNAs. Cabe resaltar que la base más enriquecida con la marca de metilación dentro de los mRNAs es la adenina, presentándose en su forma m^6A , es decir, es la incorporación de un grupo metil en la posición 6 de la adenosina (N6) (Covelo-Molares et al., 2018; Dubin & Taylor, 1975; Perry & Kelley, 1974).

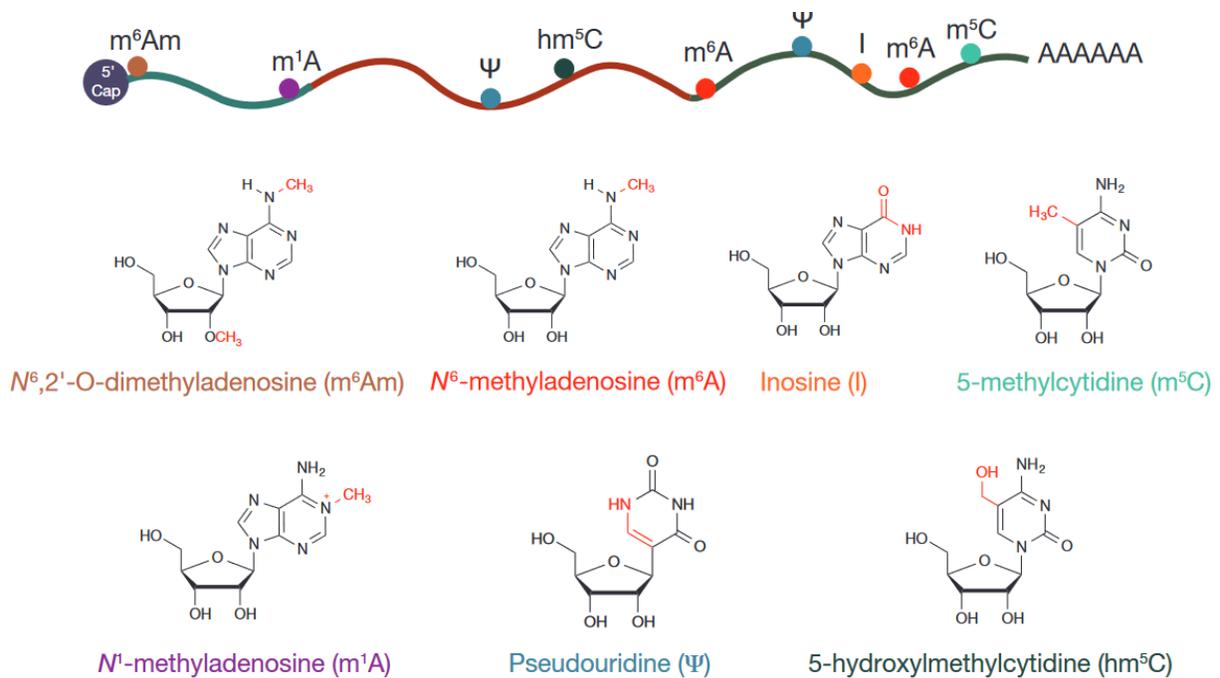


Figura 1. Se muestran algunas de las bases modificadas por la incorporación de un grupo metilo en su estructura. La metilación puede presentarse en la base nitrogenada, en la ribosa del nucleósido o en ambos. (Tomado de Li *et al.*, 2016).

Desgraciadamente y como lo señala Covelo-Morales et al., 2018, estos trabajos no lograron ahondar más en la información bioquímica debido a las carencias tecnológicas de esa década, mismas que hogaño han sido salvadas con el surgimiento de las tecnologías de secuenciación de nueva generación y el desarrollo de nuevas técnicas en la bioquímica y biología molecular. La subsecuente detección de cambios en la estructura del RNA ha creado así un nuevo campo de investigación llamado epitranscriptómica, encargado de estudiar las modificaciones anteriormente mencionadas (Covelo-Molares et al., 2018).

Finalmente, es importante señalar que la metilación en el mRNA constituye de esta forma un nuevo nivel de información, equiparable a las modificaciones reversibles que ocurren en el DNA y las proteínas. De esta forma la marca m⁶A regula tres procesos importantes a nivel celular: procesamiento, traducción y degradación del mRNA. A continuación, y para ofrecer un marco de referencia, se introducirá al lector al proceso de adición, remoción e interpretación de la marca m⁶A llevados a cabo por distintos componentes proteicos a lo largo de esta vía.

Maquinaria de metilación:

Metiltransferasas (*writers*)

Hasta el momento el único complejo conocido encargado de la catálisis de transferencia del grupo metilo (m⁶A) al mRNA es el heterodímero formado por las proteínas METTL3 y METTL14, así como la proteína adaptadora WTAP (Figura 2), conocido en conjunto como el complejo escritor (*writer*). Dentro del complejo escritor, la actividad de unión de S-adenosil metionina (SAM) recae en METTL3, la cual utiliza sus residuos D377, D395, N539 y E532 para contactar la porción de la metionina. Esto se demostró mediante ensayos *in vitro* donde algunos mRNAs sintéticos se mezclaron con extractos nucleares de células HeLa y se monitoreó la adición de grupos metilo a los mensajeros; el patrón de metilación que se obtuvo es idéntico al observado *in vivo* en la secuencia consenso GGACU (Nayaran y Rottman, 1988). El mismo grupo continuó con la purificación de fracciones nucleares hasta obtener una proteína de 70 kDa con actividad de unión a SAM, la cual fue llamada METTL3 (*Methyltransferase-like protein 3*) y se agrupa dentro de la gran familia putativa de metiltransferasas dependientes de SAM conservada entre los mamíferos (Schapira 2015). Es probable que no sea la única maquinaria de metilación con la que cuentan las células, pero sí la principal y la más importante, puesto que una delección en METTL3 en plantas, levaduras y mamíferos lleva a una pérdida completa o casi

completa de la metilación tipo m^6A en los sitios consenso DRACH (donde D= A, G, U; R= A, G; H=A, C, U) del mRNA (Meyer y Jaffrey 2017).

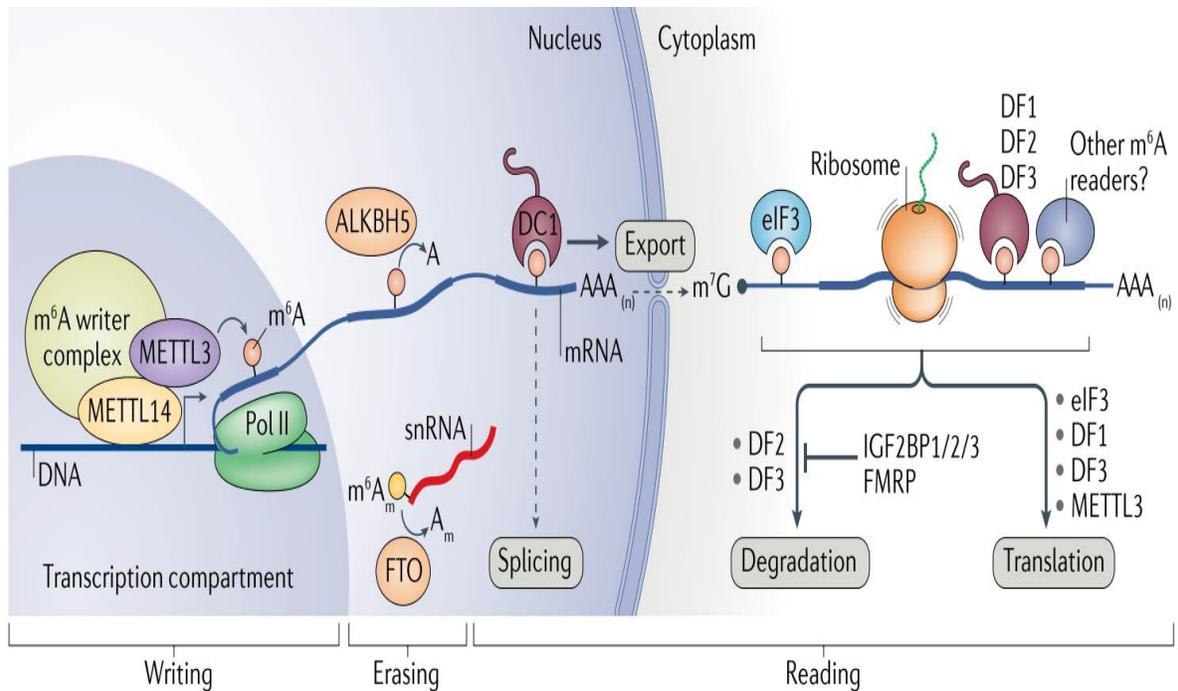


Figura 2. De izquierda a derecha: El complejo escritor con su subunidad METTL14 funcionando como andamio para la subunidad catalítica, METTL3, encargada de la adición del grupo metilo ($-CH_3$) en la posición N⁶ de la adenosina (m^6A), actuando a la par en que la RNA PolII sintetiza el RNA. A continuación, si el RNA sintetizado es un snRNA este puede ser desmetilado por la proteína FTO o en el caso de un mRNA por ALKBH5. Proceso que hace patente la reversibilidad de la metilación. A continuación, se encuentra un grupo de proteínas encargadas de efectuar una interpretación de los mRNAs con la marca m^6A , estas son las YTH, o proteínas lectoras YTH. La YTHDC1 cumple funciones efectoras durante el proceso de splicing y en el exporte de los mensajeros fuera del núcleo. En citoplasma es recibido por otras potenciales lectoras como el factor de inicio de la traducción (eIF3), la FMRP o la familia IGF2BP, y también por proteínas lectoras YTH, como las DF1/2/3, las cuales en convivencia con otras proteínas efectúan la degradación de los mensajeros o, por otro lado, su traducción (Tomado de Zaccara, Ries y Jaffrey 2020).

Sin embargo, METTL3 requiere del adaptador WTAP (*Wilms tumor 1-associated protein*) para realizar la metilación sobre los mRNAs y acoplarse a estos. La segunda proteína del heterodímero es METTL14 (*Methyltransferase-like protein 14*, Ping et al. 2014). Pero, si METTL3 se encarga de metilar y WTAP acopla y localiza a las dos metiltransferasas, ¿cuál es la función de METTL14? Trabajos previos de cristalografía demostraron que METTL14 perdió su función en el dominio de unión a SAM en residuos de aminoácidos críticos para el proceso de metilación, que por el contrario aún están presentes en METTL3, por lo que lleva a cabo funciones de reclutamiento y unión al RNA que potencian la actividad metiltransferasa de METTL3 sobre las adenosinas. Es decir, se ha convertido en una proteína adaptadora dentro del complejo de metilación y es de especial importancia para la actividad de METTL3 puesto que la eficiencia de METTL3 para metilar decae en ausencia de METTL14 (Liu et al., 2014; Sledz & Jinek, 2016; Meyer & Jaffrey, 2017). La asociación de METTL3, METTL14 y WTAP conforma lo que es conocido como el Complejo de Metil-transferasa o MTC (por sus siglas en inglés, *Methyl-Transferase Complex*).

Además, la proteína KIAA1429 (*Protein virilizer homolog isoform X1*) o VIRMA (homólogo a Virilizer en *Drosophila*) interactúa con el complejo de metilación, y una reducción de KIAA1429 lleva a una pérdida en los niveles de m⁶A, lo cual sugiere una función necesaria e importante dentro del complejo metiltransferasa. En líneas de carcinoma hepatocelular transformadas con un RNA interferente dirigido a KIAA1429 se generó una inhibición en el mecanismo de metilación; en esta línea se encontró que los transcritos de KIAA1429 se acumulan diferencialmente en comparación con líneas celulares hepáticas normales y esta sobreacumulación está relacionada con mayor tasa de proliferación celular (Cheng et al., 2019; Schwartz et al., 2014).

Además de las proteínas anteriores, RBM15 y RBM15B son componentes adicionales del complejo metiltransferasa que interactúan con el complejo MTC reclutándolo a motivos específicos del RNA ricos en uracilos (U), metilando a las adenosinas cercanas a estos motivos. Por otra parte, en células humanas, una reducción en los niveles de RBM15 RBM15B conduce a una pérdida en el silenciamiento mediado por el lncRNA (RNA largo no codificante) XIST y a una pérdida en sitios metilados dentro de los mRNAs (Patil et al., 2016). Dados los resultados anteriores, los autores sugieren que se une al mensajero en estas regiones ricas en U y desde ahí

recluta a WTAP, METTL3, METTL14, y KIAA1429 para llevar a cabo la metilación en los motivos DRACH de los mRNA blanco (Meyer y Jaffrey 2017).

Finalmente, en el modelo vegetal *Arabidopsis thaliana* también se ha reconocido la presencia de esta vía de modificación del mRNA, aunque su estudio no han sido tan amplio como en sistemas animales. Inicialmente se reportó la presencia de la marca m⁶A en mRNAs en el 1.5 % de residuos A presentes en mRNA de *A. thaliana* (Zhong et al., 2008). A continuación, se generaron mutantes con una inserción de T-DNA (SALK_074069) en el exón 4 del gen MTA (subunidad homóloga a METTL3), lo que ocasionó letalidad en plantas homocigotas para esta inserción, por lo cual la línea sólo puede ser mantenida en heterocigosis, obteniendo semillas verdes y blancas, estas últimas inviables, indicando que la pérdida de esta subunidad del complejo de metilación genera letalidad embrionaria en *A. thaliana*. Así mismo, se demostró la interacción entre WTAP (FIP37) y MTA, tal como ocurre en humanos (Zhong et al., 2008). En otro trabajo se determinó que una pérdida en la actividad de MTA después del desarrollo embrionario lleva a un decaimiento en los niveles de metilación de mRNAs, esto se demostró utilizando mutantes parcialmente complementadas con el cDNA de MTA el cual se expresó sólo durante la embriogénesis permitiendo analizar su falta en otras etapas del desarrollo. En cuanto a los fenotipos observados para estas mutantes, se obtuvieron plantas enanas con hojas arrugadas y con una mayor cantidad de tricomas (Bodi et al., 2012), lo cual es similar a lo observado en las líneas de *A. thaliana* sobre-expresoras para WTAP (Vespa et al., 2004; Zhong et al., 2008). En estas se hallaron defectos en el desarrollo de la flor, tales como, la conversión parcial de estambres a pétalos y una menor obtención de semillas, pero a diferencia de las mutantes *mta*, éstas aún presentaron viabilidad (Bodi et al., 2012). A diferencia del trabajo de Vespa et al., 2004, Bodi et al., 2012 encontraron que una pérdida de WTAP en *A. thaliana* lleva a un fenotipo letal durante el desarrollo embrionario causado por un fuerte retraso en el desarrollo del endospermo y un arresto durante el desarrollo embrionario.

Desmetilasas (*erasers*)

A la fecha se han reportado sólo dos proteínas con actividad desmetilasa encargadas de remover las marcas m⁶A de los mRNA, llamadas *erasers* (borradores). La primera fue FTO (*Fat mass and obesity-associated protein*), que inicialmente se le relacionó con procesos de desmetilación de la N³-metiluridina de ssRNA (*single stranded RNA*) así como también con la desmetilación

de 3-metilimina en ssDNA (Jia et al., 2008). De manera reciente se demostró que FTO cuenta con la capacidad de desmetilar las marcas m⁶A en mRNAs, esta desmetilación genera inestabilidad y un mayor decaimiento en los mRNAs (Mauer et al., 2017), pero también se encarga de remover las marcas internas de m⁶A en el U6 snRNA.

Por otra parte, la modificación m⁶A_m en snRNAs, es llevada a cabo por la metiltransferasa PCIF1, mientras que de la marca m¹A (N¹-metiladenosina) del tRNA y señalada como represora del proceso de traducción (Wei et al., 2018), aún se desconoce a la proteína escritora encargada de adición (Ma et al., 2021), pero se sabe que esta reprime el proceso de traducción. Adicionalmente su localización a nivel subcelular también dicta su especificidad puesto que al expresarse en núcleo la marca m⁶A es su blanco, por el contrario en citoplasma lo es m⁶A_m (Wei et al., 2018). De manera importante, cabe destacar que la presencia de este grupo de proteínas fue la primera evidencia de la reversibilidad de las modificaciones postranscripcionales en los mRNAs (Yang et al., 2018).

La segunda enzima descubierta con actividad de desmetilasa es ALKBH5 (*Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 5*), reportada por primera vez por Zheng et al., 2013, presenta afinidad únicamente por m⁶A a diferencia de FTO (ver [Figura 3](#)) que tiene la capacidad de desmetilar m⁶A_m y m⁶A (Mauer et al., 2017). ALKBH5 cuenta con un centro de unión a hierro el cual lleva a cabo las funciones de desmetilación, esto fue corroborado con la generación de proteínas mutantes para las histidinas en las posiciones 204 y 266, que fueron reemplazadas por alaninas, resultando en una disminución de la actividad desmetilasa en ensayos *in vitro*. Por otra parte, también se observó la preferencia de esta desmetilasa por las secuencias consenso DRm⁶ACCH y se determinó su localización en los gránulos de intercromatina (Zheng et al., 2013), asumiéndose que si desmetila mRNA esto debe ocurrir durante la biogénesis del mismo. Ratones *knockout* para ALKBH5 presentan defectos durante la espermatogénesis, en este proceso la enzima se encarga de remover las m⁶A en los pre-mRNAs y con esto permite la producción de mRNAs con regiones 3'UTR más largas (Meyer y Jaffrey 2016).

En la briofita *Physcomitrella patens* se predijo solamente la presencia de ALKBH16, mientras en *A. thaliana* se predicen al menos 13 proteínas homologas a ALKBH5 de *E. coli* y 5 presentan homología con ALKBH5 de humano (Duan et al., 2017). De estas 13 ALKBH5 al menos 6 presentan diferentes tipos de localización subcelular, siendo las más predominantes la

nuclear y la citoplasmática, pero su función aún no ha sido caracterizada (Mielecki et al., 2012). *In vitro* se demostró que AtALKBH9B de *A. thaliana* puede desmetilar ssRNAs y se localiza en los cuerpos P (*P bodies*), estos son gránulos citoplasmáticos formados en el citosol, compuestos principalmente de mRNAs reprimidos durante la traducción y proteínas relacionadas con el decaimiento de los mRNAs (Luo, Na, & Slavoff, 2018). Además, se hipotetiza que también interactúa con UPF1 (proteína reguladora de los transcritos con codones de paro prematuros) interviniendo en la vía del decaimiento mediado por codones de paro en el mRNA (*Nonsense mediated mRNA decay*). Por otro lado, AtALKBH9B también modula de manera positiva la infección por el virus del mosaico de la alfalfa (AMV) al interactuar con la proteína de cubierta (CP por sus siglas en inglés) promoviendo la acumulación de su transcrito y de su proteína (Martínez-Pérez et al., 2017). Otra de las proteínas descubiertas y caracterizadas que cuenta con homología a ALKBH5 de humanos en *A. thaliana* es ALKBH10, que tiene como sustrato fisiológico a la marca m⁶A en mRNAs exclusivamente, esto se demostró por ensayos en plantas silvestres y mutantes para ALKBH10 en mRNAs, tRNAs y rRNAs aislados de estas plantas, donde se cuantificaron las relaciones m⁶A/A, m¹A/A, m⁵C/C, y m¹G/G, viéndose únicamente incrementada la cantidad de m⁶A en las mutantes con respecto a la silvestre, y una disminución de esta marca en las plantas silvestres con respecto a las mutantes. A nivel fisiológico, se encontró que esta proteína está involucrada en los eventos de floración y desarrollo vegetativo, regulando de manera postranscripcional a los genes SPL3, SPL9 y FT (*Squamosa promoter-binding-like protein* y *Flowering Locus T*), puesto que, en plantas bajo el fondo mutante de ALKBH10 la floración se retrasa, el número de hojas antes de la floración aumenta y el desarrollo de la hoja sufre un retraso con respecto a las plantas silvestres (Duan et al., 2017).

Lectoras potenciales (*readers*)

Finalmente, la modificación m⁶A debe ser reconocida e interpretada para el correcto metabolismo del mRNA y consecuente relevancia biológica, esta función está a cargo de las proteínas lectoras de m⁶A. Estas proteínas son el enfoque del presente trabajo de tesis, por lo que se detallará a continuación lo que se conoce al respecto. Las proteínas lectoras han sido divididas en lectoras potenciales, conocidas así porque no tienen una alta afinidad por la marca m⁶A ni por el motivo consenso DRm⁶ACH (Zaccara, Ries, & Jaffrey, 2019, Berlivet et al., 2019) y lectoras YTH (ver [Figura 3](#)), las mejor estudiadas, y con una afinidad demostrada por el motivo consenso DRm⁶ACH (Zhang et al., 2010). Un ejemplo de lectoras potenciales es el factor de inicio de la

traducción de eucariontes (eIF3), este puede unirse a una marca de m⁶A en la posición 5' UTR y con esto desencadenar la unión del complejo 43S (formado por las subunidades eIF-3, eIF-1, eIF1A y el aa-tRNA unido a eIF-2) independientemente de la presencia del factor eIF4E. Esto se ha caracterizado en situaciones de estrés celular, permitiendo la traducción independiente del cap 5' en mensajeros específicos (Meyer et al., 2015).

La familia IGF2BP (*Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins*), es otro ejemplo de lectoras potenciales; de acuerdo a lo demostrado por (Huang et al., 2018), mediante ensayos de *pulldown* sobre mRNAs sintéticos con la marca m⁶A en la secuencia consenso YGG(m⁶A)C (Y= C/U), la cual guarda similitud con la secuencia DRACH reconocida por las proteínas YTH, mostrando una afinidad de 3 a 4 veces mayor por los mensajeros metilados. El mecanismo completo de reconocimiento de la metilación es desconocido hasta ahora, pero se encontró que las IGF2BP utilizan sus motivos KH3 y KH4 para reconocer la marca m⁶A, y así estabilizan a los mensajeros almacenándolos en *P-bodies* durante eventos de estrés para su posterior procesamiento, es decir, propiciar su traducción o degradación. Por otra parte, FMR1 (*FMRP Translational Regulator 1*) es considerada una lectora, ya que se encontró unida a motivos de RNA similares al motivo RRACH. Pero, a diferencia de las IGF2BP, se presume que pueda ser una lectora indirecta, puesto que también se le encontró interactuando con YTHDF2 (ver siguiente sección) para estabilizar el mRNA; poniendo en tela de juicio su función como lectora propiamente dicha, puesto que se une por igual a las adeninas metiladas y no metiladas (Zhang et al., 2018).

Proteínas lectoras YTH (*readers*)

Las proteínas lectoras YTH se identificaron por primera vez en humanos como el factor de *splicing* YT521-B, nombradas así por la presencia del dominio YTH (*YT521-B homology*) en la proteína (Zhang et al., 2010), y se distribuyen ampliamente en diferentes eucariotas además del humano, tales como *A. thaliana*, *Oryza sativa*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, entre otros (Stoilov, Rafalska, & Stamm, 2002). Muy pronto el dominio YTH se reconoció como altamente conservado entre los eucariotas. Actualmente y gracias a la reconstrucción filogenética realizada por Scutenaire et al., 2018, se ha clasificado a estas proteínas en dos grandes clados: *YTH Domain Family protein (YTHDF)* y *YTH Domain Containing protein (YTHDC)*. El dominio YTH se caracteriza por presentar una estructura canónica de tres α hélices y seis hojas β . Las hojas β se encuentran en forma de barril, y en el interior del barril se encuentran las tres α hélices, formando una caja aromática-hidrofóbica que reconoce a la marca m^6A del mRNA (Figura 3).

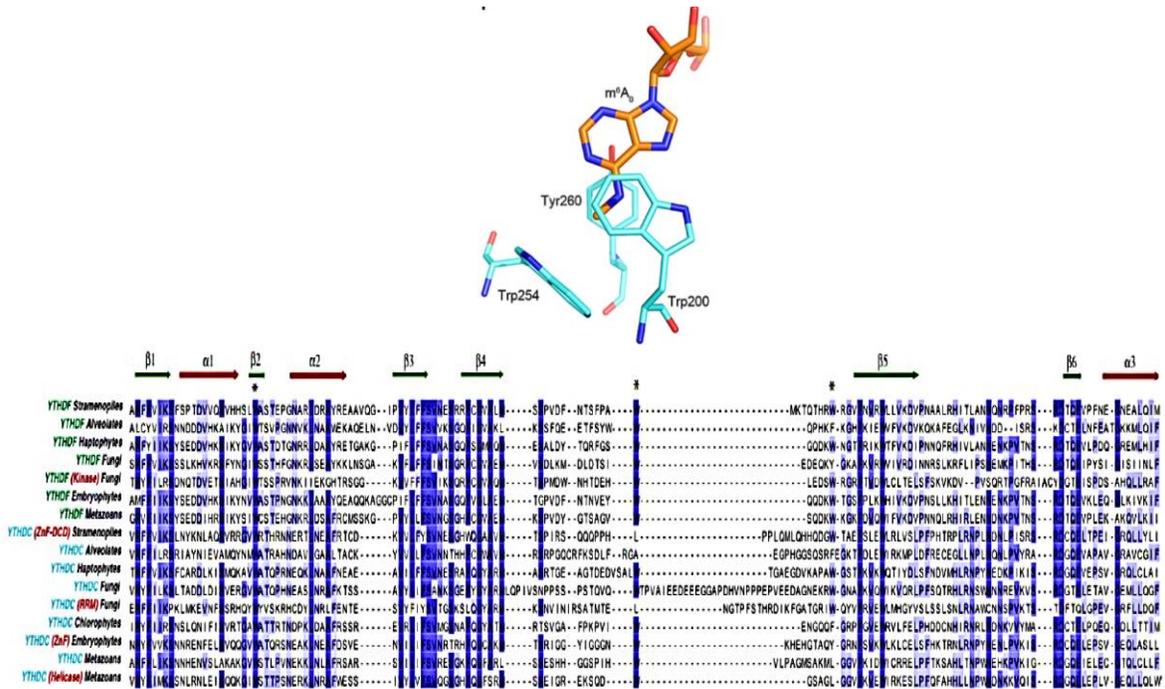


Figura 3. Dominio YTH. Se muestra el alineamiento de diferentes proteínas YTH en diferentes taxones. Es importante señalar las tres α -hélices, las seis láminas β (flechas rojas y verdes, respectivamente) y los tres triptófanos (en el caso de las YTHDF), señalados por el *, conservados en los diferentes organismos estudiados. (Tomados de Luo y Tong, 2014 y Berlivet et al., 2018)

Para las proteínas YTHDC esta caja está formada por los aminoácidos WWL, mientras que en el clado YTHDF la secuencia conservada es WWW (siendo el motivo más común) o por los aminoácidos WWY (encontrado mayoritariamente en levaduras) (Berlivet et al., 2019). En cuanto a los humanos se refiere, un cambio en el triptófano central por una alanina conduce a la pérdida de la función lectora de m⁶A (S. Luo & Tong, 2014), mientras que en *A. thaliana* la sustitución de estos tres triptófanos genera una pérdida en la función de la proteína AtYTHDF2A o ECT2, *Evolutionarily conserved C-Terminal region*, (Scutenaire et al., 2018).

Lectoras del subclado DC

YTHDC1 y su papel como lectora de m⁶A en núcleo

En humano encontramos a dos proteínas de la familia YTHDC: DC1 y DC2, así como tres proteínas YTHDF: DF1, DF2, DF3. La proteína YTHDC1 se localiza en el núcleo en estructuras en forma de puntos, inicialmente llamados cuerpos YT, los cuales aparecen al inicio de la fase S en el ciclo celular y se dispersan durante la mitosis. Cuando a la proteína se le eliminaron los dominios localizados en los extremos amino terminal (dominio rico en ácido glutámico) y carboxilo terminal (región rica en ácido glutámico y arginina), la formación de los cuerpos YT se vio reducido (Hartmann et al., 1999; Nayler, Hartmann, & Stamm, 2000). Actualmente se piensa que los cuerpos YT son en realidad motas nucleares (*Nuclear speckles*) (Zaccara et al., 2019) basados en su localización asociada con las proteínas SRSF3 y SRSF10 (W. Xiao et al., 2016) así como en estudios de proteómica de estos organelos (Saitoh et al., 2004). A YTHDC1 se le relacionó con la eficiente regulación de la expresión genética de sus transcritos blancos, al participar en el proceso de *splicing* del transcrito de SRp20 en células HEK293 (Hartmann et al., 1999).

Por otra parte, se también se relacionó su actividad en labores de *splicing* al demostrarse que interactúa con el extremo carboxilo de la proteína SRSF3 (*Serine and Arginine rich Splicing Factor 3*) por medio de su extremo amino. Esto, aunado a su presencia en gránulos de intercromatina, sugiere que YTHDC1 se une a mRNAs metilados justo después de haber sido transcritos para promover la inclusión de exones al reclutar a SRSF3, y bloquear la actividad de SRSF10, y de esta forma promover la exclusión de exones en el mensajero maduro (W. Xiao et al., 2016; Zaccara et al., 2019). Finalmente también se le ha asociado con procesos epigenéticos como el silenciamiento mediado por el lncRNA XIST (*X-inactive specific transcript RNA*, encargado del silenciamiento del cromosoma X), presentando una mayor afinidad por la unión a

éste y otros lncRNAs metilados en comparación con mRNAs. Es importante destacar que la pérdida de marcas m⁶A en XIST lleva a una pérdida en el silenciamiento mediado por este lncRNA (Patil et al., 2016).

En plantas, se sabe que de manera general las dicotiledóneas y algunas briofitas presentan dos proteínas del clado YTHDC, repartidas a su vez en dos subclados: YTHDCA y YTHDCB, al contrario de las monocotiledóneas, las cuales sólo cuentan con proteínas del subclado YTHDCA, lo cual sugiere que la versión DCB del motivo YTH se perdió en el ancestro común de las monocotiledóneas (Scutenaire et al., 2018). Finalmente, al momento se ha encontrado que de las 13 proteínas YTH de *A. thaliana*, YTHDC1A codifica para una proteína relacionada con el complejo de poliadenilación de mRNA, CPSF30, que posee un dominio YTH (Bruggeman et al., 2014; Song et al., 2021).

YTHDF1 y YTHDF2. Lectoras del mismo subclado, funciones distintas

Dentro de la familia YTHDF, las proteínas mejor estudiadas son YTHDF1, YTHDF2 y YTHDF3, presentes en humanos. YTHDF3 trabaja en conjunto con YTHDF1 y 2 estabilizando el transcrito y propiciando su traducción o llevándolo a su degradación, respectivamente (Shi et al., 2017). Es importante señalar que hasta ahora las proteínas YTHDF no presentan propiamente la actividad directa para potenciar la traducción o el decaimiento de los mensajeros, en cambio, esto lo logran mediante la interacción con otras proteínas efectoras a través de los dominios alojados en sus extremos N-terminales. Un ejemplo de esto es la proteína YTHDF1, la cual tiene como función potenciar la traducción de sus mensajeros blanco vía su extremo amino con el cual, según Wang et al., 2015, recluta a factores de inicio de la traducción para promover la síntesis proteica a partir de los transcritos. La información anterior se contrapone un poco con los resultados hallados por Meyer et al., 2015, quienes aseguran que YTHDF1 no interactúa con eIF3, aunque no evaluaron si YTHDF1 potencia o no la traducción. Por su lado, YTHDF2 de humanos interactúa con el complejo con actividad desadenilasa CCR4-NOT a través de su extremo amino-terminal, desencadenando la degradación de sus mensajeros blanco (Du et al., 2016; Wang et al., 2015).

Todo lo anterior se ha reportado casi en su totalidad en humanos, pero ¿qué ocurre en las plantas? A la fecha se sabe que dentro del reino Plantae el único filo que no presenta ningún tipo de proteína YTH son las Rodofitas, mientras que ambos tipos (YTH DF/DC) se encuentran en

todas las embriofitas (Berlivet et al., 2019; Scutenaire et al., 2018). Dentro de las embriofitas *A. thaliana* es la mejor estudiada, cuenta con 11 proteínas YTHDF y sólo dos YTHDC; YTHDC1B (ECT12) y YTHDC1A (CPSF30). Por contener el motivo YTH altamente conservado en su extremo carboxilo se les denominó Proteínas ECT (*Evolutionary Conserved C Terminus*) (Ok et al., 2005). En *A. thaliana* el transcrito de ECT2 (AtYTHDF2A) en conjunto con ECT3 (AtYTHDF3A), son los más abundantes de manera general durante todo el desarrollo, participando de manera activa en la formación y emergencia de hojas nuevas, asegurando el tiempo de emergencia y el correcto desarrollo de las hojas (Arribas-Hernández et al., 2018). Así mismo, YTHDF2A también participa en la morfogénesis de tricomas, puesto que la mutante de pérdida de función del dicho gen genera ciclos extra de endoreduplicación, desembocando a su vez en la formación de tricomas extra-ramificados (Arribas-Hernández et al., 2018; Scutenaire et al., 2018; L.-H. Wei et al., 2018). A nivel molecular, esto ocurre porque la falta de YTHDF2A induce la regulación negativa y la rápida degradación de al menos tres transcritos relacionados con la morfogénesis de tricomas que presentan la marca m⁶A. Por otra parte, se encuentra que la generación de un mutante doble YTHDF2A y YTHDF3A agrava la sobre-ramificación del tricoma, sentando las bases que apoyan una posible función redundante entre estas dos proteínas. Continuando con YTHDF2A y DF3A, estas pueden encontrarse en el citoplasma, apoyando las hipótesis de su implicación en procesos de regulación de la traducción y estabilidad de mRNAs. Empero, cómo ocurre este control, es desconocido a la fecha (Arribas-Hernández et al., 2018; Berlivet et al., 2019). Además, también es importante resaltar la posición donde fueron mutadas estas proteínas ECT, puesto que para ECT2 el cambio del primer triptófano (W⁴⁶⁴) o de los últimos dos en conjunto (W⁵²¹ y ⁵³⁴) por una alanina genera una pérdida de función en esta proteína, mientras que para ECT3 una mutación, nuevamente, del primer triptófano (W²⁸³) causa la pérdida de función de esta proteína, sugiriendo la importancia de al menos el primer triptófano en el reconocimiento de la metilación por estas proteínas en *A. thaliana*.

¿El cisma del arquetipo?

Antes de concluir la parte correspondiente a las proteínas lectoras en el marco teórico, me gustaría añadir información reciente que desafía al “modelo clásico” —por llamarlo de alguna forma—. Modelo que como mencioné anteriormente asigna una función diferente a cada una de las YTHs. YTHDF1 se ha relacionado con el proceso de traducción, a YTHDF2 con el proceso de decaimiento de los mRNAs, mientras que a YTHDF3 se le identifica como una proteína potenciadora de las funciones de YTHDF1 y YTHDF2 (Figura 4, panel superior).

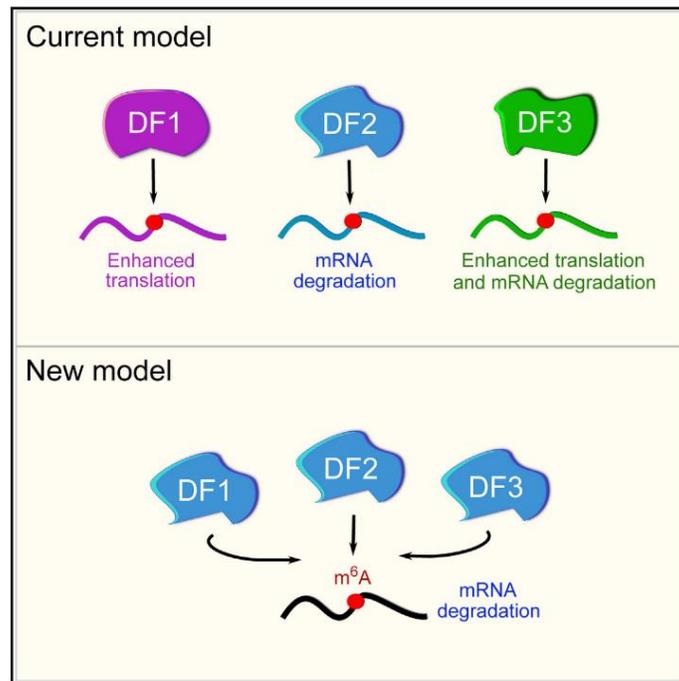


Figura 4. ¿El cisma del arquetipo? En la presente figura se ejemplifica el modelo nuevo (*New model*) confrontado al modelo actual -“modelo clásico”-. (Tomado de Zaccara y Jaffrey, 2020).

El trabajo reciente de Zaccara y Jaffrey, contrario al “modelo clásico”, establece que en humanos estas tres proteínas tienen la función redundante de ocasionar el decaimiento de los mRNAs por igual —“modelo nuevo”—, tal como se muestra en la Figura 4, es decir, no hay especificidad por transcritos blanco entre las tres, además de echar por tierra la premisa bajo la cual YTHDF1 está involucrada en procesos de traducción y añadir que los procesos de diferenciación celular se llevan a cabo de forma conjunta por las tres proteínas (Zaccara & Jaffrey, 2020). Es importante señalar que estos resultados provienen de análisis de transcriptoma generado por iCLIP (*individual-nucleotide-resolution UV crosslinking and immunoprecipitation*,

por sus siglas en inglés) realizados por este grupo de trabajo y confrontados con datos de múltiples trabajos previos que sustentan el modelo clásico (Shi et al., 2017; Wang et al., 2014, 2015), así como por el análisis BioID del interactoma generado por Youn et al., 2018, en el que se demuestra la interacción entre las tres YTHDF con el complejo CCR4-NOT; es importante señalar que la unión con CCR4-NOT es conocida desde el trabajo de Du et al., 2016.

En adición, el trabajo realizado por Lasman y colaboradores propone un modelo más sobrio en el que cada YTH tiene una expresión distinta y supeditada al linaje y contexto celular específico (Lasman et al., 2020); y a diferencia de lo planteado por Zaccara & Jaffrey, 2020 Lasman y colaboradores proponen cierta especificidad de las proteínas lectoras hacia subpoblaciones de mRNAs es decir, tanto YTHDF1 como YTHDF3 comparten transcritos blancos con YTHDF2, pero también con blancos específicos de cada una. En lo que sí concuerdan ambos trabajos es en que las tres proteínas lectoras promueven el decaimiento de los mRNAs blanco, suponiendo así un cambio en el paradigma clásico.

Physcomitrella patens

Physcomitrella patens, recientemente renombrada *Physcomitrium patens*, pertenece al grupo de los musgos verdaderos, Briofitos, los cuales se considera que comparten un ancestro en común con las plantas con flor del cual divergieron hace aproximadamente 200-400 Ma. En vida silvestre *P. patens* se encuentra distribuida sólo en América del Norte y Europa, y la producción de sus esporas ocurre entre los meses de septiembre a marzo (D. Cove, 2005). Por otra parte, se encuentra mayoritariamente en suelos húmedos, en especial cerca de lagos, estanques, ríos y de manera general cerca de lugares propensos a inundaciones (Cove et al. 2009). Este musgo se ha utilizado por cerca de 100 años en investigación. En los últimos 20 años ha sido un modelo de estudio que ha incrementado el conocimiento de distintos procesos biológicos de las plantas, todo esto potenciado por la secuenciación y ensamblado de su genoma.

Por otro lado, *P. patens*, como el resto de las plantas, se caracteriza por presentar un ciclo de vida con alternancia de generaciones (Figura 5). Esta alternancia consiste en una fase gametofítica (fase haploide), y una fase esporofítica (fase diploide). A pesar de contar con las dos, la fase dominante es la haploide, durante la cual las esporas haploides germinan dando lugar

al estadio protonemal (Cove, 2005). El protonema se caracteriza por presentar filamentos de células que se extienden por divisiones seriales de las células apicales, inicialmente el protonema se caracteriza por contar principalmente con células cloronemales que cuentan con gran cantidad de cloroplastos alargados. Las células apicales del cloronema dan lugar a los filamentos del caulonema. Los filamentos del caulonema se distinguen por contar con menos cloroplastos bien diferenciados. Otra diferencia entre caulonema y cloronema es una mayor tasa de división celular del caulonema con respecto al cloronema (Cove et al., 2009).

Ocasionalmente, las células subapicales del caulonema se dividen y ramifican para formar a los brotes axiales, los cuales suponen un cambio de vida de 2D a 3D en la planta que desembocarán en la formación de la estructura tipo foliar conocida como gametóforo. *P. patens* al ser una planta monoica produce en esta estructura tanto los gametos masculinos (espermatozoides) en los anteridios, como los femeninos (célula huevo) en los arquegonios. Cuando se produce la reproducción sexual (Figura 5), los cigotos fertilizados ($2n$) se desarrollan dentro de los esporofitos dando lugar a la formación de la espora madre de la cual, mediante meiosis, se generan las esporas que en condiciones adecuadas germinarán para dar inicio al ciclo haploide.

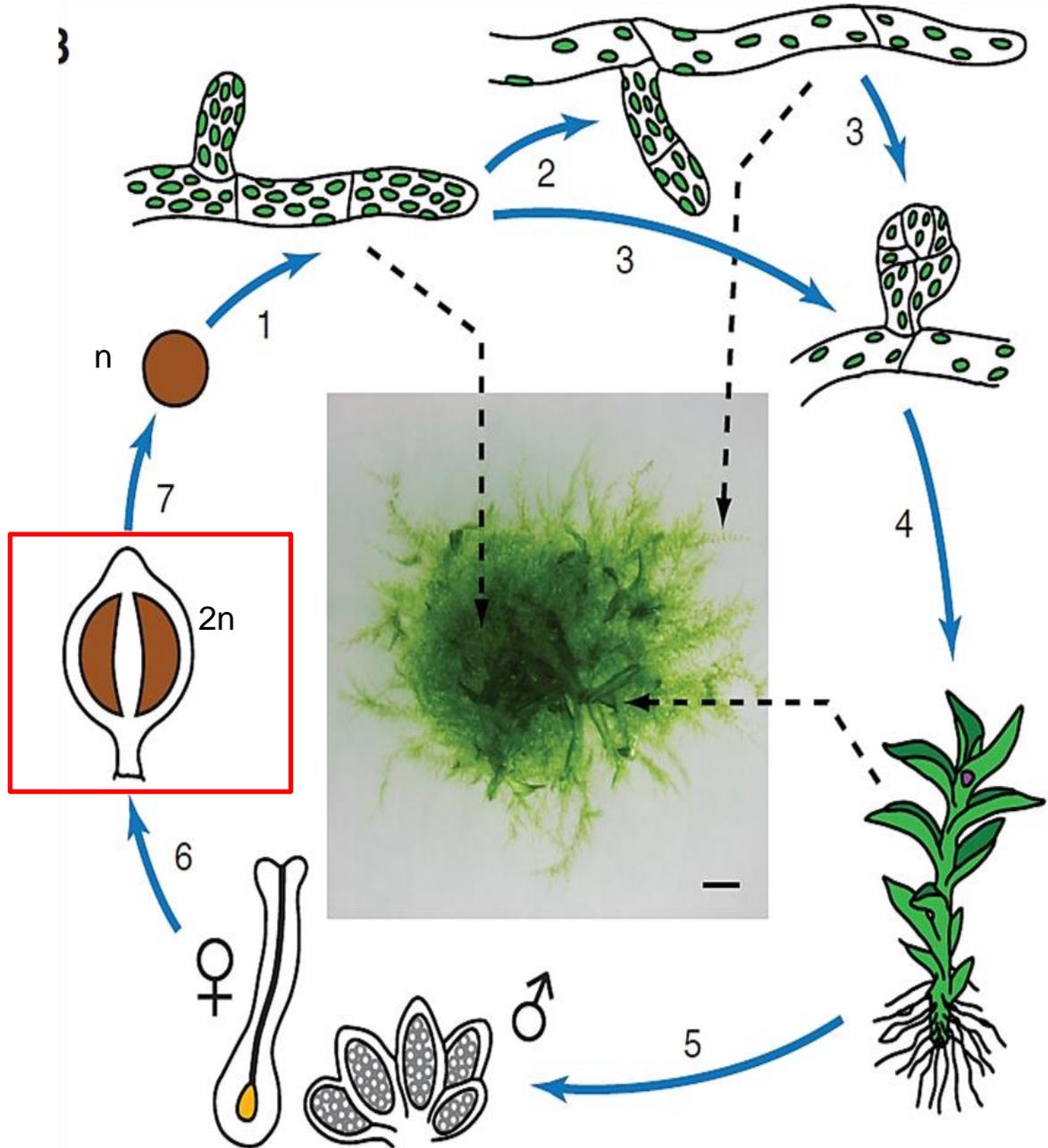


Figura 5. Ciclo de vida de *P. patens*. El ciclo comienza cuando una espora haploide germina para dar lugar a una red densa de filamentos de cloronema (1). Pasadas dos semanas, células al azar del cloronema se alargan para formar al caulonema (2). Las células apicales del caulonema comienzan una serie de divisiones oblicuas dando lugar a la generación del brote (etapa de vida clave) (3). El cambio de vida 3D dará lugar a la aparición del gametóforo (4); en este se desarrollarán los órganos sexuales (5). En estos se producirá la fecundación dando lugar al esporofito maduro donde se desarrollará la espora madre (6). La cual sufrirá de una serie de divisiones meióticas dando paso nuevamente a las esporas haploides (7). Tomado de Plavskin *et al.* 2016.

Antecedentes directos

Finalmente, al momento en que esto escribo, el conocimiento del funcionamiento de las proteínas YTH en plantas continúa siendo limitado/escaso/**incipiente**. Buscando subsanar esta brecha de conocimiento, en el equipo de trabajo liderado por el Dr. José Luis Reyes hemos comenzado con estudios en el modelo de musgo *P. patens*, pues al ser una planta basal cuenta con menos miembros proteicos en las dos familias de proteínas lectoras PpaYTHDF/DC (Scutenaire et al., 2018), tal como también ocurre en la planta hepática *Marchantia polymorpha*, otro modelo de estudio en briofitas. Como primera aproximación tenemos el trabajo de maestría de Garcias, 2018, quien centró su trabajo en la caracterización de mutantes de la maquinaria de metilación en *P. patens* (PpMETTL3, PpMETTL14A/B y PpWTAP), generadas con la ayuda del sistema CRISPR-Cas9 en colaboración con el grupo del Dr. Fabián Nogué (Institut Jean-Pierre Bourgin, Francia).

Como resultados, al mutar al gen de la proteína METTL3 del complejo metiltransferasa de m⁶A se encontró una reducción en los niveles de metilación de los mRNAs, pero esto no afectó el establecimiento ni el desarrollo del protonema, empero sí la formación de brotes axiales y el desarrollo de gametóforos, retrasando el desarrollo de los mismos en comparación con las plantas silvestres. Por último, el fenotipo más dramático fue obtenido en los mutantes de METTL3, WTAP y la mutante cuádruple (METTL3, METTL14A/B y WTAP), en los cuales la pérdida completa de la función del complejo metiltransferasa m⁶A ocasionó letalidad a nivel de esporas, impidiendo el desarrollo y germinación de las mismas. Los resultados anteriores son la base para continuar el análisis de los mecanismos completos, la importancia de la metilación (m⁶A) en mRNAs y su interpretación correcta por las proteínas lectoras YTH, convirtiéndose en aliciente para el desarrollo de futuros trabajos siguiendo la misma línea de investigación.

Pregunta de investigación e Hipótesis, y Objetivo general y Particulares

Pregunta de investigación

¿Cuál es la función de las proteínas PpaYTHDF1 y PpaYTHDF2 durante el desarrollo de *Physcomitrella patens*?

Hipótesis

Las proteínas PpaYTHDF1 y PpaYTHDF2 participan en el desarrollo de *Physcomitrella patens* regulando el metabolismo de mRNAs.

Objetivo general

Determinar si los factores PpaYTHDF1 y PpaYTHDF2 contribuyen al correcto desarrollo de *Physcomitrella patens*.

Objetivos particulares

1. Caracterizar los genes *PpaYth*, enfocándose en analizar los patrones de acumulación de sus transcritos en diferentes etapas de desarrollo y los elementos contenidos en su secuencia proteica empleando herramientas bioinformáticas.
2. Eliminar los genes *PpaYthdf* de interés mediante edición genómica para determinar el efecto fenotípico de la ausencia de proteínas correspondientes durante el desarrollo de *P. patens*.
3. Diseñar y obtener construcciones genéticas que permitan estudiar la función del extremo amino de las proteínas PpaYTHDF en el metabolismo de los mRNAs.

Materiales y métodos

Material biológico: *P. patens* – Gransden. Cultivo y propagación

La propagación de material silvestre para los siguientes ensayos se llevó a cabo de manera semanal, comenzando con protonema disgregado 7 días antes y plaqueado en medio PpNH₄ (para su elaboración ver Anexos). A continuación, se prepararon cajas con medio PpNH₄ y se dispuso sobre cada una de estas un disco de celofán dulce esterilizado por autoclave; luego, con una espátula de metal se colectó todo el musgo de la placa previa. Este fue puesto en tubos para microcentrífuga de 2 ml, a los cuales previamente se les adicionó 1 ml de agua miliQ estéril y una canica de metal, posteriormente se utilizó el equipo FastPrep®-24 (MP Biomedicals) a velocidad mínima por 15 s para llevar a cabo la homogenización del tejido; finalmente, todo el material fue puesto sobre el disco de celofán dulce dispuesto sobre el medio de cultivo; se le dejó crecer durante una semana antes de realizar nuevamente el pase a una placa nueva, utilizando un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad (85 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a una temperatura de 25°C.

Determinación de la estructura 3D de las proteínas PpaYTHDF y PpaYTHDC de *P. patens* utilizando RaptorX (un modelador de proteínas)

Con el objetivo de determinar si PpaYTHDF y PpaYTHDC son proteínas lectoras de m⁶A, se utilizó el modelador en línea de proteínas y predictor de ligandos RaptorX (Källberg et al., 2012; Jianzhu Ma, Wang, Zhao, & Xu, 2013; Peng & Xu, 2011); seleccionando la opción *Old Structure Prediction Server*, proporcionándole las secuencias en formato FASTA de cada una de las proteínas de interés (PpaYTH), e incluyendo la predicción de los ligandos asociados a los dominios predichos para las mismas –para una mayor explicación del método revisar (Källberg et al., 2012)–. En aras de no sesgar la predicción de la estructura, se utilizaron los parámetros por defecto del modelador, sin proporcionarle un molde, tal como alguna de las proteínas PpaYTH de otro organismo, permitiendo que el programa generara el mejor alineamiento y enhebrado (*threading*) de la secuencia proporcionada contra alguna de las secuencias almacenadas en el *Protein Data Bank* (PDB, por sus siglas en inglés, <https://www.rcsb.org/>).

Determinación de la acumulación de los transcritos *PpaYths* con base en datos de microarreglos y bases de datos de expresión en *P. patens*

Para determinar la acumulación de los transcritos *PpaYth* se utilizó la base de datos de microarreglos del eFP Browser (Ortiz-Ramírez et al., 2016; Winter et al., 2007) ingresando los

números de acceso de cada uno de los genes de interés (Tabla 2 de Anexos). Por otra parte, se realizó una revisión de datos de expresión, tomadas de 7 artículos distintos (Arif et al., 2019; Beike et al., 2015; Frank & Scanlon, 2015; Khraiweh et al., 2015; L. Xiao, Wang, Wan, Kuang, & He, 2011; L. Xiao, Zhang, Yang, Zhu, & He, 2012; M. Zhao et al., 2018), en los cuales se evaluaron diferentes tratamientos a los que se sometió a *P. patens* y de los cuales se realizaron transcriptomas; al igual que con la base de datos eFP Browser, se utilizaron los números de acceso de cada uno de los genes de interés para realizar su búsqueda en estas publicaciones.

Determinación de la acumulación de los genes *PpaYths* en diferentes etapas del desarrollo del musgo mediante qPCR

La acumulación de los transcritos pertenecientes a los cuatro genes PpaYTH, fue cuantificada mediante RT-qPCR *-Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction-*, en los siguientes estadios de desarrollo: protonema de 7 días, protonema enriquecido en brotes (tratado con auxinas), y gametóforos; utilizando la siguiente mezcla de reacción: SYBR Green (2X) 7.5 µl, oligonucleótidos (Tabla 4 de Anexos) *forward* y *reverse* (10 µM) 0.5 µl, respectivamente; cDNA (50 ng) 1.5 µl y empleando un termociclador StepOne (Applied Biosystems). Como genes de referencia (Tabla 4 de Anexos) se utilizaron Actina y Ade PRT, *adenine phosphoribosyl-transferase*, (Le Bail, Scholz, & Kost, 2013).

Diseño y clonación de los plásmidos para la transformación de protoplastos

Las secuencias codificantes de los genes *PpaYthdf1* y *PpaYthdf2* de *P. patens* fueron utilizadas para la búsqueda del mejor crRNA precedido por el motivo PAM de *Streptococcus pyogenes* (NGG o NAG) utilizando la herramienta en línea CRISPOR V1 (<http://crispor.tefor.net/>) comparando contra la versión 11 del genoma de *P. patens* almacenado en Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Los mejores crRNAs fueron seleccionados con base en el menor número de *off-targets* y un mayor puntaje de especificidad por su blanco (Tabla 5 de Anexos). El gRNA generado fue ingresado en el plásmido pENT-gRNA-PpMETTL14-2 (Figura 6) utilizando la técnica de mutagénesis sitio dirigida, con ayuda de la enzima *Phusion Flash High-Fidelity*, como se describirá más adelante (Figura 17 de Anexos). Es importante

señalar que el plásmido pENT-gRNA-PpMETTL14-2 cuenta con un cassette de resistencia al antibiótico G418 dirigido por el promotor CaMV 35S para realizar el cribado de las plantas transformadas.

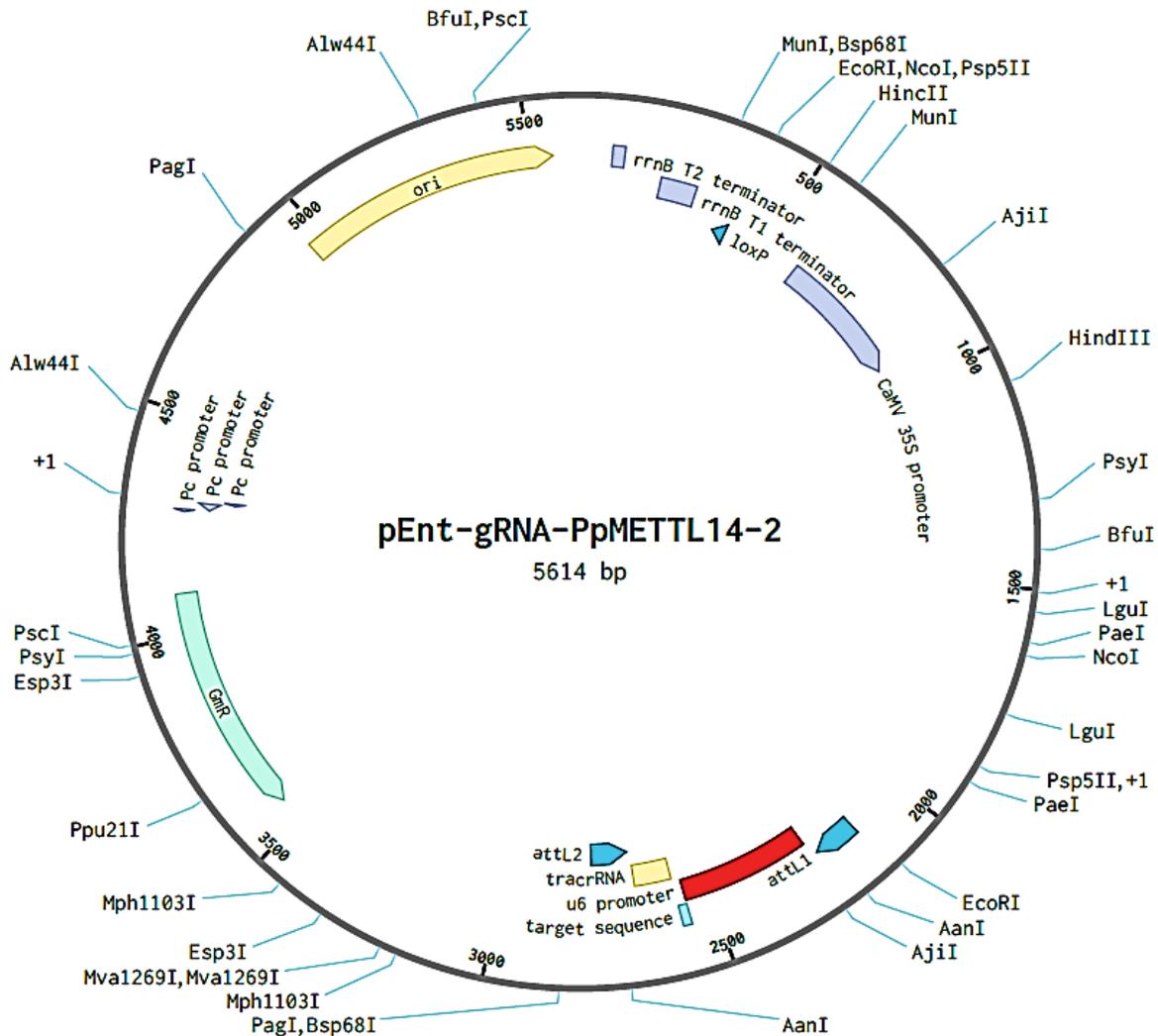


Figura 6. Mapa del plásmido pEnt-gRNA-PpMETTL14-2. Ejemplo del plásmido mutagénico donde irá el gRNA dirigido para mutar a *PpaYthdF1*, como se puede apreciar el gRNA representado por el rectángulo azul claro y el promotor endógeno U6 de *Physcomitrella* que dirige al gRNA está representado por el rectángulo rojo. Justo después del guía se halla el tracrRNA y entre los 3500 y 4000 pares de bases se halla el casete de resistencia a gentamicina.

De esta forma, el nuevo gRNA quedó bajo la regulación del promotor de U6 snRNA de *Physcomitrella*, U6::gRNA DF. Siguiendo estos lineamientos se generaron dos plásmidos mutagénicos que contienen un gRNA diseñado para realizar el corte en la base 1418 y 5140 del gen *PpaYthdf1* (Figura 7), estos gRNAs fueron nombrados DF1(1) y DF1(2). Para el gen *PpaYthdf2*, también fueron diseñados dos gRNAs, pero sólo se pudo obtener un plásmido con un gRNA diseñado para cortar en la base 2972 de este gen, este fue nombrado DF2(1) (Figura 7). La mezcla para el ensayo PCR fue la siguiente: (30 µl). 10.5 µl H₂O; 15 µl *Phusion Flash PCR Master Mix* (2X); 1.5 µl Oligo Fw (0.5µM), 1.5 µl Oligo Rv (0.5µM) y 1.5 µl pENT-gRNA-PpMETTL14-2 (10ng/ µl). El programa térmico fue el siguiente: 98°C (10 s) 1 ciclo; 98°C (1 s), 55°C (5 s), 72°C (2 min) por 35 ciclos; 72°C por 5 min de extensión final.

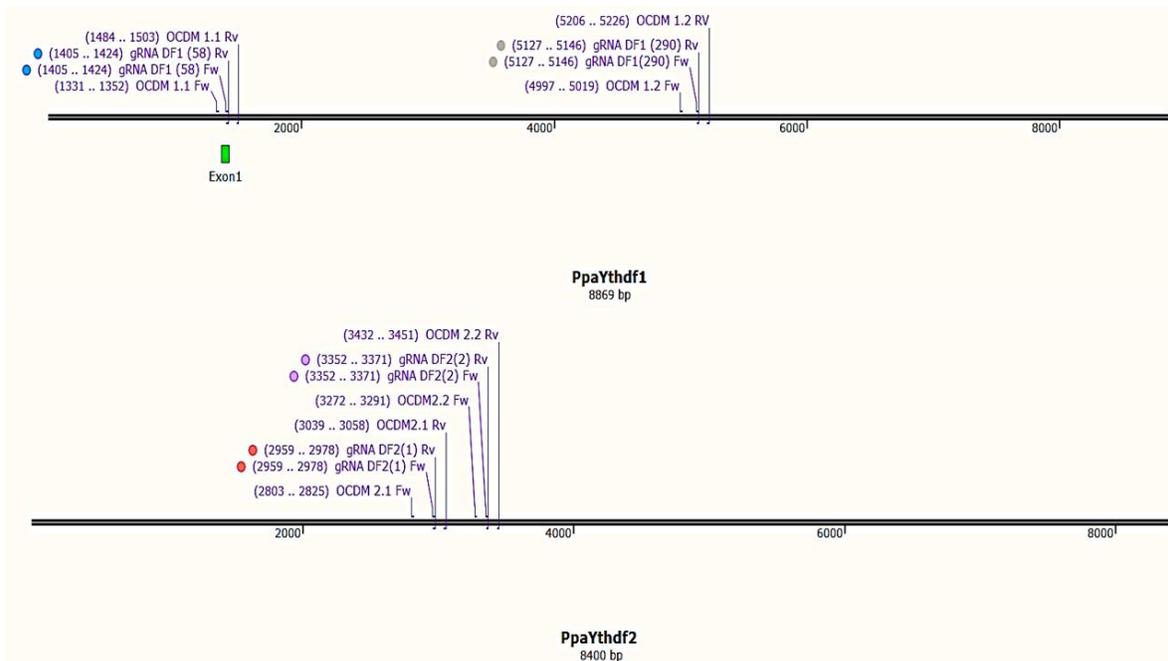
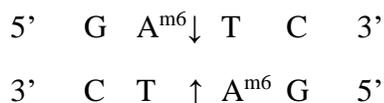


Figura 7. Mapas de los genes *PpaYthdf1* y *PpaYthdf2* donde se muestran los gRNAs diseñados para realizar las mutaciones en dichos genes, así como los oligonucleótidos utilizados para mapear la mutación ocasionada por la Cas9. Es importante señalar que para *PpaYthdf2* sólo se pudo obtener el gRNA DF2 (47).

Posteriormente este plásmido fue purificado con ayuda del kit GeneJET Gel Extraction Kit (#K0691, Thermo Scientific™), siguiendo las especificaciones del fabricante. Después, se procedió a realizar una reacción de digestión con la enzima de restricción DpnI (Thermo Scientific™), la cual genera el siguiente corte:



Esta reacción se llevó a cabo para eliminar el plásmido original, el cual al haberse obtenido a partir de un cultivo de bacterias se encuentra metilado, a diferencia del replicado durante la PCR. La mezcla para la reacción de digestión anterior es la siguiente: 2 µl Buffer tango (10X); 1 µl enzima DpnI y 17 µl de producto PCR purificado, utilizando el siguiente programa térmico: 37°C por una hora y 80°C 20 minutos. Finalmente, se realizó una purificación de DNA agregando 180 µl de H₂O a la mezcla anterior y 200 µl de fenol saturado con Tris. Se recuperó la fase acuosa y se agregaron 20 µl de acetato de sodio 3M (pH 5.2), a esta mezcla se le agregó un volumen de etanol frío al 100%, y se le incubó a -20°C durante dos horas. Para finalizar, se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 10 µl de H₂O mismos que se utilizaron para transformar bacterias quimiocompetentes.

Con el plásmido obtenido anteriormente se procedió a transformar bacterias *E. coli* quimiocompetentes de la cepa Top10 (Invitrogen). Para comenzar, los tubos con las bacterias quimiocompetentes se dispusieron en hielo durante diez minutos hasta descongelar por completo el inóculo. Posteriormente, se agregaron 3 µl del plásmido de interés (10 pg-100 ng), sin retirar el tubo del hielo, y se incubó por 30 minutos. A continuación, se realizó una incubación a 42°C por 2 minutos y después en hielo por 2 minutos, posterior a esto, se adicionaron 250 µl de medio S.O.C o LB al tubo que contiene las bacterias. Se procedió a una incubación a 37°C durante una hora con agitación a 300 rpm. Después, se sembraron 250 µl del inóculo en una placa con medio LB adicionado con antibiótico de selección kanamicina (50 µg/ml) y los 50 µl restantes en otra placa. El cultivo se incubó a 37°C toda la noche y a partir de las bacterias transformadas se aislaron las colonias resultantes para posteriormente llevar a cabo un miniprep casero.

Para amplificar y aislar el plásmido, se realizó un el miniprep de DNA se partió de las colonias aisladas anteriormente, realizando un cultivo de bacterias en medio LB adicionado con kanamicina. A partir de este cultivo se centrifugó a 8000g 1 ml de este cultivo durante 1 minuto, se descartó el sobrenadante y se conservó el botón, a este le agregó 250 μ l de solución A adicionada con RNAsa (10 μ l/ml) y se disolvió el botón de bacterias con ayuda del *Vortex*, posterior a la disolución se agregaron 250 μ l más de solución B y se mezcló por inversión, girando el tubo con suavidad, finalmente se agregaron 350 μ l de solución C (Receta en Anexos). A continuación, se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se agregó 0.6 volúmenes de isopropanol.

Posteriormente, se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 minutos. Después se procedió a lavar el botón con 500 μ l de etanol al 70%, se repitió la centrifugación a 15,000 rpm, pero sólo por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se suspendió en 30 μ l de H₂O. Finalmente se procedió a realizar una reacción de restricción con el plásmido obtenido como se describe a continuación: 2 μ l de Buffer O; 1 μ l BstXI; 2 μ l plásmido (más de 1 μ g) y 15 μ l de H₂O en un volumen final de 20 μ l, seguido de una incubación a 37°C por una hora.

Por otra parte, y tras haber realizado la reacción de restricción confirmatoria, se realizó un nuevo miniprep utilizando el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (#K0503, Thermo Scientific™), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se procedió a enviar una alícuota de estas muestras a la Unidad de Secuenciación del IBT, UNAM como un último paso de confirmación.

Finalmente, se realizó un maxiprep de DNA como se describe a continuación. Se obtuvieron 100 ml de cultivo líquido en medio LB adicionado con 100 μ l de antibiótico de selección (kanamicina 50 μ g/ ml) de 16 horas inoculado con 500 μ l de un precultivo de 14 a 16 horas de crecimiento. Para comenzar, se repartieron los 100 ml de cultivo en dos tubos de centrifuga de alta velocidad y se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 3 ml de la solución A fría, el botón se resuspendió con ayuda del vortex y/o pipeteo y con esos 3 ml de material suspendido se repitió la acción anterior en el otro tubo. A continuación, se agregó 6 ml de la solución B a temperatura ambiente. Se mezcló por inversión y se colocó en hielo por 2 minutos.

Después del período de incubación se procedió a agregar 6 ml de solución C fría, se mezcló por inversión y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se filtró utilizando toallas de papel kimwipes y se conservó el filtrado en un tubo de centrifuga de alta velocidad. A este filtrado se le agregaron 30 ml de etanol absoluto a temperatura ambiente, se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 15°C. Se descartó el sobrenadante y el botón se suspendió en 500 µl de buffer TE y 250 µl de acetato de amonio (7 M). A continuación, se procedió a incubar en hielo por 20 minutos, terminado el período de incubación se transfirió todo el volumen a un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml. Se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante se repartió en dos tubos de 2 ml y se agregó 1.5 ml de etanol absoluto frío a cada tubo.

Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 8 minutos; se descartó el sobrenadante y se suspendió en 200 µl de TE, se transfirió este volumen a un solo tubo y se agregaron 2 µl de RNAsa A (10 mg/ml) y 2 µl de NaCl (5M), la mezcla anterior se incubó a 37°C durante 30 minutos.

Después, se adicionaron 2 µl de proteasa K y 2 µl de SDS al 20% y se incubó, nuevamente a 37°C por 30 minutos. A continuación, se agregó un volumen de la solución fenol/cloroformo (1:1), se centrifugó a 13,000 rpm por 3 minutos, se tomó cuidadosamente la fase acuosa y se le transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml, y se le agregó un volumen de cloroformo, se procedió a centrifugar a 13,000 rpm por 3 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, y se agregó ½ volumen de acetato de amonio (7 M) y se mezcló por inversión, posteriormente se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío.

El volumen anterior se incubó a -20°C durante toda la noche. Después se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregaron 200 µl de etanol al 70 %. Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se realizó una centrifugación por 20 segundos para retirar el etanol restante con una punta de 10 µl. Finalmente, el botón resultante se suspendió en buffer TE estéril en una campana de flujo laminar.

Transformación de protoplastos y cultivo de *Physcomitrella patens*-Gransden

Para llevar a cabo la transformación de protoplastos de *P. patens* se siguió el método utilizado por el laboratorio de la Dra. M. Bezanilla (*Dartmouth College*) disponible en el *moss manual*

(<https://sites.dartmouth.edu/bezanillalab/moss-methods/>). En este caso se utilizaron los tres plásmidos mutagénicos DF1(1), DF1(2) y DF2(1), dirigidos a los genes PpaYthdf1 y PpaYthdf2, respectivamente, y a la par también se utilizó un plásmido distinto que contenía a Cas9 (Lopez-Obando et al., 2016) dirigido por el promotor de Actina de arroz (Act1::Cas9) (Figura 8).

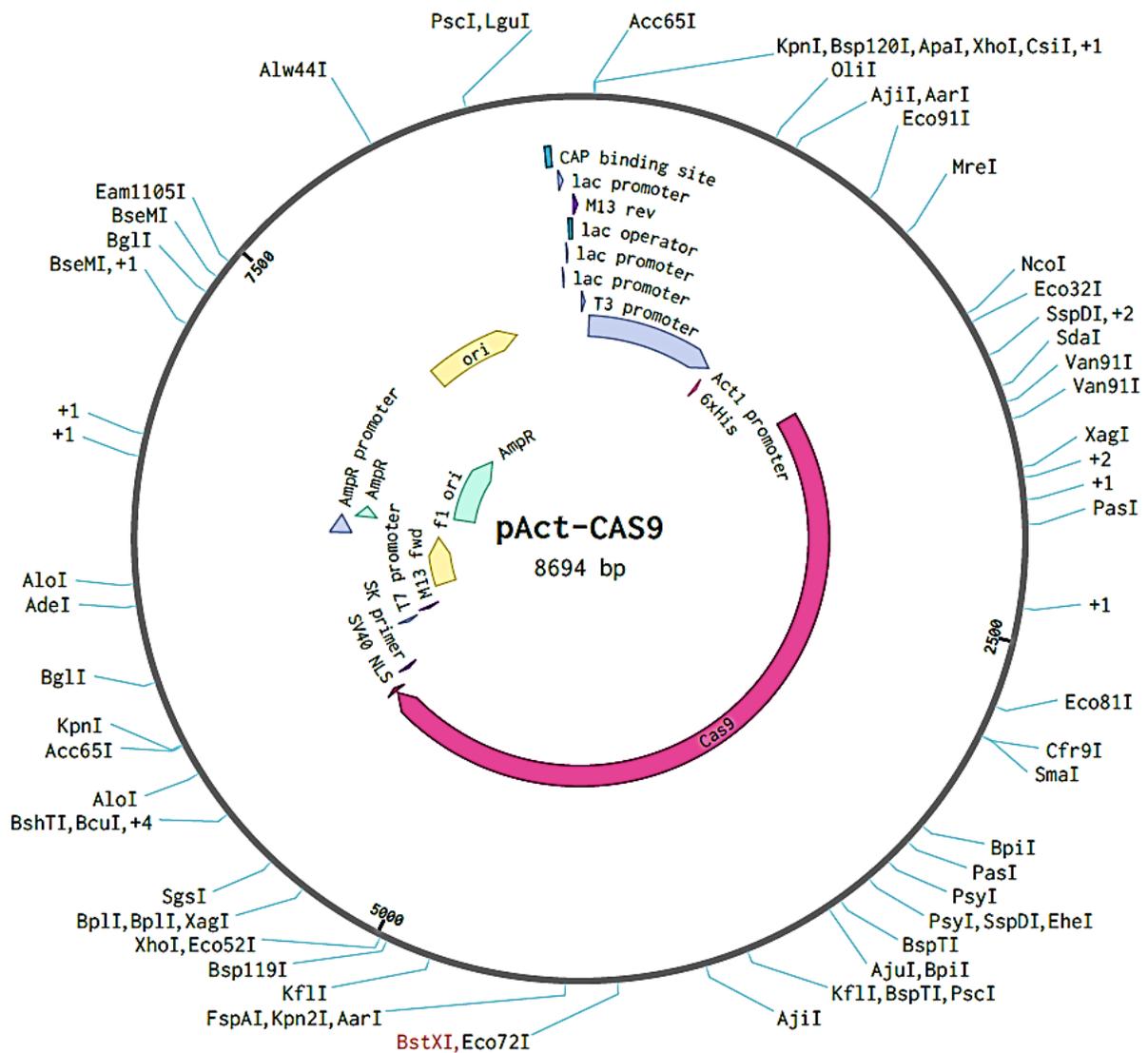


Figura 8. Mapa del plásmido Cas9. En rojo se aprecia el gen Cas9 y está dirigido por el promotor de actina 1 de arroz (Act1). Tomado de (Lopez-Obando et al., 2016).

Para la obtención de protoplastos de *Physcomitrella* se utilizaron placas con protonema de 5 a 7 días de desarrollo, cultivado sobre un disco de celofán dulce dispuesto sobre medio PpNH₄, como se describió anteriormente. A continuación, en una caja Petri estéril se agregaron 5 ml de driselasa (Sigma-Aldrich) al 2% y se dispuso el protonema colectado; este tejido se incubó por una hora en agitación lenta a temperatura ambiente. A continuación, se filtró el lisado a través de un embudo cubierto con una Miracloth estéril, con poros de 100 µm (Calbiochem ©), este filtrado fue centrifugado a 1096 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se procedió a lavar con 10 ml de manitol (8%). La centrifugación a 1096 rpm durante 5 minutos y los lavados con manitol se repitieron en dos ocasiones.

A continuación, se llevó a cabo la transformación de protoplastos mediante PEG, para lograr esto fue necesario suspender los protoplastos a una concentración de 2×10^6 protoplastos/ml en buffer 3M (ver Anexos). A continuación, se tomaron 300 µl de la solución de protoplastos y se le dispuso en un tubo para microcentrífuga de 2 ml; a esta alícuota se le adicionaron 5 µl de los plásmidos [10-25 µg] y 300 µl de PEG 8000 (40%), de inmediato se suspendió nuevamente mediante pipeteo y se le incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.

Terminado el período, se incubó a 45°C por 3 minutos, para después incubarlo 10 minutos más a temperatura ambiente para permitir la recuperación de los protoplastos. Finalmente, el contenido del tubo se esparció en dos cajas con medio PRMB (ver Anexos), en las que previamente se dispuso un disco de celofán dulce y “selló” la caja con cinta *micropore*; las cajas se incubaron en una cámara Percival (25°C, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad), durante una semana para su recuperación. Pasado este tiempo de recuperación, se transfirió el celofán con las plantas regeneradas a una placa con medio PpNH₄ adicionado con el antibiótico G418 (50 µg/mL) durante una semana, para seleccionar a las plantas que contaban con el plásmido mutagénico. Posteriormente, se volvió a realizar un pase del celofán dulce a una caja con PpNH₄ por una semana, y se procedió a aislar individualmente cada una de las plantas seleccionadas por dos semanas más, en medio PpNH₄ para la posterior extracción de DNA genómico y llevar a cabo la genotipificación de las mutantes.

Genotipificación de mutantes

La genotipificación se realizó extrayendo DNA genómico de las plantas recuperadas del proceso de transformación. Para la extracción se utilizó CTAB al 2% -receta en Anexos-, con el siguiente protocolo. Se tomó una pequeña porción de musgo a partir de un cultivo de dos semanas y se congeló con nitrógeno líquido, para facilitar su homogenización. A continuación, se agregaron 300 μ l de CTAB 2% y 3 μ l de RNAsa (1.37 μ g/ μ l) y se incubó el lisado a 65°C durante 15 minutos. Terminado el período de incubación la muestra se colocó en hielo y se agregaron 300 μ l de cloroformo; fue necesario mezclar por *vortex* durante 30 segundos, acto seguido se procedió a centrifugar a 13,000 rpm por 15 minutos. Terminado el paso de centrifugación se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y en este se agregaron 300 μ l de isopropanol.

Después se procedió a centrifugar nuevamente a 13,000 rpm por 10 minutos; el sobrenadante fue desechado y el botón resultante fue lavado con 500 μ l de etanol al 70%, se realizó otro paso de centrifugación a 13,000 rpm por 5 minutos. Finalmente, se desechó el sobrenadante y el botón resultante fue disuelto en agua libre de nucleasas y cuantificado mediante *Nanodrop*, para a continuación llevarlo a una concentración de 10 ng/ μ l y utilizarlo en una PCR posterior. La PCR para la genotipificación de las candidatas a mutantes se llevó a cabo utilizando la siguiente mezcla de reacción: 35 μ l de H₂O, 5 μ l buffer 10X, 5 μ l de MgCl₂ (25 mM), 0.5 μ l de dNTPs (10 mM), 1 μ l de oligonucleótidos OCDM *forward* y *reverse* (ver [Figura 7](#) y [Tabla 6](#) de Anexos); 1 μ l de Taq polimerasa (10U/ μ l), y 1 μ l de DNA (10 ng/ μ l). Los amplicones resultantes fueron purificados con la ayuda del kit GeneJET Gel Extraction Kit™ (Thermo), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los amplicones purificados fueron enviados a la Unidad de Secuenciación del IBt, UNAM; las secuencias resultantes fueron alineadas con ClustalW, utilizando como consulta la secuencia de los genes YTHDF1 y YTHDF2 de donde fueron generados los oligonucleótidos OCDM, para identificar inserciones o deleciones en la secuencia.

Generación de la proteína de fusión dCas13b-YTHDF^N y su gRNA

Para generar las proteínas de fusión dCas13b-YTHDF1^N y dCas13b-YTHDF2^N se procedió a amplificar mediante PCR el fragmento del gen correspondiente a dPspCas13b (de *Prevotella* sp.) utilizando como molde al plásmido Cmv d0 dPspCas13b-GGS-NYTHDF1 (Rauch et al., 2018) que se muestra en la [Figura 9](#). Para este PCR se utilizaron los oligonucleótidos de la [Tabla 7](#) (de Anexos), que se encuentran flaqueados por los sitios attB1 y attB5r, para recombinar estos fragmentos en un vector pDONR 221TM P1-P5r del sistema Gateway; la mezcla de reacción para el PCR es la misma que se utilizó para la amplificación de los plásmidos mutagénicos utilizando la Phusion Flash High-Fidelity, utilizando el siguiente programa térmico: 1 ciclo a 98°C por 30 s; 98°C por 15 s, 60°C 15 s, y 72°C por 1 minuto y 30 segundos, durante 35 ciclos; con un ciclo de extensión final de 72°C por 2 minutos y 30 segundos.

A continuación, se procedió a purificar el amplicón obtenido previamente con ayuda del GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo ScientificTM), siguiendo las especificaciones del fabricante. Posteriormente, se realizó la reacción de recombinación, del attB1 dCas13b attB5r en el vector pDONR 221TM P1-P5r del sistema Gateway, utilizando la enzima BP ClonasaTMII, generando la siguiente mezcla de reacción: 6 µl de attB1 dCas13b attB5r (150 ng), 1 µl pDONR 221TM P1-P5r (150 ng/µl), 1 µl de buffer TE (pH 8.0) y 2 µl de BP ClonasaTMII. Ésta se incubó a 25°C por una hora, para concluir la reacción se agregó 1 µl de proteasa K y se incubó, una vez más, a 37°C por 10 minutos. Con 5 µl de la reacción anterior se procedió a transformar bacterias electrocompetentes línea ccdB *Survival* (Invitrogen), como se describirá más adelante.

attB5^{FW} Ntr^Y THDF1 GGGG ACA ACT TTG TAT ACA AAA GTT
 GCCATGAAGATATCTGTGAAGACTTTGAAGGGGAACACTTTGACCTGGATGTTACCCCTT
 GGAGACGGTTATAAATGTCAAGAAACGAATAGAAGATTCCCAAGGAGAGCAACTATTCCT
 TGTGCACAGCAGCTCTTAATATATCAAGGGAAAGGTTTTAAAGGACGAAACCACTATGGAGG
 ATAACAAGGTCCTGGAAAAATGAGTTTTTTGTTGTATGTTGTCAAAGGCTAAAATCTGGAAC
 GCTGCTTCAACTTCTGCCTGTGAATCTACTCAGGTAGCCGTGACAGCTGTCTCTCCGTACATTA
 CCCGCGCAAACATCTGTAGCCCTGCAACCCTGGTCATCAATGCATCTGCTGGAGTTACTCA
 TGAGGAGGCTGCTTCAAATCTGGTTGCTGGTATCAATTTGGAAAAGCAAGGCGCAGGAAATCT
 TAGACATCGGCGGAGGAAGCTGGGATTTTGATACTGTCTGTTATGCCTTACGTGCGGCTTCC
 AATAATGTGGAGCGTGTCTTAGAGTATTTATCTTCTGGTATTTCCAGAAGCAACCGGGCTGGC
 GCCTCTGCGCCCTGTCTATCACCAGAGATTCCCGCGGAAACCTCAAGCACAGCTCCTACAG
 TACCAACTCAAGCTGCTGTTCTGTGGCCGAGGCGAAGCGCAGCGCTCTAGATCATTTCCTC
 AGGGTATGCCTGCTTTGGATGCAGGTGGTGGTGGTGTATGCAGAAGCCCTGGATTTTTTGAGA
 AGCAATCCACAGGTGCCCTCAAACAAATGACGAAGACTCCTCTGATGCAAGCGGAGATGCCT
 CTGCATCAGTTGAACTGGTGTATGCAGTAGTACAAATGGTGTACACGAGGGGTTTGCCGAA
 GGGGGATCAATGTACTATGTGGGTGGCATGAATGGCTATAGTCTCATGGTTATGTTTACGA
 TTACCTTACCGGATGAACCTTCGGTTGCTGGTGAATGGGACGATTCTCCAGATATG
 TCGTTGATGGAATGGAGGTTCCATCCCCAGGTGTTTACAGTGATAATGGCGGTTCTGTATTCT
 TGCATGCCACTGGCTACGGCTATGCATCAAAATCCCTCTTACAATCCGTACTCTCCGGGGACG
 CCTGTGCCGACTATAGGTGCAGATGGCCAGCTGTATGTACCGCAGGCGTTTCCGTACTTAA
 CCAACTTTATCAACAGCCAGTATCTCCGGCTGCGCCTTATCATATGGGATCACCTTCTACGAT
 TGGAGAAGGAACTGTATCAGGAAATGGTGAACCTTCTCTCCCTGGAGTCGATGGAAAAGATT
 GCAATTTCAACGGCAGTCTTAGACCGGGTTTCCAGCCATGGCACTTATTCCTCCACACGG
 CCGTATCTAGAGGTGTGTTGCCCTTGGCAATTCACAGTCCAGGTTCTCAAGACGTACGAT
 ACGAGGGGCTCAGAGCTGCTGCTCCCTCATGGGTGGATGTGTCAAAAATAGCAGAAGGCCA
 GCAGAGACCAGGAATCCCGACAGGGATGCACCTCAATGGCCTCTCAACAATGGCAGCTCCA
 GGCCTTCTGCACAGCCATTGAGGCCAGTTACCCCGCTC TAC CCA GCT TTC TTG TAC AAA
 GTG GT CCCC **attB2^{RV} Ntr^Y THDF1**

attB5^{FW} Ntr^Y THDF2 GGGG ACA ACT TTG TAT ACA AAA GTT
 GCCATGTATCAGGGCAATGTCTTGAAGGGCGAAACCAATGGAGGAAAAATAAGGCTTTGG
 AGAACGGGTCCTTGTTTTACGTTATCAAAGGGTAAAGCTGGAGCTGGTGTACCCCAACA
 TCTTCCCTGAACCAAAACCAGGGAGTGCCTACTGATGTCTCATCTTCAACACCTGCGCAAA
 ATTTACACCTCTTACCGCATCCGTCGCAATAGTACCTTCCGGAGCTGCACATATACAAGCTGT
 TCCACATCTGTCTGCTGGGAGCACCTCGGAAACTGCGGTGCAGCAAAATTTAGACATCGGTG
 GAGGAAGTTGGGATCGAGACAGTGTCTGCGTGCCTTACGTGCGGCCTCAACAATTTAGAG
 CAAGCTTTGCAATGTTATCTTCTGATATCCAGAGACAACCGAACTTGCCTTCTATGTCC
 CGCACATTAAGAAAAATCTGCTGGAGCTCAAGCATAGCTTCCGCTGTCCAGCTCATGC
 AGTCGTCCCTGTGTCTGGGCGCAACGCGGCTCCGCCAGAACTTTTACCTCAGGTACCTCAA
 CCAATGATGAAGATTCTCTGTATGCCAGTGAAGATGCCTCTGCATCAGTTGGAACCTGGCGAT
 GCAGCGATCAAAATGGAGTACATGATGGGTCTGCTGAAGGAGGATCTATTTACTATCTGGG
 TGGCATGAATGGCTATCTCCACCGGTTATGTCTACGATTATGTTTATGGAGGATTTGAACC
 TTCGTTGCAGGGGAATGGGATGATTACTCGAGATACGTCGTCGACGGAGTAGAGATCCAT
 CCCCAGGTGTTTATAGTGATAATGGATCTGTATATGTGCATGCCACTGGCTACGGCTATGCA
 TCGAATCTTCTTACACTCCATACACTCTGGGGCGCCAGTACCGACCATAGGTGCTGATGG
 TCAGCTGTACGGTCCCGAGCATCCAGTATCCTAGCCACTTGTATCCACAACCAAGTGTCTCC
 AGGTACACAGTACCATGTGGGATCACCTACTGCATAACTGGAGGTGAGAGAGCAACGACA
 GGAATGGCGAGCCTGCTCCTCTGGAGTCGATGGGAAGATTGCGCTTCTAATGGCGGCC
 CAGGCCGGGTTACCCAGCCATGGCACTCATTCTCCACATGGACCGTACGCTAGAGGTGTCT
 TACCTTTGGCAATGCACAATCCAGGTTCCCAAGGATGTACGATATGATGGACTTAGCGTCTGT
 GCACCTCATGGGTGGATGTTTTCCAAAATACCCGAAGGTCTGCAGAGACGAGGAATCCCAA
 CAGGCAATGCACTCTATGGCTTCTCAGCAGTTGTGAGCGCCAGGCCCTTCTGCACAATCATTG
 AGACCAATTAATCCGTTGCAGATACATATCCAATCACCTCAGCAATCGAGAAATCCATCGGG
 ATTGGGACCTTCAATCTTGGTCTGGGGCCCTAGCCAGGGGCTATCCTCTGTTTCCGGAGT
 TGTGAACGGGCACAATGGTCTGTGAGAGCTCGTCAGCTGGGGAATACATTCGTGGACCCCA
 GGCCAAATGGGCGTGGAGGCTGGATTGGCATCGACAAGGGGAAACAGAGATGTCGAGGTG
 GCGGACCTATTGGTAATAGTAACGGTCTCTTGATCCTTTGAACGAGCAAAAACAGAGGACCC
 CGAACTACAGAACCAGGAATCAGCGGGCCATCCAGGTGTTTTAAGACATACCCAGGGGTC
 AAGGTGTGATCTCATCAGGAAACAGC TAC CCA GCT TTC TTG TAC AAA GTG GT
 CCCC **attB2^{RV} Ntr^Y THDF2**

Figura 10. gBlocks de los extremos amino de las proteínas PpaYTHDF1 (1584 nucleótidos correspondientes a 528 aminoácidos) y PpaYTHDF2 (1758 nucleótidos traducidos a 586 aminoácidos). En ambos casos los sitios de recombinación sobre los que actuará la clonasa BP se muestran en amarillo y gris. En azul y rojo se muestra el sentido (FW, delantero; RV, reverso, por sus siglas en inglés) en que serán recombinados ambos fragmentos en el pDONR 221TM P5-P2.

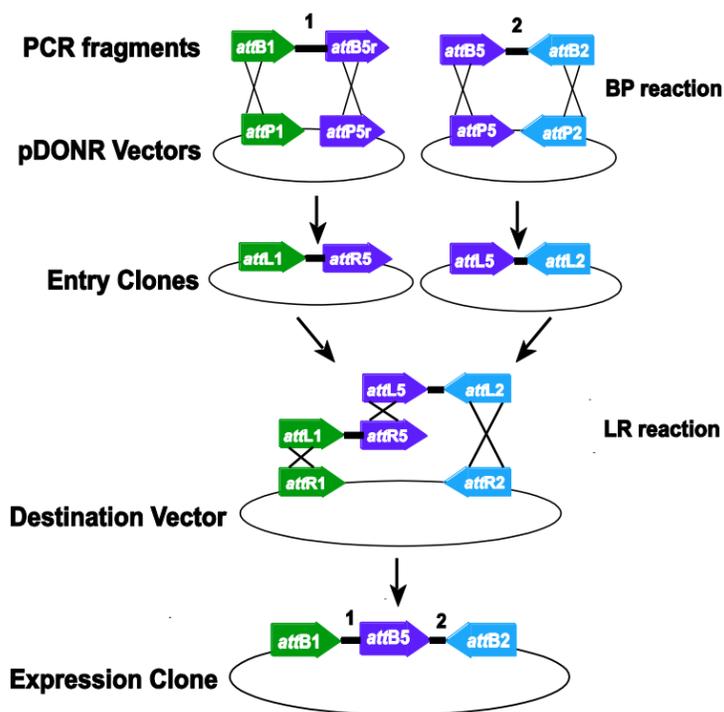


Figura 11. Proceso de recombinación por sistema Gateway para clonar dos fragmentos. Del lado izquierdo se muestra el fragmento 1, que representaría a la dCas13b, flanqueado por las secuencias attB1 y attB5r; del lado derecho el fragmento 2, representando al extremo amino de la YTH en cuestión flanqueado por los sitios attB5 y attB2, los cuales serán recombinados en un vector donador (pDONR); tanto el producto 1 como el 2 serán recombinados en un vector de destino (pDest), en este caso será un vector PTK que cuente con las regiones flanqueantes attR1 y attR2. Tomado de (Invitrogen. Life Technologies, 2015)

Igualmente, el GFP-gRNA que dirigirá a la proteína de fusión también fue sintetizado en un gBlock (Figura 12), al cual se le agregaron dos sitios de corte para la enzima de restricción StuI, el gRNA quedó bajo el control del promotor de U6 snRNA de *P. patens*. En cuanto a los sitios StuI estos fueron agregados para poder ligarlo en el vector pTK-UBI-Gate (Figura 13), que también cuenta con un sitio único de corte para StuI, con las siguientes condiciones de reacción: 4 µl vector pTK-UBI-Gate previamente digerido por StuI (100 ng), 6.6 µl inserto de DNA (8.3 ng), 2 µl de 10X buffer DNA ligasa, 2 µl T4 DNA ligasa (5 U/ µl, Thermo Scientific™ K1231), incubando a 22°C por 90 minutos. A continuación, se realizó una purificación con fenol, seguida de precipitación con etanol como se describió previamente. Después de haber resuspendido en 5 µl de H₂O el producto anterior se procedió a llevar a cabo la transformación de bacterias electrocompetentes de la línea *ccdB Survival* (Invitrogen) con el siguiente método de transformación: se agregaron los 5 µl totales del producto resuspendido a una alícuota de bacterias electrocompetentes previamente atemperada durante 10 minutos en hielo. Luego, se transfirió todo el inóculo a una celda de electroporación, misma que se llevó a cabo en un electroporador MicroPulser (BIO-RAD). Terminada la electroporación se agregaron 250 µl de medio LB y se transfirió todo el líquido a un tubo para microcentrífuga y se procedió a incubar durante una hora a 37°C con una agitación de 500 rpm. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 7000 g, se desechó la mayor parte del sobrenadante, conservando aproximadamente 100 µl del inóculo, mismo que se sembró en una placa con medio LB adicionado con ampicilina (100 µg/mL) seguido de una incubación durante toda la noche a 37°C. De las colonias obtenidas se procedió a aislar 10 de estas y a realizar una PCR de colonia para comprobar de la correcta ligación del gBlock en el vector pTK-UBI-Gate. Además, como otra medida de resguardo, el gBlock fue clonado en un vector pJet (*CloneJET PCR Cloning Kit*. Thermo Scientific™).

```

attB1FgRNACAS13GFP|GGGGACAAGTTTG·TAC·AAA·AAA·GCA·GGC·
TCCAGGCCTGAAGCAGACGTGTTGCGACAGGTTAGCGACGATGGGTGTAGATGTGATGTGATGTGATGGT
GTGTTCTTCCACGGCGGCGTCTTGCGGTGGCGGAGAAGGGGATATCCCGAAGGAGCGGCAGCGGGAG
AGCACAAGCAGAAAGGGTGCAGTGAGTGAGTGGGTCCAGCTGGGTGGCTGGCCGAGTGGACGCGACCGG
GTTTCGAGGGGGCGGGGAGAAAAGGGATGGAGCGAGGGATATAACCCACATGGAATGGAGGTGGGTG
TGAAGGCGGTATATAGGAAGGTGGAGGACTTACAACCATGCCTCGCGTGGTAGAAGAAGTTCCTGCTG
GTTGTGGAAGGTCCAGTTTTGAGGGGCTATTACAACTTTTTTTCCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTAGGC
GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA·ACA·ACT·TTG·TAT·ACA·AAA·GTTT·GT·CCCC·
|attB5RdCas13b|

```

Figura 13. Esquema del gBlock del gRNA para GFP. En gris se muestran sombreados los sitios attB1 y attB5r. En café se muestran los sitios de corte de StuI; en amarillo se representa el promotor de U6 snRNA de *P. patens*, en verde se encuentra sombreado la secuencia de 20 nucleótidos perteneciente al gRNA, a continuación, en azul claro se muestra la secuencia perteneciente al tracrNA y en lila la secuencia terminadora de la RNA Pol III. El tamaño completo del gBlock intacto es de 476 pb.

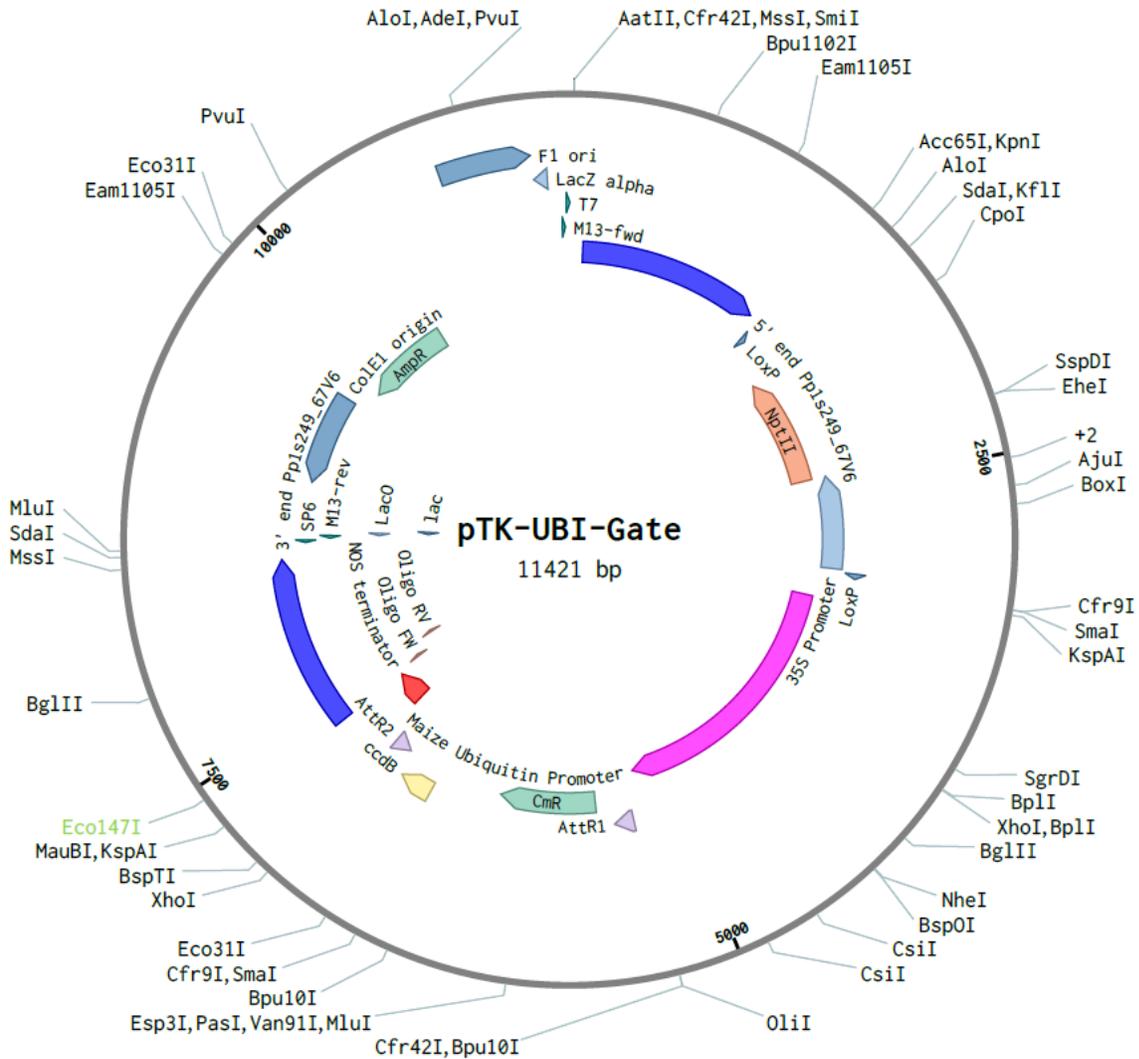


Figura 12. Plásmido pTK-UBI-Gate. En color verde se muestra el sitio de corte de StuI (Eco147I), en dicha muesca debiese ocurrir la ligación del gBlock (gRNA-GFP).

Resultados y Discusión

Determinación de las PpaYTH de *P. patens* como potenciales lectoras

Como primera aproximación, y con miras a demostrar que las proteínas YTH de *P. patens* (PpaYTHDF) son lectoras genuinas, se generaron los modelos de las cuatro PpaYTHs anotadas para el musgo (Figura 14); es importante señalar que para la generación de los modelos no se utilizaron modelos previos de alguna YTH –por ejemplo, alguna ECT de *A. thaliana* o una YTH de *H. sapiens*– almacenada en el PDB con la finalidad de no sesgar el alineamiento y enhebrado contra el mejor molde.

Para comenzar se obtuvieron los modelos de PpaYTHDF1 y PpaYTHDF2 mediante el uso del programa RaptorX, el cual realiza alineamientos contra las secuencias almacenadas en el PDB, a continuación, implementa el enhebramiento contra múltiples moldes –alineamiento aminoácido por aminoácido contra la plantilla– para corregir errores de los alineamientos por parejas explotando las semejanzas con otras secuencias, utilizando un método combinatorio que utiliza características de los predictores por homología y *ab initio* (*de novo*) (Källberg et al., 2012; Peng & Xu, 2011).

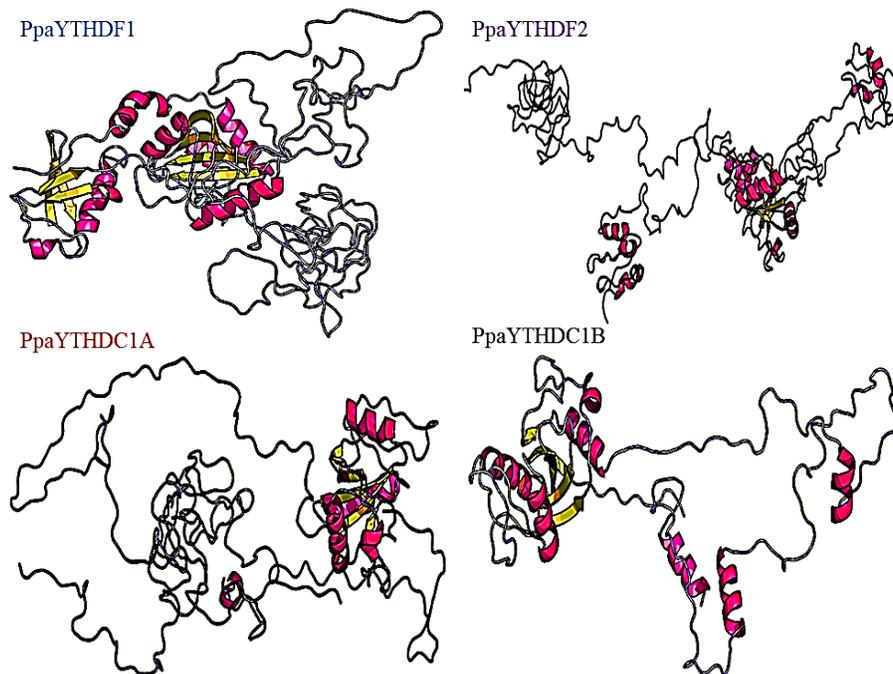


Figura 14. Modelos 3D de las cuatro proteínas PpaYTHs codificadas en el genoma de *P. patens*. Se empleó el programa RaptorX.

Al cotejar la cantidad de dominios predichos por RaptorX contra los anotados en Phytozome, encontramos que ambas plataformas coinciden en tres dominios para esta proteína (Tabla 1 y 8 de Anexos), sin embargo, RaptorX sólo pudo generar los modelos del dominio ubiquitina ligasa y del dominio YTH; por su parte, Phytozome reporta un dominio más, siendo este el UBA relacionado con el reconocimiento de mono y poliubiquitinación en otras proteínas (Figura 15).

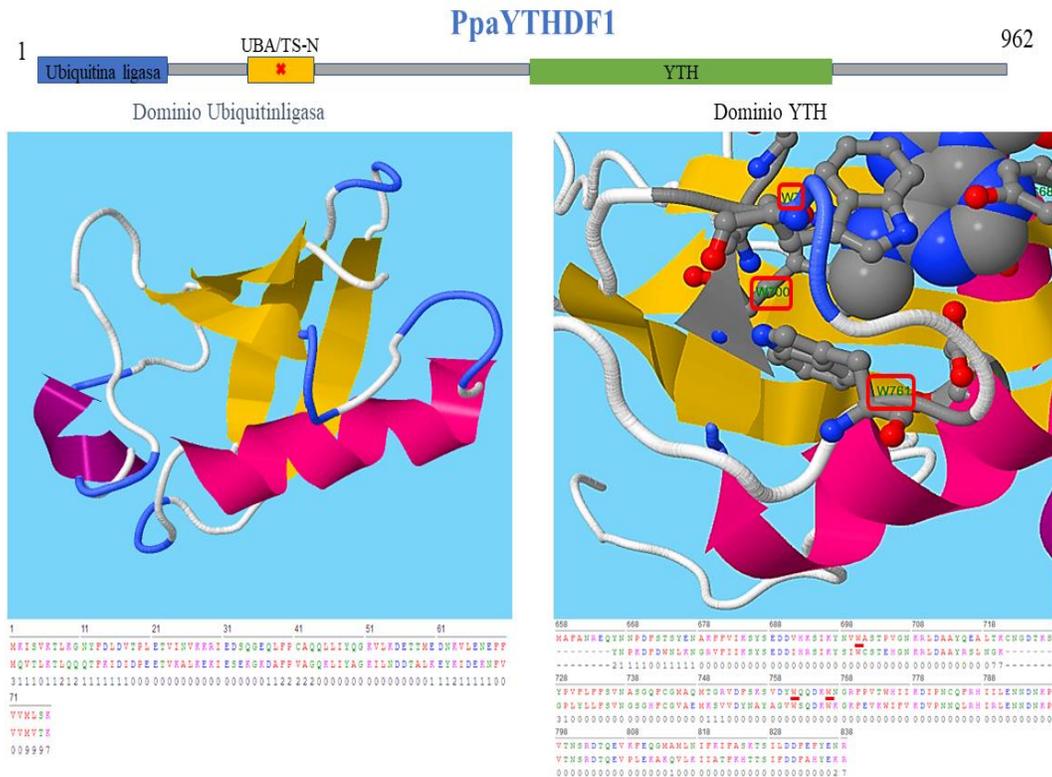


Figura 15. En primer plano se muestra el mapa de la proteína PpaYTHDF1 de *P. patens*, tomado de Phytozome. De izquierda a derecha se observa un dominio ubiquitina ligasa (bloque azul), seguido de un dominio UBA, asociado a ubiquitina (en color anaranjado), finalmente en verde se muestra el dominio YTH. Debajo y del lado izquierdo se muestra el dominio ubiquitina ligasa modelado por RaptorX, y debajo de este el alineamiento de aminoácidos que lo conforman, en la parte superior de este alineamiento se muestra la secuencia perteneciente a la PpaYTHDF1 (En la parte inferior se encuentra la secuencia de YTHDF3 de *H. sapiens*); a la derecha se muestra el dominio YTH y encerrados en cuadros rojos se resaltan los triptófanos (W700, W761 y W766), que conforman la caja aromática encargada de reconocer la marca m6A (modelo de esferas grises y azules) de los mRNAs. RaptorX no fue capaz de generar un modelo para el dominio UBA (En la Tabla 8 de Anexos se muestran las secuencias diana, mismos que fungieron de molde para los modelos de las PpaYTHs).

Por otra parte, mientras Phytozome reconoce sólo 2 dominios anotados (UBA y el YTH) para PpaYTHDF2, RaptorX predice 4 dominios, pero sólo logra modelar y predecir el ligando del dominio YTH (Figura 16). Hasta ahora la presencia del dominio YTH anotado en Phytozome y modelado por RaptorX nos sugiere que las YTHDF de *P. patens* (PpaYTHDF) son lectoras

Tomando en cuenta lo anterior, propongo un modelo en el cual las PpaYTHDF reconocen la marca m⁶A en el 3'UTR de los mRNAs blanco, a continuación, el dominio UBA alojado en el extremo amino recluta a CCR4-NOT, conservado en *P. patens*, vía el dominio SH –el cual debe ubiquitinarse, para ser reconocido por el UBA– y así iniciar la desadenilación de los mRNAs blanco, desencadenando el decaimiento de estos (Figura 17).

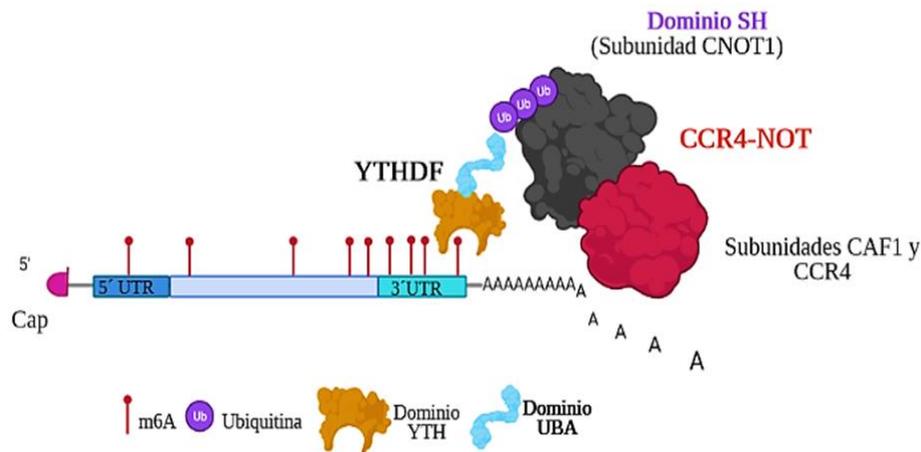


Figura 17. Modelo de acción propuesto. En primer lugar, se espera que las PpaYTHDF reconozcan la marca m⁶A en el extremo 3' UTR, a continuación, el dominio UBA de la PpaYTHDF recluta a CCR4-NOT por medio del dominio SH ubiquitinado permitiendo la desadenilación del mRNA y desencadenando la subsecuente degradación de este.

Por su parte, las proteínas PpaYTHDC1A y PpaYTHDC1B de *P. patens* (PpaYTHDC), también cuentan con el dominio YTH, este se encuentra anotado en Phytozome, mientras RaptorX logra generar un modelo de este y simular su interacción con la adenosina metilada, su ligando (Figuras 18 y 19). Sin embargo, es importante señalar que a diferencia de Phytozome, RaptorX predice tres dominios, pero sólo ligandos para dos de ellos, en ambas PpaYTHDC. El segundo dominio predicho para PpaYTHDC1A se trata de un dominio de dedos de Zinc tres veces repetido (Hunt, 2014), esta proteína es homóloga a la isoforma CPSF30-L de *A. thaliana* asociada con el evento de floración y la formación de cuerpos nucleares (Song et al., 2021), organelos sin membrana compuestos por proteínas y, en algunas ocasiones, por moléculas de RNA, involucrados en múltiples tareas celulares (Staněk & Fox, 2017).

En cuanto al tercer dominio, el modelador no logra encontrar una plantilla y un ligando adecuado para este, por lo cual sólo se asume su presencia, pero se desconoce la función. Aunque existe la posibilidad de que el fragmento donde se localiza este dominio se encuentre

A diferencia de la predicción de desorden obtenida con RaptorX, la cual únicamente se basa en la predicción probabilística realizada por DISOPRED, MobiDB (<https://mobidb.bio.unipd.it>), además de realizar una predicción probabilística y de homología, cuenta con la información experimental de resonancia magnética nuclear y difracción de rayos X, lo cual la convierte en una fuente más acertada para determinar el porcentaje de desorden de las PpaYTH. A continuación, en la [Figura 20](#) se muestran los resultados consenso obtenidos con MobiDB, es importante señalar que este resultado compendia la información experimental y probabilística anteriormente mencionada; una clara diferencia entre ambas plataformas es que RaptorX predice un porcentaje más alto de desorden (PpaYTHDF1 57%, PpaYTHDF2: 43%, PpaYTHDC1A: 52% y PpaYTHDC1B: 43%), mientras MobiDB muestra un resultado más discreto: PpaYTHDF1: 28.82%, PpaYTHDF2: 16.63%, PpaYTHDC1A: 38% y PpaYTHDC1B: 23%. Así también, de forma paralela MobiDB puede determinar las proteínas interactoras, sin embargo, para las proteínas PpaYTH no logra encontrar interactores, esto claramente representa un área de estudio por explorar que deberá ser estudiada, para elucidar los mecanismos efectores de estas proteínas sobre el metabolismo de los mRNAs de *P. patens*.

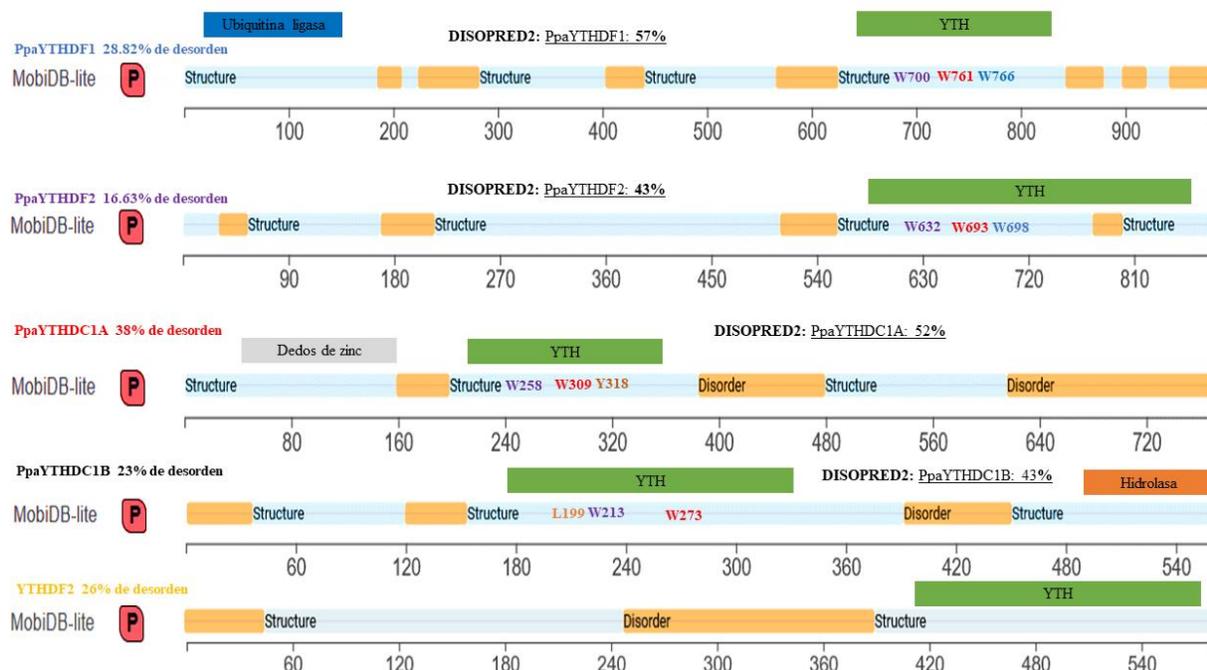


Figura 20. Predicción consenso de desorden obtenido con MobiDB. La barra en azul claro representa cada una de las proteínas PpaYTH, mientras que cada una de las barras amarillas son la representación de las regiones intrínsecamente desordenadas. El nombre de cada una de las proteínas se encuentra a la izquierda en la parte superior en cada una de las proteínas representadas, y a la izquierda el porcentaje de desorden de cada una de ellas. La localización del dominio YTH en cada una de las PpaYTH, según RaptorX, es el siguiente, PpaYTHDF1: 658-838 aa, PpaYTHDF2: 589- 784 aa; PpaYTHDC1A: 217-374 aa y PpaYTHDC1B: 189-327. En colores se muestran los Triptófanos, Tirosina y Leucina que conforman la caja aromática del YTH en cada una de las proteínas. También se muestra el resultado de desorden predicho por RaptorX (DISOPRED2). Al final de la figura también se muestra el modelo para las regiones desordenadas de la proteína YTHDF2 de humano, es importante señalar que estas regiones permiten la separación líquido-líquido en el contexto celular.

Expresión diferencial de los genes *PpaYth* bajo diferentes tratamientos y en diferentes estadios de desarrollo del musgo

Como segunda aproximación, partiendo de los datos de expresión diferencial, obtenidos de siete artículos distintos en los que se sometió a *P. patens* a diferentes tratamientos, se realizó la búsqueda de la expresión de los genes *PpaYthdf* y *PpaYthdc*, es necesario aclarar que esta búsqueda obedece al deseo de encontrar bajo qué condiciones estos pudieran ser expresados diferencialmente por la planta, dividiendo los trabajos en: condiciones de estrés y cambios de estilo de vida, como describiré a continuación. Es importante señalar que en la [Tabla 3](#) (ver Anexos) se condensó la información de toda la literatura, referente a transcriptomas en *P. patens*, que fue revisada buscando la expresión de estos genes.

Para comenzar, el trabajo de Arif et al., 2019 utilizó protonema de cuatro días que fue tratado con ABA (10 μ M), y realizan un análisis transcriptómico en 3 diferentes tiempos de

tratamiento (30, 60 y 180 min). Al realizar la búsqueda de los genes *PpaYth* en la tabla total de genes expresados ninguno de los *PpaYth* fue detectado, y por ende tampoco se les encuentra entre los genes expresados diferencialmente (GED). Mientras en el trabajo de Beike et al., 2015 estudian el estrés por frío durante 4 diferentes tiempos (1, 3, 8, 24 h), estudiando la respuesta transcripcional por microarreglos; los genes *PpaYth* aparecen expresados en el control y en los diferentes tiempos del tratamiento, con la excepción de *PpaYthdc1b* del cual no se cuenta con el alias del número de acceso para realizar su búsqueda en las tablas de datos, sin embargo cuando se realiza el cribado para los genes expresados diferencialmente (media normalizada, análisis de grupos K con ANOVA, *false discovery rate* y un *P value* de <0.05), estos resultan no estar acumulados diferencialmente.

Como suerte de corolario, el trabajo de Khraiweh et al., 2015, analiza el transcriptoma de la planta sometida a ABA (10 μ M), frío, sequía y estrés osmótico; en este ensayo encuentran 20,000 genes acumulados, pero sólo 9668 tienen expresión diferencial en respuesta a estrés, en esta ocasión, en los datos de expresión únicamente aparecen *PpaYthdf1* y *PpaYthdc1b*, aunque al igual que en el trabajo de Beike et al., 2015, estos no aparecen entre los GED y son descartados después del cribado ($RPKM \geq 10$ y *P value* <0.05). También confrontan los tratamientos entre sí, buscando proponer una respuesta más holística por parte de la planta al ser sometida a diferentes tipos de estrés, razón por la cual, conjuntan en una misma tabla los genes expresados diferencialmente en los cuatro tratamientos, y aun así ninguno de los *PpaYth* figura en la respuesta tanto individual como conjunta. Lo cual pareciera indicar que, al menos bajo estrés, y en las condiciones analizadas por estos trabajos, los *PpaYth* tan sólo presentan una expresión como genes constitutivos.

Para continuar, se revisó la literatura referente a los cambios de desarrollo que experimenta la planta a lo largo de su vida. El primero de ellos es la investigación de Zhao et al., 2018, quienes demuestran que la diferenciación de cloronema a caulonema (cambio de vida de 1 a 2D), ocurre por una acumulación significativa de auxinas en la planta. El estudio lo llevan a cabo en una mutante de ABI3 (Δ ABI3), la cual tiene una acumulación exacerbada de auxinas y, en consecuencia, una diferenciación más acelerada del caulonema con respecto al cloronema, en comparación con la planta silvestre. Para el análisis transcriptómico se utilizó protonema de 7 días tratado con 10 μ M de ABA a un tiempo 0, 2 y 4 horas. Los *PpaYth* no son detectados en el

ejemplar silvestre ni en Δ ABI3; una diferencia importante es que este trabajo no reporta los datos totales, es decir, aquellos previos al análisis de expresión diferencial, tal como ocurre con el trabajo de Arif et al., 2019, por lo cual no es posible corroborar si existe al menos la expresión basal de estos genes tal como en los trabajos de Beike et al., 2015 y Khraiwesh et al., 2015.

Por su parte, Xiao et al., 2011, enfocan su trabajo al análisis del desarrollo de protonema de 3, 14, 24 días, al igual que cloronema y caulonema de 14 días, el cual fue separado a apartir de protonema mediante disección láser, así como al protonema con gametóforos de 30 días de cultivo después de la regeneración de protoplastos. Es sumamente importante señalar que en este trabajo, los estadios estudiados abarcan los cambios de 1 a 2D (cloronema a caulonema) y de 2 a 3D (caulonema a gametóforo), aunque entre los genes expresados diferencialmente reportados no aparecen representados los genes *PpaYth*. Aunque los datos crudos están disponibles, estos se encuentran en un formato que nunca he trabajado y los cuales habría que procesar y analizar por completo; puesto que esto me llevaría mucho tiempo para aprender las herramientas bioinformáticas apropiadas, sólo realicé la búsqueda en las tablas de genes expresados diferencialmente.

Frank & Scanlon, 2015, estudiaron la respuesta transcripcional de *P. patens* durante el cambio de vida de 2D a 3D, es decir la generación de brotes en el protonema, mismos que darán paso al desarrollo de los gametóforos, sin embargo es importante señalar que en este trabajo se induce la generación de brotes exponiendo a las plantas de 10 días a medio de cultivo adicionado con Ácido 1-naftalenacético (perteneciente a la familia de las auxinas), por 5 días, y finalmente se realiza un pase de 24 horas a medio BCD suplementado con cinetina.

Las condiciones anteriores resultaron en la expresión diferencial de más de 4000 genes entre la etapa de vida uniplanar (protonema) y la etapa de vida multiplanar (células del brote); cabe resaltar que el transcriptoma de brote, en comparación con los datos de protonema, muestra una mayor abundancia y variedad de genes, entre los que se destacan las subunidades *WTAP* y *METTL14B* de la maquinaria de metilación y, cascada abajo, los genes *PpaYthdf1* y *PpaYthdf2*; dichos genes se encuentran sobreexpresados en las células de brotes con respecto a las de protonema, en cuanto a los genes *Ppaythdc* el cambio en su acumulación resulta no ser significativo entre ambas muestras.

A pesar de ser el único trabajo en que se encuentra una acumulación diferencial de los genes *PpaYth*, un punto a considerar en el trabajo de Frank & Scanlon, 2015 es el tratamiento con las dos diferentes hormonas al que se somete a la planta de manera secuencial, puesto que es imposible determinar si la respuesta observada es generada por las cinetinas o la respuesta aditiva a ambas hormonas. La acumulación (en solitario) de auxinas como promotora de la expresión de los *PpaYth* se puede descartar, puesto que el trabajo realizado por M. Zhao et al., 2018, discutido más arriba, también involucra una acumulación en la concentración de auxinas para que ocurra el cambio de vida de 1D a 2D, pero los genes *PpaYth* no se hacen presentes, ni siquiera en la mutante $\Delta abi3$ donde las altas concentraciones de auxinas se mantienen estables durante todo el desarrollo de la planta. Esto me lleva a proponer que la acumulación exacerbada encontrada por Frank & Scanlon, 2015 ligada al cambio de vida de 2 a 3D, podría deberse a la exposición combinatoria de auxinas y cinetinas a altas concentraciones a las que se ve sometida la planta, mismas que de manera natural no ocurren, o al menos no de la misma forma. Será importante comprobar esta hipótesis al evaluar la expresión de los genes *PpaYth* ante la adición de dichas hormonas al medio. Ejemplo de esta propuesta es la presentada por Moody et al., 2020, quienes plantean un modelo en el cual la transición de 2D a 3D en *P. patens*, donde debieran acumularse estas proteínas (Frank & Scanlon, 2015), está supeditada por una compleja comunicación entre auxinas y cinetinas, y es parcialmente regulada a su vez por flavonoides.

A continuación, Hiss et al., 2014 analizaron el perfil de la expresión génica a escala genómica de *P. patens*, por medio de microarreglos. Estos datos están disponibles en línea GENEVESTIGATOR (<https://geneinvestigator.com/>), así como en la plataforma de libre acceso PEATmoss (Fernandez-Pozo et al., 2019). De su análisis, sólo puedo mencionar que la expresión de los *PpaYthdc* es mayor y más uniforme que los *PpaYthdf* a lo largo de todo el desarrollo del musgo (Figura 26 de Anexos).

Finalmente, Xiao et al., 2012 realizan la reprogramación celular de protoplastos de *P. patens* a células troncales, en esta investigación se repite la nula acumulación basal o diferencial de los genes *PpaYth*, incluso durante procesos de cambio tan dinámicos como lo supone la reprogramación celular. Estos resultados contrastan con lo que se ha observado en vertebrados, tales como *Danio rerio*, donde las proteínas codificadas por estos genes se ven involucradas en el proceso de transición cigótica materna (B. S. Zhao et al., 2017), así como en la regulación del

transcriptoma materno implicado en la adquisición de competencia por parte del ovocito maduro de ratón y nuevamente durante el desarrollo temprano del cigoto (Ivanova et al., 2017), ambos procesos dinámicos e involucrados en el desarrollo de los nuevos individuos. En estos ejemplos se observó que la actividad efectora de degradación por parte de YTHDF2 es necesaria y suficiente para llevar a cabo dichos cambios.

Después, como tercera aproximación se determinó la acumulación absoluta de los transcritos correspondientes a los genes *PpaYth* (*PpaYthdf1*, *PpaYthdf2*, *PpaYthdc1a*, *PpaYthdc1b*) y *Ade PRT*, como gen control, en sus diferentes estructuras a lo largo del desarrollo del musgo empleando los datos de microarreglos almacenados en la base de datos del eFP Browser (http://bar.utoronto.ca/efp_physcomitrella/cgi-bin/efpWeb.cgi) disponibles públicamente (Ortiz-Ramírez et al., 2016; Winter et al., 2007). Winter et al., 2007 desarrollaron la herramienta eFP Browser (*electronic Fluorescent Pictograph*), la cual ilustra sets de datos a larga escala, provenientes de múltiples experimentos, en representaciones gráficas asequibles al usuario. Mientras que el trabajo de Ortiz-Ramírez et al., 2016 reporta la generación de un atlas transcriptómico cubriendo la mayor parte de los estadios en el ciclo de vida de *P. patens*, incluyendo el proceso de desarrollo del esporofito.

Como se muestra en el atlas de acumulación de la [Figura 21](#), el transcrito de *PpaYthdc1a* ([Tabla 2](#) de Anexos) se acumula de forma más uniforme en las diferentes estructuras del musgo, es decir, tiende a comportarse como un gen constitutivo tal como ocurre con *Ade PRT* (*adenine phosphoribosyl-transferase*), esto podría explicarse dado que *PpaYthdc1a* además de tener el dominio lector de la marca m⁶A, también cuenta con un dominio de dedos de zinc asociado a la maquinaria de poliadenilación del mRNA (CPSF30-L), tal como se muestra en la [Figura 17](#), por lo que propongo que esta proteína, en *P. patens*, se encarga de reconocer la marca m⁶A hacia el extremo 3'UTR y propicia la adición de la cola poli A, tal como acaece en *A. thaliana* (Song et al., 2021). Por otro lado, *PpaYthdc1b* sí muestra una acumulación diferencial a lo largo del desarrollo del musgo (espora, arquegonio y esporofito primario), esta acumulación es muy similar a la presentada por *PpaYthdf1*; diferenciándose únicamente por la mayor acumulación de *PpaYthdf1* en las etapas de esporofito secundario y esporofito terciario, regresando a una acumulación similar al llegar al estadio de esporofito maduro. Un hecho interesante es que mientras *Ythdc1a* disminuye su acumulación en el arquegonio y el esporofito primario,

PpaYthdc1b aumenta en esas dos estructuras e iguala su acumulación en el esporofito secundario, en las demás estructuras presenta una expresión menor a *PpaYthdc1a*.

Finalmente, podemos observar la expresión del gen *PpaYthdf2*; de los cuatro genes *PpaYth* este es el que se encuentra acumulado en menor medida durante las etapas de desarrollo del musgo, presentando su mayor acumulación durante la formación del esporofito primario y la menor durante los estadios de cloronema y gametóforo. Llegados a este punto sería bueno recordar que en humanos YTHDF2 es la proteína con la función principal promoviendo la degradación de los mensajeros (Zaccara & Jaffrey, 2020), por encima de YTHDF1 y YTHDF3 (Lasman et al., 2020). Si bien el atlas muestra varias de la estructuras del musgo no se cuenta con los datos de las células del brote, mismos que sí aparecen en el trabajo de Frank & Scanlon, 2015.

Apegándonos al nuevo modelo de actividad de las proteínas YTHDF (ver Figura 4), se esperaría que la función de estas proteínas en *P. patens* sea la misma, es decir, dirigir la degradación de mensajeros blanco. ¿Cuáles serían estos?, tomando en consideración el atlas de acumulación (Figura 21) y el transcriptoma de Frank & Scanlon, 2015, podría esperarse que se trate de mRNAs involucrados en los procesos de desarrollo sexual (maduración del arqueogonio y la espora, puesto que no se cuenta con la respuesta génica de los anteridios); así como también durante el cambio de vida de 2D a 3D, siempre y cuando ocurra una alta exposición a las hormonas auxinas y cinetinas.

Estos resultados generales nos brindan así la pauta para llevar a cabo el estudio de la acumulación de los transcritos de estos genes en distintas etapas de desarrollo por medio de RT-qPCR, utilizando los oligonucleótidos de la Tabla 4 (de Anexos), para comprobar los datos anteriores. En el presente trabajo de investigación se definieron las secuencias de oligonucleótidos a utilizar. Sin embargo, por las condiciones de limitación del trabajo en el laboratorio impuesta por la UNAM, fue imposible realizar estos estudios en las muestras que obtuvimos a partir de protonema (7 y 14 días), brotes y gametofitos de plantas silvestres del ecotipo Grandsden. Como perspectiva inmediata queda pendiente realizar estos ensayos.

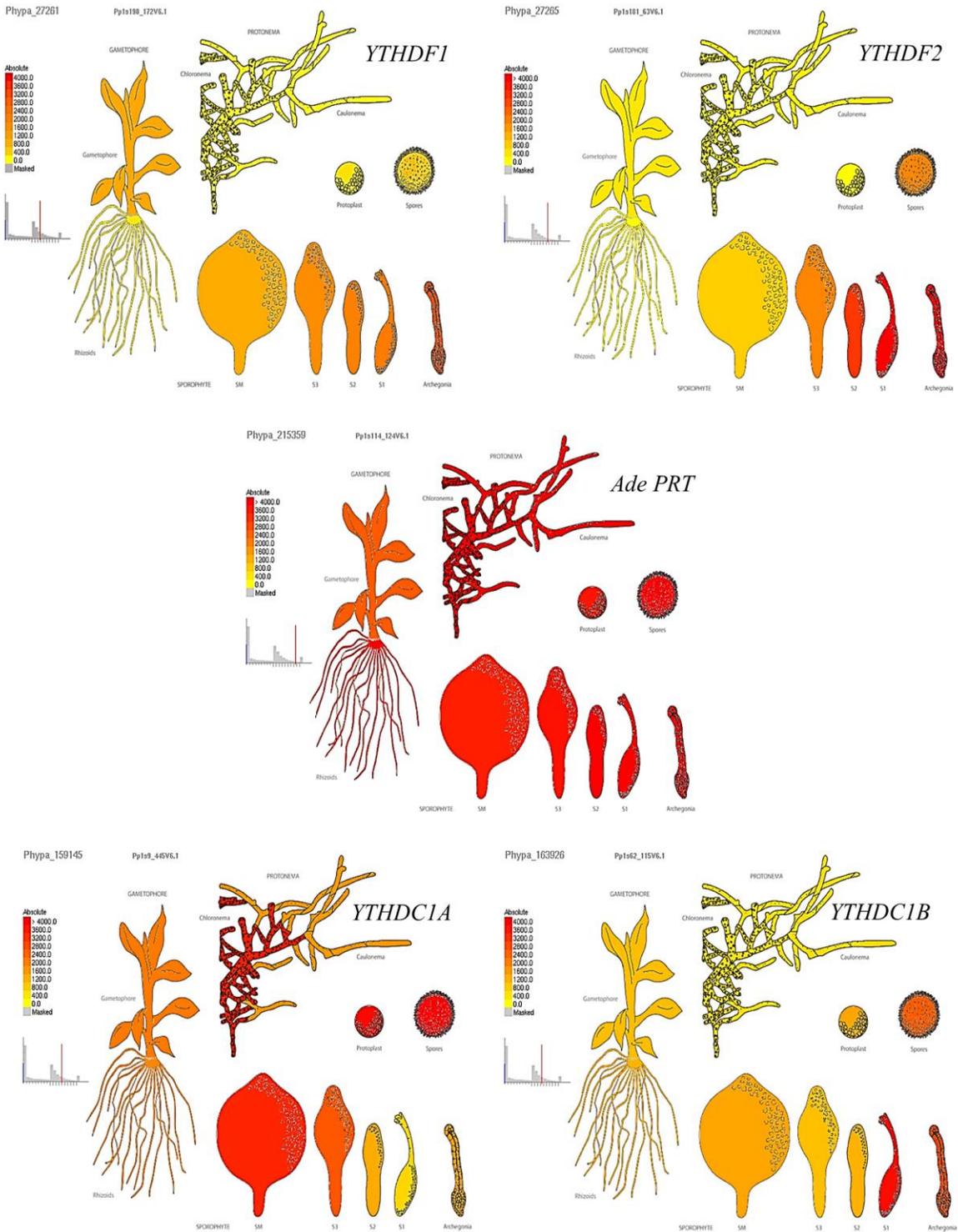


Figura 21. Patrón de acumulación de los diferentes genes *PpaYths* en diferentes estructuras de *Physcomitrella* (Winter *et al.*, 2007; Ortiz-Ramírez *et al.*, 2016). El umbral fue fijado en un recorrido de 0 a 400 (color gris a rojo intenso, respectivamente). En el centro se muestra *Ade PRT* (adenine phosphoribosyl-transferase), como el gen constitutivo utilizado para comparar contra la acumulación los diferentes *PpaYths*.

Efecto de eliminar los genes *PpaYthdf* de interés durante el desarrollo de *P. patens*

La generación de las mutantes para los genes *PpaYthdf* se realizó mediante el método de CRISPR-Cas9 (ver métodos, (Lopez-Obando et al., 2016)). En breve, se diseñaron gRNAs (Figura 6) dirigidos a los genes de *PpaYthdf1* y *PpaYthdf2*, DF1(1), DF1(2) y DF2(1), respectivamente. Estos se incorporaron en el plásmido pEnt-gRNA-PpMETTL14-2 (Figura 5), que contiene la secuencia que codifica para el gRNA bajo el control del promotor de U6 snRNA de *P. patens*. Dicho plásmido al igual que el plásmido pAct-CAS9 (Figura 7), fueron utilizados para transformar protoplastos de *P. patens*, para la generación de las mutantes sencillas del gen *PpaYthdf1* se utilizaron los dos plásmidos mutagénicos DF1(1), DF1(2); para la mutante doble se utilizaron los plásmidos anteriores más el DF2(1) (Figura 25, ver Anexos); mientras que para la obtención de la mutante sencilla *PpaYthdf2* se utilizó únicamente el plásmido DF2(1). Del proceso de transformación se obtuvieron 10, 15 y 3 candidatas a mutantes para el gen *PpaYthdf1*, *PpaYthdf2* y doble mutante para estos genes, respectivamente. Debido a la cancelación de actividades en todos los niveles de la Universidad, producto de la contingencia sanitaria actual, las 28 candidatas a mutantes fueron almacenadas a 4°C para tratar de asegurar su supervivencia, y de esta forma retomar los ensayos de genotipificación y fenotipificación tan pronto se reiniciaran actividades dentro del Instituto. Durante este período de tiempo, aproximadamente 3 meses, todas las candidatas a mutantes *PpaYthdf1* murieron, y el mismo problema ocurrió para 2 de las candidatas a mutantes dobles; el pase de dichas plantas a un medio de cultivo nuevo no pudo rescatar a dichos ejemplares. Por otro lado, las 15 candidatas a mutantes en el gen *PpaYthdf2* lograron sobrevivir al pase a medio nuevo, pero, por razones que desconozco, el medio de cultivo se contaminó en múltiples ocasiones con hongos y en otros casos con bacterias. Por esta razón, el número de final de candidatas se redujo a sólo 6 de ellas. Es decir, quedando un total de 6 y 1 candidatas a mutantes en el gen *PpaYthdf2* y doble mutante, respectivamente.

De estas 7 candidatas se realizó la genotipificación para el gen *PpaYthdf2* mediante una PCR, utilizando los iniciadores OCDM 2.1 de la Tabla 6 (Anexos), el amplicón obtenido fue purificado a partir del gel de agarosa utilizado para la electroforesis y enviado a secuenciar. El resultado indicó la obtención de una mutante sencilla para *PpaYthdf2* (*Ppaythdf2-C*). Se encontró que el corte de Cas9 ocasionó que alguno de los sistemas de reparación del DNA eliminase 10 pares de bases de dicho gen corriente debajo de la secuencia PAM, ocasionando un corrimiento

en el marco de lectura abierto, finalizando con la aparición de cuatro codones de paro prematuro de forma consecutiva dentro del transcrito *PpaYthdf2* (Figura 22).

En cuanto a la candidata a mutante doble, el resultado de secuenciación demostró la falta de mutación alguna en el gen *PapaYthdf2*, descartándose así, como mutante doble. Entonces se procedió a la genotipificación de los dos sitios de corte posibles en el gen *PpaYthdf1* para los que fueron diseñados los gRNAs DF1(1) y DF1(2). Se realizó el PCR con los iniciadores OCDM 1.1 y 1.2 Tabla 6 (Anexos), obteniendo los dos amplicones correspondientes, a continuación, dichos productos se enviaron a la Unidad de Secuenciación del IBt, el resultado reveló la ausencia de mutaciones en dichas regiones por lo que se descartó dicha planta como posible mutante.

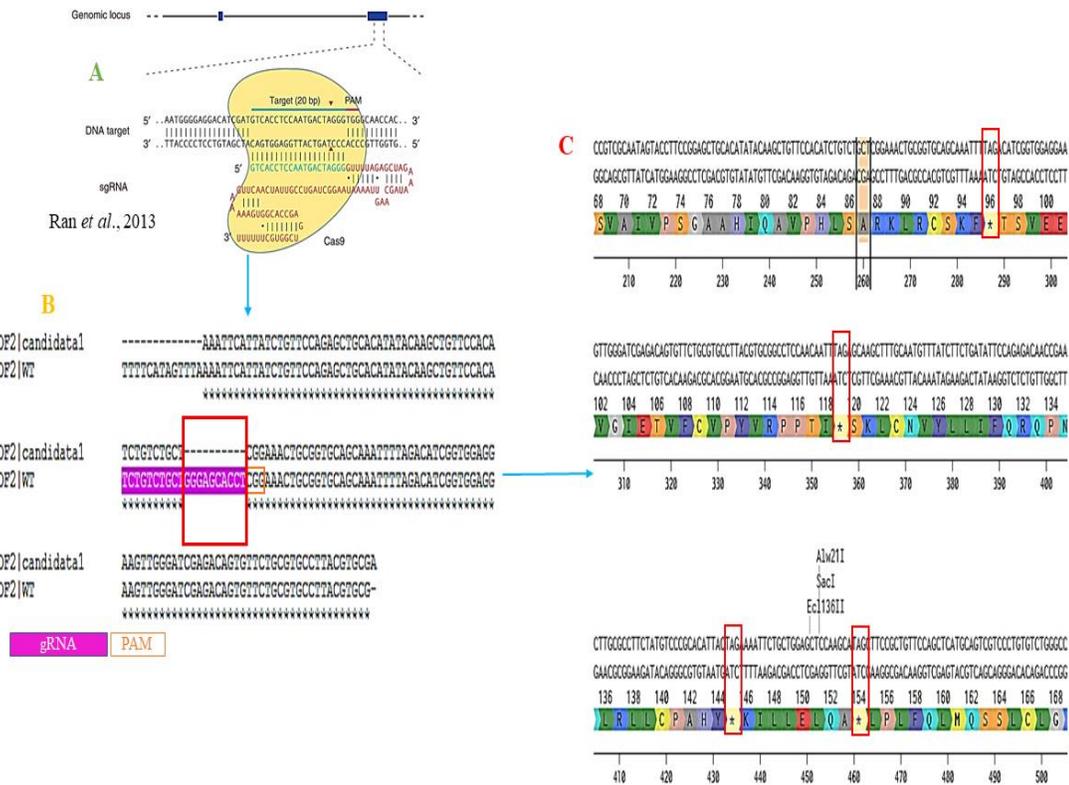


Figura 22. Genotipificación de la mutante *PpaYthdf2*. En el panel A (tomado de Ran et al., 2013), se representa el reconocimiento y el corte generado por la Cas9 dirigida por un gRNA al gen blanco. Luego, los sistemas de reparación del DNA se encargan de arreglar el corte ocasionado; el panel B muestra el resultado del proceso de reparación llevado a cabo, una delección de 10 pb en el gen *PpaYthdf2* (misma que se muestra encerrada en el recuadro rojo, la secuencia resaltada en morado muestra al gRNA utilizado para dirigir a Cas9 y el CGG encerrado en un recuadro rojo a la secuencia PAM). Dicha delección ocasionó un corrimiento en el marco de lectura, mismo que inicia en el codón encerrado en negro y sombreado en anaranjado, representado en el panel C; desencadenando la aparición de múltiples codones de paro corriente abajo (encerrados en las cajitas rojas y representados por *).

Dadas las vicisitudes ocasionadas por la contingencia sanitaria actual, del reservorio inicial de candidatas a mutantes para los genes *PpaYthdf1* y *PpaYthdf2*, los ejemplares que lograron ser genotipificados fueron escasos, y al bajo número de candidatas se suma la poca eficiencia obtenida mediante la técnica de CRISPR-Cas9 para generar mutaciones en el genoma del musgo tal como ocurre con el trabajo de Collonnier et al., 2017, donde la eficiencia para obtener plantas *knockout* es baja, oscilando entre un 2.2-3.2%. A diferencia del presente trabajo, dicho grupo de investigación sólo generó mutantes por selección estable, es decir, el material genético exógeno se recombinó en el DNA de la planta, por mi parte, generé mutantes mediante selección transitoria, sin embargo, según lo obtenido por Lopez-Obando et al., 2016, la eficiencia de edición de la selección transitoria debiese ser del 100%, es decir, se esperarían 6 mutantes para el gen *PpaYthdf1* y una mutante doble (*PpaYthdf1/PpaYthdf2*).

Teniendo los resultados anteriores, hemos discutido la posibilidad de probar la técnica de reemplazo específico de gen (técnica clásica de transformación en *P. patens*), que en síntesis, involucra la inserción de un cassette con un marcador de selección, flanqueado por dos regiones homólogas al gen de interés con el fin de integrar el fragmento completo, generando así una disrupción en el gen original; podría ser una técnica a considerarse, pero de acuerdo con Lopez-Obando et al., 2016 y con Collonnier et al., 2017, la eficiencia de esta técnica frente a CRISPR-Cas9 es más baja y poco recomendada en la actualidad por la posible integración en sitios no-homólogos, aunque sigue siendo interesante comparar la eficiencia de ambas técnicas en la generación de mutantes para los genes *PpaYthdf*.

Como último acercamiento en este objetivo, se procedió a transformar protoplastos de plantas silvestres y de la mutante *Ppaythdf2-C*, utilizando en ambos casos sólo los gRNAs DF1(1), DF1(2), con el objetivo de obtener la mutante sencilla para *PpaYthdf1* y la mutante doble *PpaYthdf1/2*, correspondientemente. Los resultados obtenidos de este proceso de transformación fueron los siguientes: 12 plantas candidatas a mutante sencilla *Ppaythdf1* y 11 a doble mutante, y a partir de estos ejemplares se determinaron las posibles mutaciones obtenidas en el gen *PpaYthdf1* en ambos fondos genéticos.

De los 11 ejemplares candidatos a doble mutante, uno de ellos resulto serlo, en este caso, y de acuerdo con el resultado de secuenciación para el amplicón correspondiente al segundo sitio de corte en el gen *PpayYthdf1* (Figura 7), ocurrió una inserción de 5 pares de bases en la región correspondiente al gRNA, ocasionando de esta forma un corrimiento en el marco de lectura y en consecuencia la aparición de múltiples codones de paro prematuro (ver Figura 27 de Anexos). Desafortunadamente, dicha línea mutante sufrió contaminación por hongo, en un intento de recuperarla se le trató con fungicida, sin embargo, el hongo prevaleció y no fue posible recuperarla.

Por otra parte, de las 12 candidatas a mutante sencilla para *PpaYthdf1*, se extrajo DNA de todas estas y se realizaron los PCRs correspondientes para determinar la mutación en ambos sitios de corte, sin embargo, sólo fue posible obtener un amplicón correspondiente al primer sitio de corte de estos 12 ejemplares; de éstos, ninguno presentó un cambio aparente en el tamaño con respecto al producto de la planta silvestre; empero, y ya que a simple vista, dos de estas candidatas (1 y 4) presentan un retraso en la aparición de gametóforos, se envió a la Unidad de secuenciación los amplicones de ambos ejemplares. El resultado mostró la transición de una adenina por una timina (A→T) en la candidata 4, la cual no genera un cambio en el marco de lectura del gen *PpaYthdf1*. De esta forma se repitió la PCR para evaluar la región del segundo sitio de corte. Como resultado se obtuvo sólo la amplificación del control positivo, cargado con DNA de una planta silvestre, no así con las muestras de ambas candidatas, a partir de esto se hipotetiza que pudo haber ocurrido una deleción mayor a las ~250 pares de bases en que se encuentran ambos oligonucleótidos diseñados para determinar dicha mutación. Dados los resultados obtenidos, y con miras a concluir este proyecto en tiempo se ha decidido guardar las muestras de material vegetal para plantear la generación de nuevos oligonucleótidos aún más alejados del sitio reconocido por el gRNA DF1(2), para asegurar la correcta caracterización de este sitio blanco.

Diseñar y obtener construcciones genéticas para estudiar la función del extremo amino de las proteínas PpaYTHDF en el metabolismo de los mRNAs

Las proteínas lectoras YTHDF se han caracterizado por contener dos regiones principales. En el extremo carboxilo encontramos al dominio YTH que tiene como función reconocer la marca m⁶A en los transcritos. Por otra parte, la región amino es empleada para señalar el destino del transcrito blanco, aumentando su traducción o promoviendo su degradación, de acuerdo con los modelos clásico o actual, respectivamente (Zaccara & Jaffrey, 2020; Zaccara et al., 2019). Adicionalmente, se ha demostrado la presencia de dominios funcionales, además del YTH, reconocidos en el extremo amino, como se mostró en el objetivo 1 (Figuras 15 a 17), tales como el UBA (Asociado a Ubiquitina). Dados los dos paradigmas anteriores y la nula evidencia de la función del extremo amino en *P. patens*, resulta muy importante estudiar esta región de las proteínas PpaYTH, por lo cual en este proyecto de investigación se propuso el diseño de un sistema para analizar la interacción particular del dominio amino de ambas proteínas PpaYTHDF (PpaYTHDF1 y PpaYTHDF2), con un mRNA definido independientemente de la presencia de la marca m⁶A y que permitiera entonces determinar el destino subcelular del transcrito reconocido. Para ello, se planteó la construcción de una proteína de fusión, uniendo a la proteína dCas13b (dominio endonucleasa mutado), con los extremos amino de las proteínas PpaYTHDF1 y PpaYTHDF2, individualmente.

De forma natural, la proteína Cas13b (*Leptotrichia shahii*) puede interactuar específicamente con RNAs exógenos, como una especie de sistema inmune adaptativo, llevando a cabo el reconocimiento de estos ácidos nucleicos guiada por un gRNA, desencadenando la función ribonucleasa del dominio HEPN (*Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-binding*) de esta proteína sobre el transcrito blanco (Abudayyeh et al., 2016). Al emplear una versión con el dominio endonucleasa mutado (dCas13b) se espera la interacción con el mRNA blanco sin promover su degradación (Rauch et al., 2018); como transcrito arquetipo/reportero se eligió al mRNA de GFP, que pensamos nos puede proporcionar una señal fácilmente cuantificable. A continuación, describiré los distintos elementos de este sistema. Para comenzar se obtuvo un amplicón correspondiente a la dCas13b a partir del plásmido Cmv d0 dspCas13b-GGS-NYTHDF1 (Rauch et al., 2018), flanqueado por los sitios de recombinación attB1 y attB5r mediante PCR con los oligonucleótidos de la [Tabla 7](#) (Anexos). Acto seguido, dicho amplicón se purificó con el GeneJET Gel Extraction Kit (#K0691, Thermo Scientific™), siguiendo las

especificaciones del fabricante, después se recombinó en el vector pDONR 221TM P1-P5 del sistema Gateway, utilizando la enzima BP ClonasaTMII, para resguardar la construcción en bacterias electrocompetentes línea *survival* (Invitrogen). De este evento de transformación se aislaron 15 colonias, mismas con las que se realizó un PCR de colonia, confirmándose la presencia de la inserción del dCas13b flanqueado por los sitios attB5f y attB2; A partir de una de estas colonias se realizó un cultivo en medio LB líquido (3 ml) adicionado con kanamicina (50 µg/ml), este se incubó con agitación durante toda una noche a 37°C. De este cultivo se generó un miniprep para obtener el plásmido pDONR–P1–dCas13b–P5r y, tomando 500 µl de este cultivo, se procedió a generar un resguardo en glicerol. Luego, para la obtención de los extremos amino de las PpaYTHDF (YTHDF^N), inicialmente se propuso su obtención a partir de cDNA. Al igual que el producto de la dCas13b se utilizaron oligonucleótidos (Tabla 7 de Anexos) flanqueados por sitios attB5f y attB2, correspondientes. Sin embargo, ni utilizando un estadio de vida en el cual los *PpaYthdf* debieran estar más acumulados en el musgo, y tampoco cambiando las transcriptasas reversas para su posterior amplificación fue posible obtener ambos amplicones. Por esta razón se concluyó que la solución más parsimoniosa era enviar a sintetizar los YTHDF^N (Figura 10). Cuando ya se contaba con los YTHDF^N se planeó llevar a cabo la recombinación de estos extremos en el vector pDONR 221TM P5-P2 utilizando la enzima BP ClonasaTMII, tal como se explicó en la sección de Materiales y Métodos para el fragmento attB1–dCas13b–attB5r, por desgracia se suscitó la contingencia sanitaria actual acarreado la cancelación de actividades en todos los niveles de la Universidad y fue necesario detener el avance en este objetivo, ya que el tiempo restringido asignado para el trabajo de cada estudiante resultaba insuficiente.

Trabajando a la par, se esperaba insertar el gRNA dirigido a GFP (GFP-gRNA), bajo la acción del promotor del U6 snRNA de *P. patens*, y construido en el gBlock de la Figura 12, en el vector destino pTK-UBI-Gate, mismo donde habría de concluirse la construcción de la proteína de fusión (Figura 23), tal como se describe en la Figura 24. El método planteado para la culminación de este paso planteaba el corte con la enzima de restricción StuI, tanto en el sitio único del vector pTK-UBI-Gate como en los extremos correspondientes del gBlock; en ambos casos se comprobó el corte por StuI mediante electroforesis (ver Figura 28 de Anexos). Después se esperaba ligar el gBlock en el pTK-UBI-Gate, incubando ambos productos digeridos, con la DNA ligasa T4 para, luego, transformar bacterias electrocompetentes línea *ccdB survival* (Invitrogen).

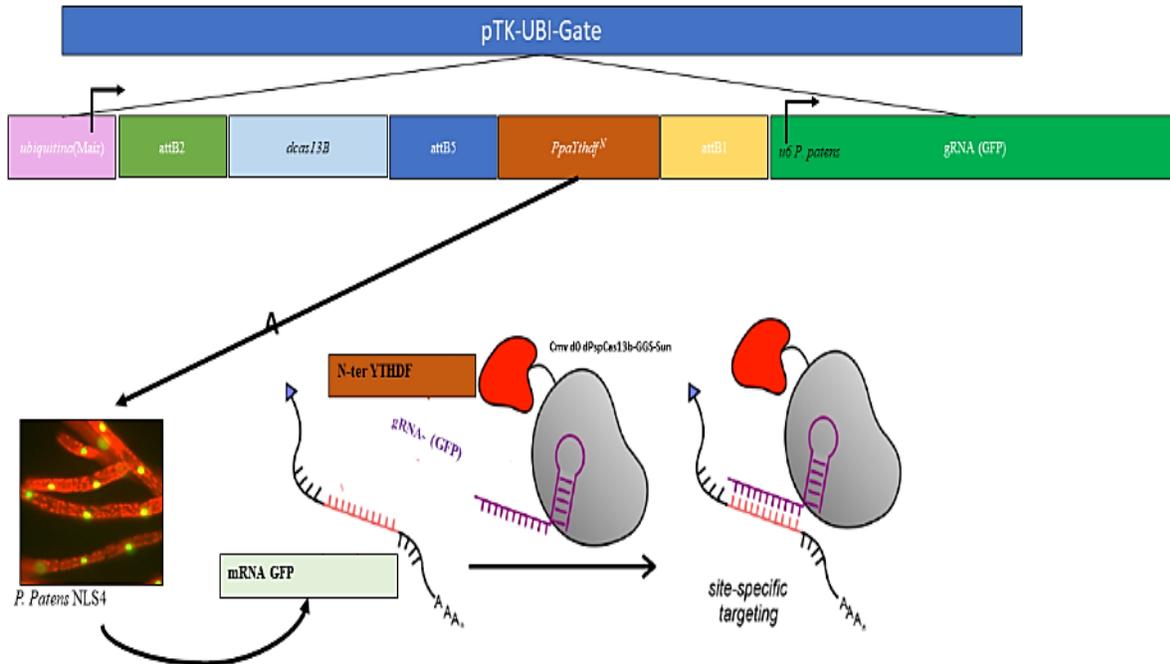


Figura 24. Modificado de Rauch *et al.*, 2018. Se muestra la construcción esperada dentro del pTK-UBI-Gate y la dinámica de la proteína de fusión sobre el transcrito de GFP, ambos dentro de la cepa NLS4 de *P. patens*.

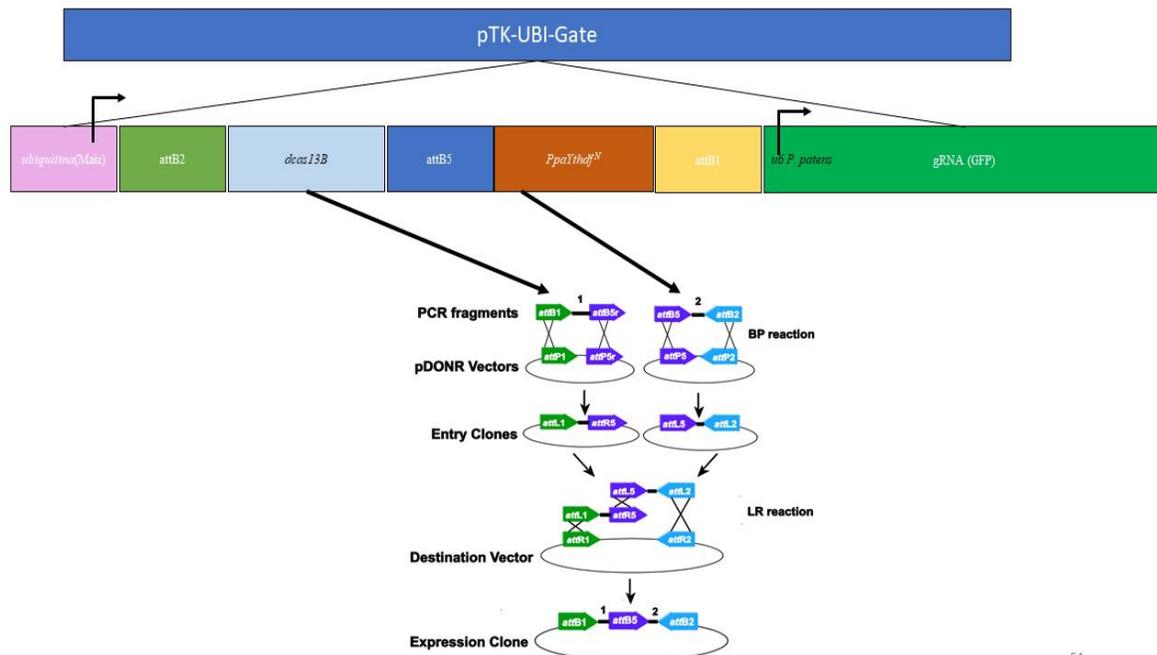


Figura 23. Esquema donde se representa los procesos de doble recombinación para obtener, finalmente, la proteína de fusión dirigida al mRNA de GFP. Los productos numerados como 1 y 2 corresponden a la dCas13b y a los YTHDF1/2^N, respectivamente. Por otra parte, esperaba introducir el gRNA-GFP en el pTK-UBI-Gate con ayuda de la DNA T4 ligasa.

No obstante, el problema que supuso el nulo avance en este paso de la construcción, fue que la actividad de la T4 DNA ligasa cerraba únicamente la muesca generada por la enzima de restricción StuI, sin realizar la inserción correspondiente a la construcción del GFP-gRNA, como consecuencia al realizar la transformación de las bacterias electrocompetentes sólo obtuve clonas del vector original, este problema aunado a la pandemia terminaron por detener en absoluto el proceso de la construcción (Figura 23).

De haberse obtenido la construcción anterior, el paso siguiente era emplear el plásmido final para transformar protoplastos generados de la línea NLS4 de *P. patens* obtenida del trabajo de Bezanilla, Pan, & Quatrano, 2003, la cual nos fue obsequiada amablemente por A. C. Cumming (University of Leeds); misma que expresa el gen de GFP constitutivamente, tal como se ilustra en la Figura 23. Después, se esperaba cuantificar el transcrito de GFP mediante RT-qPCR, determinar la fluorescencia *in vivo* de las plantas transformadas y, finalmente, realizar un Western Blot utilizando anticuerpos contra GFP; todo esto para determinar la función de los YTHDF^N de *P. patens*, es decir si se cumple la función propuesta por alguno de los modelos propuestos o si, por el contrario, llevan a cabo alguna función diferente en el musgo. Pese a la nula culminación de este objetivo, es sumamente importante resaltar que se adquirieron varias de las herramientas para llevarlo a término, con esto me refiero a haber generado la construcción pDONR P1-dCas13b-P5r, la adquisición de los fragmentos attB5r-YTHDF1^N-attB2 y attB5f-YTHDF2^N-attB2, así como también de la línea NLS4 de *P. patens*, integrada al acervo genético del laboratorio, para ser transformada con la construcción de la proteína de fusión.

Conclusiones

A continuación, se presentan las conclusiones de este trabajo para cada objetivo.

Primer objetivo: **Caracterizar los genes *PpaYth*, enfocándose en analizar los patrones de acumulación de sus transcritos en diferentes etapas de desarrollo y los elementos contenidos en su secuencia proteica empleando herramientas bioinformáticas.**

- *PpaYthdc1a* se acumula de forma más uniforme en las diferentes estructuras del musgo, es decir, tiende a comportarse como un gen con expresión constitutiva.
- Cada uno de los genes *PpaYth* exhibe un patrón particular de acumulación en las etapas de desarrollo analizadas, sin embargo, tienden a acumularse mayormente durante el desarrollo sexual y la embriogénesis de *P. patens*.
- A partir de datos de expresión disponibles, documentamos que los transcritos de los genes *PpaYth* no muestran una acumulación diferencial bajo tratamiento con ABA, o en respuesta a condiciones de estrés como frío, sequía, y estrés osmótico. En contraste, la acumulación diferencial de los transcritos de los genes *PpaYthdf* se ha observado en el desarrollo de brotes.
- Los resultados del análisis de estructura y desorden de las cuatro proteínas PpaYTH indican que éstas poseen las características esperadas para ser consideradas proteínas lectoras de m⁶A.

Segundo objetivo: **Eliminar los genes *PpaYthdf* de interés mediante edición genómica para determinar el efecto fenotípico de la ausencia de proteínas correspondientes durante el desarrollo de *P. patens*.**

- Con base en los análisis de genotipificación, se concluye que se generaron dos líneas mutantes, la primera para el gen *PpaYthdf2* y la segunda, es una doble mutante para los genes *PpaYthdf1* y *PpaYthdf2*, sin embargo, es necesario volver a generar la línea doble mutante debido a su pérdida, así como la mutante sencilla para el gen *PpaYthdf1*.

Tercer objetivo: **Diseñar y obtener construcciones genéticas que permitan estudiar la función del extremo amino de las proteínas PpaYTHDF en el metabolismo de los mRNAs.**

- Se logró el diseño del sistema completo de construcciones genéticas necesarias para realizar este objetivo y en la actualidad se cuenta con varias partes de la construcción de la proteína de fusión dCas13b-PpaYTHs^N, para el estudio de las PpaYTHs sobre el metabolismo de los mRNAs.

Perspectivas

Determinación de las PpaYTH de *P. patens* como lectoras *bona fide* y expresión diferencial de los genes *PpaYth* bajo diferentes tratamientos y estadios de desarrollo del musgo

- 1) Concluir la genotipificación de la candidata a mutante *PpaYthdf1*, en el segundo sitio de corte generado por el par de gRNAs DF1(2).
- 2) En caso de no obtenerse la mutante sencilla *PpaYthdf1*, proceder con la transformación de protoplastos para obtener líneas mutantes en dicho gene. Debido a la pérdida, por contaminación, de la doble mutante es necesario transformar protoplastos de la mutante *Ppaythdf2-C* con ambos pares de gRNAs para mutar *PpaYthdf1* con miras a generar la mutante doble.
- 3) Genotipificar a dichas mutantes.

Los primeros 3 incisos son para el siguiente objetivo, no este.

- 4) Determinar la acumulación de los transcritos de los genes *PpaYth* en los diferentes estadios de desarrollo del musgo, mediante RT-qPCR.

Efecto de eliminar los genes *PpaYthdf* de interés durante el desarrollo de *P. patens*

1. Fenotipificar las mutantes generadas para los genes *PpaYth*, con miras a evaluar las posibles consecuencias durante el desarrollo del musgo por la pérdida de función de estos genes.
- 2) Determinar si existe acumulación de los transcritos *PpaYthdf*, por medio de RT-qPCR, en las mutantes obtenidas para corroborar la pérdida de función de estos.

Diseñar y obtener construcciones genéticas para estudiar la función del extremo amino de las proteínas PpaYTHDF en el metabolismo de los mRNAs

- 1) Concluir la construcción del vector con la proteína de fusión dCas13b-PpaYTH^N + gRNA (GFP). Comenzando con probar un nuevo sitio de corte tanto en el gBlock correspondiente al gRNA (GFP) como en el vector pTK-Ubi-Gate, tal vez probando una enzima de digestión que, a diferencia de StuI, genere extremos pegajosos con un solo sitio de corte facilitando la ligación de la construcción en el vector destino; y continuando con los procesos de recombinación subsecuentes (Figura 11).
- 2) Transformar a la cepa NLS4 de *P. patens* con la construcción de la proteína de fusión y evaluar su actividad sobre el transcrito de GFP, mediante la cuantificación del mensajero de GFP por RT-qPCR, así como determinar la fluorescencia in vivo de la proteína GFP y realizar un western blot contra la misma GFP.

Bibliografía

- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, I. M., Cox, D. B. T., Zhang, F. (2016). C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 353(6299). <https://doi.org/10.1126/science.aaf5573>
- Arif, M. A., Hiss, M., Tomek, M., Busch, H., Meyberg, R., Tintelnot, S., Frank, W. (2019). ABA-induced vegetative diaspore formation in *Physcomitrella patens*. *Frontiers in Plant Science*, 10(March), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00315>
- Arribas-Hernández, L., Bressendorff, S., Hansen, M. H., Poulsen, C., Erdmann, S., & Brodersen, P. (2018). An m⁶A-YTH Module Controls Developmental Timing and Morphogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 30(5), 952–967. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00833>
- Batista, P. J., Molinie, B., Wang, J., Qu, K., Zhang, J., Li, L., Chang, H. Y. (2014). m⁶A RNA modification controls cell fate transition in mammalian embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 15(6), 707–719. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.019>
- Beike, A. K., Lang, D., Zimmer, A. D., Wüst, F., Trautmann, D., Wiedemann, G., Reski, R. (2015). Insights from the cold transcriptome of *Physcomitrella patens*: Global specialization pattern of conserved transcriptional regulators and identification of orphan genes involved in cold acclimation. *New Phytologist*, 205(2), 869–881. <https://doi.org/10.1111/nph.13004>
- Berlivet, S., Scutenaire, J., Deragon, J. M., & Bousquet-Antonelli, C. (2019). Readers of the m⁶A epitranscriptomic code. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1862(3), 329–342. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.12.008>
- Bezanilla, M., Pan, A., & Quatrano, R. S. (2003). RNA Interference in the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology*, 133(2), 470–474. <https://doi.org/10.1104/pp.103.024901>
- Bodi, Z., Zhong, S., Mehra, S., Song, J., Graham, N., Li, H., Fray, R. G. (2012). Adenosine methylation in *Arabidopsis* mRNA is associated with the 3' end and reduced levels cause developmental defects. *Frontiers in Plant Science*, 3(MAR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00048>
- Bruggeman, Q., Garmier, M., de Bont, L., Soubigou-Taconnat, L., Mazubert, C., Benhamed, M.,

- Delarue, M. (2014). The polyadenylation factor subunit CLEAVAGE AND POLYADENYLATION SPECIFICITY FACTOR30: A key factor of programmed cell death and a regulator of immunity in arabidopsis. *Plant Physiology*, *165*(2), 732–746. <https://doi.org/10.1104/pp.114.236083>
- Cheng, X., Li, M., Rao, X., Zhang, W., Li, X., Wang, L., & Huang, G. (2019). KIAA1429 regulates the migration and invasion of hepatocellular carcinoma by altering m6A modification of ID2 mRNA. *OncoTargets and Therapy*, *12*, 3421–3428. <https://doi.org/10.2147/OTT.S180954>
- Collonnier, C., Epert, A., Mara, K., Maclot, F., Guyon-Debast, A., Charlot, F., Nogu , F. (2017). CRISPR-Cas9-mediated efficient directed mutagenesis and RAD51-dependent and RAD51-independent gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biotechnology Journal*, *15*(1), 122–131. <https://doi.org/10.1111/pbi.12596>
- Cove, D. (2005). The Moss *Physcomitrella patens*. *Annual Review of Genetics*, *39*(1), 339–358. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.110214>
- Cove, D. J., Perroud, P. F., Charron, A. J., McDaniel, S. F., Khandelwal, A., & Quatrano, R. S. (2009). The moss *Physcomitrella patens*: A novel model system for plant development and genomic studies. *Cold Spring Harbor Protocols*, *4*(2). <https://doi.org/10.1101/pdb.emo115>
- Covelo-Molares, H., Bartosovic, M., & Vanacova, S. (2018). RNA methylation in nuclear pre-mRNA processing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *9*(6), 1–17. <https://doi.org/10.1002/wrna.1489>
- Desrosiers, R., Friderici, K., & Rottman, F. (1974). Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *71*(10), 3971–3975. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4372599> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC434308>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213). <https://doi.org/10.1126/science.1258096>

- Du, H., Zhao, Y., He, J., Zhang, Y., Xi, H., Liu, M., Wu, L. (2016). YTHDF2 destabilizes m⁶A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex. *Nature Communications*, 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms12626>
- Duan, H. C., Wei, L. H., Zhang, C., Wang, Y., Chen, L., Lu, Z., Jia, G. (2017). ALKBH10B is an RNA N⁶-methyladenosine demethylase affecting *Arabidopsis* floral transition. *Plant Cell*, 29(12), 2995–3011. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00912>
- Dubin, D. T., & Taylor, R. H. (1975). The methylation state of poly A-containing-messenger RNA from cultured hamster cells. *Nucleic Acids Research*, 2(10), 1653–1668. <https://doi.org/10.1093/nar/2.10.1653>
- Edmonds, M., Vaughan, M. H., & Nakazato, H. (1971). Polyadenylic Acid Sequences in the Heterogeneous Nuclear RNA and Rapidly-Labeled Polyribosomal RNA of HeLa Cells: Possible Evidence for a Precursor Relationship. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(6), 1336–1340. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.6.1336>
- Fernandez-Pozo, N., Haas, F. B., Meyberg, R., Ullrich, K. K., Hiss, M., Perroud, P., Rensing, S. A. (2019). PEATmoss (Physcomitrella Expression Atlas Tool): a unified gene expression atlas for the model plant *Physcomitrella patens*. In *The Plant Journal*. <https://doi.org/10.1111/tpj.14607>
- Frank, M. H., & Scanlon, M. J. (2015). Cell-specific transcriptomic analyses of three-dimensional shoot development in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Journal*, 83(4), 743–751. <https://doi.org/10.1111/tpj.12928>
- Fu, Y., & Zhuang, X. (2020). m⁶A-binding YTHDF proteins promote stress granule formation. *Nature Chemical Biology*, 16(9), 955–963. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0524-y>
- Garcias, D. (2018). *Contribución de la vía de metilación de RNAs mensajeros durante el desarrollo de Physcomitrella patens*. Universidad Autónoma de México (UNAM).
- Hartmann, A. M., Nayler, O., Schwaiger, F. W., Obermeier, A., & Stamm, S. (1999). The interaction and colocalization of Sam68 with the splicing-associated factor YT521-B in nuclear dots is regulated by the Src family kinase p59(fyn). *Molecular Biology of the Cell*,

10(11), 3909–3926. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.11.3909>

- Hiss, M., Laule, O., Meskauskiene, R. M., Arif, M. A., Decker, E. L., Erxleben, A., Rensing, S. A. (2014). Large-scale gene expression profiling data for the model moss *Physcomitrella patens* aid understanding of developmental progression, culture and stress conditions. *Plant Journal*, 79(3), 530–539. <https://doi.org/10.1111/tpj.12572>
- Hou, Y., Sun, J., Wu, B., Gao, Y., Nie, H., Nie, Z., Li, S. (2021). CPSF30-L-mediated recognition of mRNA m⁶A modification controls alternative polyadenylation of nitrate signaling-related gene transcripts in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 14(4), 688–699. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.01.013>
- Huang, H., Weng, H., Sun, W., Qin, X., Shi, H., Wu, H., Chen, J. (2018). Recognition of RNA N⁶-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nature Cell Biology*, 20(3), 285–295. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0045-z>
- Hunt, A. G. (2014). The *Arabidopsis* polyadenylation factor subunit CPSF30 as conceptual link between mRNA polyadenylation and cellular signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.07.002>
- Inada, T., & Makino, S. (2014). Novel roles of the multi-functional CCR4-NOT complex in post-transcriptional regulation. *Frontiers in Genetics*, 5(MAY), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00135>
- Ivanova, I., Much, C., Di Giacomo, M., Azzi, C., Morgan, M., Moreira, P. N., O’Carroll, D. (2017). The RNA m⁶A Reader YTHDF2 Is Essential for the Post-transcriptional Regulation of the Maternal Transcriptome and Oocyte Competence. *Molecular Cell*, 67(6), 1059-1067.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.003>
- Jia, G., Yang, C. G., Yang, S., Jian, X., Yi, C., Zhou, Z., & He, C. (2008). Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS Letters*, 582(23–24), 3313–3319. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.08.019>
- Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H., & Xu, J. (2012). Template-based

- protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols*, 7(8), 1511–1522. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.085>
- Khraiwesh, B., Qudeimat, E., Thimma, M., Chaiboonchoe, A., Jijakli, K., Alzahmi, A., Salehi-Ashtiani, K. (2015). Genome-wide expression analysis offers new insights into the origin and evolution of *Physcomitrella patens* stress response. *Scientific Reports*, 5(October), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep17434>
- Lasman, L., Krupalnik, V., Viukov, S., Mor, N., Aguilera-Castrejon, A., Schneir, D., Hanna, J. H. (2020). Context-dependent compensation between functional Ythdf m⁶A reader proteins. *Genes and Development*, 34(19–20), 1373–1391. <https://doi.org/10.1101/gad.340695.120>
- Le Bail, A., Scholz, S., & Kost, B. (2013). Evaluation of Reference Genes for RT qPCR Analyses of Structure-Specific and Hormone Regulated Gene Expression in *Physcomitrella patens* Gametophytes. *PLoS ONE*, 8(8), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070998>
- Li, Y., Bedi, R. K., Moroz-Omori, E. V., & Cafilisch, A. (2020). Structural and Dynamic Insights into Redundant Function of YTHDF Proteins. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(12), 5932–5935. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c01029>
- Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., He, C. (2014). A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N⁶-adenosine methylation. *Nature Chemical Biology*, 10(2), 93–95. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1432>
- Lopez-Obando, M., Hoffmann, B., Géry, C., Guyon-Debast, A., Téoulé, E., Rameau, C., Nogué, F. (2016). Simple and Efficient Targeting of Multiple Genes Through CRISPR-Cas9 in *Physcomitrella patens*. *G3 & Genes/Genomes/Genetics*, 6(11), 3647–3653. <https://doi.org/10.1534/g3.116.033266>
- Luo, S., & Tong, L. (2014). Molecular basis for the recognition of methylated adenines in RNA by the eukaryotic YTH domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(38), 13834–13839. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412742111>
- Luo, Y., Na, Z., & Slavoff, S. A. (2018). P-Bodies: Composition, Properties, and Functions. *Biochemistry*, 57(17), 2424–2431. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01162>

- Ma, Jiani, Zhang, L., Chen, S., & Liu, H. (2021). A brief review of RNA modification related database resources. *Methods, In press*(January), 1046–2023.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.03.003>
- Ma, Jianzhu, Wang, S., Zhao, F., & Xu, J. (2013). Protein threading using context-specific alignment potential. *Bioinformatics*, 29(13). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt210>
- Mallett, D. R., Chang, M., Cheng, X., & Bezanilla, M. (2019). Efficient and modular CRISPR-Cas9 vector system for *Physcomitrella patens*. *Plant Direct*, 3(9), 1–15.
<https://doi.org/10.1002/pld3.168>
- Mansour, A. A., Kol, N., Hershkovitz, V., Peer, E., Mor, N., Manor, Y. S., Hanna, J. H. (2015). Toward Differentiation. *Science*, 347(6225), 1002–1006.
<https://doi.org/10.1126/science.1261417>
- Martínez-Pérez, M., Aparicio, F., López-Gresa, M. P., Bellés, J. M., Sánchez-Navarro, J. A., & Pallás, V. (2017). *Arabidopsis* m⁶A demethylase activity modulates viral infection of a plant virus and the m⁶A abundance in its genomic RNAs . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(40), 10755–10760. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703139114>
- Mauer, J., Luo, X., Blanjoie, A., Jiao, X., Grozhik, A. V., Patil, D. P., Jaffrey, S. R. (2017). Reversible methylation of m⁶A in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature*, 541(7637), 371–375. <https://doi.org/10.1038/nature21022>
- Meyer, K. D., & Jaffrey, S. R. (2017). Rethinking m⁶A Readers, Writers, and Erasers . *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33(1), 319–342.
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060758>
- Meyer, K. D., Patil, D. P., Zhou, J., Zinoviev, A., Skabkin, M. A., Elemento, O., Jaffrey, S. R. (2015). 5' UTR m⁶A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell*, 163(4), 999–1010.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.012>
- Mielecki, D., Zugaj, D., Muszewska, A., Piwowarski, J., Chojnacka, A., Mielecki, M., Grzesiuk, E. (2012). Novel AlkB dioxygenases-alternative models for in silico and in vivo studies. *PLoS ONE*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030588>

- Moody, L. A., Kelly, S., Clayton, R., Weeks, Z., Emms, D. M., & Langdale, J. A. (2020). NO GAMETOPHORES 2 Is a Novel Regulator of the 2D to 3D Growth Transition in the Moss *Physcomitrella patens*. *Current Biology*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.10.077>
- Muthukrishnan, S., Both, G. W., & Furuichi, Y. (1975). 5'-Terminal 7-methylguanosine in eukaryotic mRNA is required for translation. 255, 5–9.
- Nayler, O., Hartmann, A. M., & Stamm, S. (2000). The ER repeat protein YT521-B localizes to a novel subnuclear compartment. *Journal of Cell Biology*, 150(5), 949–961. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.5.949>
- Noriko Saitoh, & Chris S. Spahr, Scott D. Patterson, Paula Bubulya, Andrew F. Neuwald, and D. L. S. (2004). Proteomic Analysis of Interchromatin Granule Clusters. *Mol Biol Cell*, 15(December), 3876–3890. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04>
- Ok, S. H., Jeong, H. J., Bae, J. M., Shin, J. S., Luan, S., & Kim, K. N. (2005). Novel CIPK1-associated proteins in *Arabidopsis* contain an evolutionarily conserved C-terminal region that mediates nuclear localization. *Plant Physiology*, 139(1), 138–150. <https://doi.org/10.1104/pp.105.065649>
- Ortiz-Ramírez, C., Hernandez-Coronado, M., Thamm, A., Catarino, B., Wang, M., Dolan, L., Becker, J. D. D. (2016). A Transcriptome Atlas of *Physcomitrella patens* Provides Insights into the Evolution and Development of Land Plants. *Molecular Plant*, 9(2), 205–220. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.002>
- Patil, D. P., Chen, C. K., Pickering, B. F., Chow, A., Jackson, C., Guttman, M., & Jaffrey, S. R. (2016). m⁶A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 537(7620), 369–373. <https://doi.org/10.1038/nature19342>
- Peng, J., & Xu, J. (2011). Raptorx: Exploiting structure information for protein alignment by statistical inference. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 79(SUPPL. 10), 161–171. <https://doi.org/10.1002/prot.23175>
- Perry, R. P., & Kelley, D. E. (1974). Existence of methylated messenger RNA in mouse L cells. *Cell*, 1(1), 37–42. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(74\)90153-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(74)90153-6)

- Prabakaran, S., Lippens, G., Steen, H., & Gunawardena, J. (2012). Post-translational modification: Nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 4(6), 565–583. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1185>
- Ramanathan A., R. G. B. and C. S.-H. (2016). *SURVEY AND SUMMARY mRNA capping: biological functions and applications*. 44(16), 7511–7526. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw551>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Rauch, S., He, C., & Dickinson, B. C. (2018). Targeted m⁶A Reader Proteins to Study Epitranscriptomic Regulation of Single RNAs [Research-article]. *Journal of the American Chemical Society*, 140(38), 11974–11981. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b05012>
- Ries, R. J., Zaccara, S., Klein, P., Olarerin-George, A., Namkoong, S., Pickering, B. F., ... Jaffrey, S. R. (2019). m⁶A enhances the phase separation potential of mRNA. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1374-1>
- Ryu, K. S., Lee, K. J., Bae, S. H., Kim, B. K., Kim, K. A., & Choi, B. S. (2003). Binding surface mapping of intra- and interdomain interactions among hHR23B, ubiquitin, and polyubiquitin binding site 2 of S5a. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 36621–36627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304628200>
- Schwartz, S., Mumbach, M. R., Jovanovic, M., Wang, T., Maciag, K., Bushkin, G. G., Regev, A. (2014). Perturbation of m⁶A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell Reports*, 8(1), 284–296. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.048>
- Scutenaire, J., Deragon, J.-M., Jean, V., Benhamed, M., Raynaud, C., Favory, J.-J., Bousquet-Antonelli, C. (2018). The YTH Domain Protein ECT2 Is an m⁶A Reader Required for Normal Trichome Branching in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 30(5), 986–1005. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00854>

- Shatkin, A. J. (1976). Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell*, 9(4 PT 2), 645–653. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1017010>
- Shi, H., Wang, X., Lu, Z., Zhao, B. S., Ma, H., Hsu, P. J., He, C. (2017). YTHDF3 facilitates translation and decay of N 6-methyladenosine-modified RNA. *Cell Research*, 27(3), 315–328. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.15>
- Sledz, Paweł; Jinek, M. (2016). *Structural insights into the molecular mechanism of the m 6 A writer complex*. 1–16. <https://doi.org/10.7554/eLife.18434>
- Sloan, K. E., Warda, A. S., Sharma, S., Entian, K. D., Lafontaine, D. L. J., & Bohnsack, M. T. (2017). Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. *RNA Biology*, 14(9), 1138–1152. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1259781>
- Song, P., Yang, J., Wang, C., Lu, Q., Shi, L., Tayier, S., & Jia, G. (2021). Arabidopsis N 6 -methyladenosine reader CPSF30-L recognizes FUE signals to control polyadenylation site choice in liquid-like nuclear bodies. *Molecular Plant*, 14, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.01.014>
- Staněk, D., & Fox, A. (2017). Nuclear bodies: news insights into structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 46, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.05.001>
- Stoilov, P., Rafalska, I., & Stamm, S. (2002). YTH: A new domain in nuclear proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(10), 495–497. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02189-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02189-8)
- Su, Z., Wilson, B., Kumar, P., & Dutta, A. (2020). Noncanonical Roles of tRNAs: TRNA Fragments and beyond. *Annual Review of Genetics*, 54, 47–69. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-022620-101840>
- Venkatesh, S., & Workman, J. L. (2015). Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(3), 178–189. <https://doi.org/10.1038/nrm3941>
- Vespa, L., Vachon, G., Berger, F., Perazza, D., Faure, J. D., & Herzog, M. (2004). The immunophilin-interacting protein AtFIP37 from *Arabidopsis* is essential for plant

- development and is involved in trichome endoreduplication. *Plant Physiology*, *134*(4), 1283–1292. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028050>
- Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G. C., Yue, Y., Han, D., He, C. (2014). N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, *505*(7481), 117–120. <https://doi.org/10.1038/nature12730>
- Wang, X., Zhao, B. S., Roundtree, I. A., Lu, Z., Han, D., Ma, H., He, C. (2015). N⁶-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, *161*(6), 1388–1399. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.014>
- Wei, J., Liu, F., Lu, Z., Fei, Q., Ai, Y., He, P. C., He, C. (2018). Differential m⁶A, m⁶Am, and m¹A Demethylation Mediated by FTO in the Cell Nucleus and Cytoplasm. *Molecular Cell*, *71*(6), 973–985.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.011>
- Wei, L.-H., Song, P., Wang, Y., Lu, Z., Tang, Q., Yu, Q., Jia, G. (2018). The m⁶A Reader ECT2 Controls Trichome Morphology by Affecting mRNA Stability in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *30*(5), 968–985. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00934>
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J. (2007). An “electronic fluorescent pictograph” Browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*, *2*(8), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000718>
- Xiao, L., Wang, H., Wan, P., Kuang, T., & He, Y. (2011). Genome-wide transcriptome analysis of gametophyte development in *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology*, *11*. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-177>
- Xiao, L., Zhang, L., Yang, G., Zhu, H., & He, Y. (2012). Transcriptome of protoplasts reprogrammed into stem cells in *Physcomitrella patens*. *PLoS ONE*, *7*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035961>
- Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y.-S., Hao, Y.-J., Sun, B.-F., Yang, Y.-G. (2016). Nuclear m⁶A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Molecular Cell*, *61*(4), 507–519. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.012>
- Yang, Y., Hsu, P. J., Chen, Y. S., & Yang, Y. G. (2018). Dynamic transcriptomic m⁶A

- decoration: Writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism. *Cell Research*, 28(6), 616–624. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0040-8>
- Youn, J. Y., Dunham, W. H., Hong, S. J., Knight, J. D. R., Bashkurov, M., Chen, G. I., Gingras, A. C. (2018). High-Density Proximity Mapping Reveals the Subcellular Organization of mRNA-Associated Granules and Bodies. *Molecular Cell*, 69(3), 517-532.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.020>
- Zaccara, S., & Jaffrey, S. R. (2020). A Unified Model for the Function of YTHDF Proteins in Regulating m6A-Modified mRNA. *Cell*, 181(7), 1582-1595.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.012>
- Zaccara, S., Ries, R. J., & Jaffrey, S. R. (2019). Reading, writing and erasing mRNA methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(10), 608–624. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0168-5>
- Zhang, F., Kang, Y., Wang, M., Li, Y., Xu, T., Yang, W., Jin, P. (2018). Fragile X mental retardation protein modulates the stability of its m⁶A-marked messenger RNA targets. *Human Molecular Genetics*, 27(22), 3936–3950. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy292>
- Zhang, Z., Theler, D., Kaminska, K. H., Hiller, M., De La Grange, P., Pudimat, R., Stamm, S. (2010). The YTH domain is a novel RNA binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 285(19), 14701–14710. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.104711>
- Zhao, B. S., Roundtree, I. A., & He, C. (2016). Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(1), 31–42. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.132>
- Zhao, B. S., Wang, X., Beadell, A. V., Lu, Z., Shi, H., Kuuspalu, A., He, C. (2017). m⁶A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature*, 542(7642), 475–478. <https://doi.org/10.1038/nature21355>
- Zhao, M., Li, Q., Chen, Z., Lv, Q., Bao, F., Wang, X., & He, Y. (2018). Regulatory mechanism of ABA and ABI3 on vegetative development in the moss *Physcomitrella patens*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 1–19.

<https://doi.org/10.3390/ijms19092728>

Zheng, G., Dahl, J. A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C. M., Li, C. J., He, C. (2013). ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility.

Molecular Cell, 49(1), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.015>

Zhong, S., Li, H., Bodi, Z., Button, J., Vespa, L., Herzog, M., & Fray, R. G. (2008). MTA is an *Arabidopsis* messenger RNA adenosine methylase and interacts with a homolog of a sex-specific splicing factor. *Plant Cell*, 20(5), 1278–1288.

<https://doi.org/10.1105/tpc.108.058883>

Anexos

Anexo I. Soluciones utilizadas en esta tesis

Preparación del medio PpNH₄

Para este medio de cultivo se generan las siguientes soluciones stock:

Solución stock de microelementos (1000X)

- H₃BO₃ 614 mg
- CuSO₄·5H₂O 55 mg
- MnCl₂·4H₂O 389 mg
- CoCl₂·6H₂O 55 mg
- ZnSO₄·7H₂O 55 mg
- KI 28 mg
- Na₂MoO₄·2H₂O 25 mg

Agregar 1 L de H₂O, disolver los reactivos anteriores y alícuotar en frascos de 250 ml, esterilizar por autoclave y almacenar a 4°C.

Soluciones stock para el medio PpNH₄

- MgSO₄·7H₂O 127 g/L (500X)
- KH₂PO₄ 125 g/L (500X)
- CaNO₃·4H₂O 400 g/L (500X)
- Di-ammonium tartrate 250 g/L (500X)

Agregar 1 L de H₂O a cada reactivo, esterilizar por autoclave y almacenar a 4°C.

De cada solución stock se mezclarán los siguientes volúmenes:

- MgSO₄·7H₂O (500X) 2 ml
- KH₂PO₄ (500X) 2 ml
- CaNO₃·4H₂O (500X) 2 ml
- FeSO₄·7H₂O 50 mg
- Micro Elementos (1000X) 2 ml

- Tartrato de amonio (500X) 2 ml

Agregar 7 g de agar por cada litro de medio y aforar a 1 L con H₂O estéril.

Para preparar medio PRMB se deben mezclar las soluciones anteriores que para el medio PpNH₄, pero al final es necesario agregar:

- 60 g de Manitol
- 5 ml de CaCl₂·2H₂O (500 mM)

Solución 3M para transformar protoplastos (50 ml)

- 4.55 g Manitol
- 750 µl MgCl₂·6H₂O (1M)
- 5 ml 1% MES pH 5.6

Aforar con H₂O hasta 50 ml y disolver por agitación. Esterilizar por filtrado con un filtro de 0.22 µm. Almacenar a 4°C.

Preparación de soluciones para miniprep de DNA

Solución A

- 2.5 ml de Tris (1M) pH 8.
- 10 ml EDTA (10 mM).
- 87.5 ml H₂O.

Solución B

- 20 ml NaOH (1N).
- 5 ml SDS 20%.
- 75 ml H₂O.

Solución C

- 60 ml KCH₃CO₂ (3M)
- 11.5 ml de ácido acético.

- 29.5 ml H₂O

CTAB 2% (30ml)

- Tris-HCl (1 M) pH 8 3 ml
- NaCl (5 M) 9 ml
- (CTAB) 0.6 gr 2% (p/v)
- EDTA (250 mM) pH 7 6 ml
- H₂O Aforar a 30 ml

Anexo II. Genes analizados en esta tesis

Tabla 1. Se muestran las PpaYTH con los dominios predichos por RaptorX y Phytozome, así como la cantidad de ligandos y su identidad.

Proteína	Dominios predichos RaptorX	Dominios anotados Phytozome	Ligandos predichos RaptorX	Ligandos
PpaYTHDF1	3	3	2	<ul style="list-style-type: none"> • m6A • Zinc
PpaYTHDF2	4	2	1	<ul style="list-style-type: none"> • m6A
PpaYTHDC1A	3	1	2	<ul style="list-style-type: none"> • m6A • Zinc
PpaYTHDC1B	3	1	2	<ul style="list-style-type: none"> • m6A • Glucosa

Tabla 2. Números de acceso de los genes YTH para determinar su acumulación en los distintos tipos celulares y tejidos del vegetal

Referencia:		
Nombre del gen	Scutenaire et al. 2018/Phytozome	v6.1 (eFP browser)
PpYTHDC1A	Pp3c20_9290V3.1	Pp1s9_445V6.1
PpYTHDC1B	Pp3c8_11880V3.1	Pp1s62_115V6.1
PpYTHDF1	Pp3c3_33560V3.1	Pp1s198_172V6.1
PpYTHDF2	Pp3c10_17810V3.1	Pp1s181_63V6.1

Tabla3. Se recopilan los títulos consultados para determinar la acumulación de los *Ppalyth* en diferentes tratamientos.

Referencia	Tratamiento(s)	Acumulación significativa de yths	Cuenta con tabla de datos crudos
(Arif et al., 2019)	<ul style="list-style-type: none"> Ácido abséísico (ABA). 	No detectada.	No. Sólo cuenta con tabla de expresados diferencialmente.
(Beike et al., 2015)	<ul style="list-style-type: none"> Frío 	No significativa.	Sí.
(Khraiwesh et al., 2015)	<ul style="list-style-type: none"> ABA Frío Sequía Estrés osmótico 	No significativa.	Sí, empero son muy pesados para trabajar con ellos desde mi PC.
(M. Zhao et al., 2018)	<ul style="list-style-type: none"> Ácido abséísico (ABA). 	No detectada.	No. Sólo cuentan con tablas de datos analizados.
(L. Xiao et al., 2011)	<ul style="list-style-type: none"> Desarrollo de 3, 14,24 y 30 días. 	—	Sí. Pero los archivos vienen en un formato con el cual nunca he trabajado.
(Frank & Scanlon, 2015)	<ul style="list-style-type: none"> Auxinas (5 días), seguido de un pase a cinecinas (1 día) 	En células de brote, los transcritos <i>ythdf1</i> y <i>ythdf2</i> se acumulan significativamente.	Sí, pero no fue necesaria, puesto que en la tabla de GED estos genes aparecen representados.
(Hiss et al., 2014)	<ul style="list-style-type: none"> Cultivo sólido BCD. Cultivo líquido BCD pH 4.5 y 5.8 Deshidratación/rehidratación Luz solar, luz fuerte, UV-B y oscuridad. 	—	Sí se cuenta con datos previos, el problema es que son muchas y muy pesadas, por otra parte, toda la información de este artículo la condensaron en la herramienta en línea https://peatmoss.online.uni-marburg.de/ para su mejor manejo.
(L. Xiao et al., 2012)	<ul style="list-style-type: none"> Reprogramación celular de protoplastos a células troncales. 	No detectada.	Sí. Pero los archivos vienen en un formato con el cual nunca he trabajado.

Anexo III. Oligonucleótidos empleados en esta tesis

Tabla 4. Oligonucleótidos para cuantificar la acumulación por RT-qPCR de los genes YTH, y los genes de referencia Actina y Ade PRT*, los oligonucleótidos de este último gen fueron obtenidos del trabajo de (Le Bail et al., 2013).

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
RT-qPCRYTHDC1APpa	Oligo F: TGC GGG GTC CCT TTG ATA AG
	Oligo R: CGG GAA ACC TTG TGA ATA CGT G
RT-qPCRYTHDC1BPpa	Oligo F: ACG TTC CAG CCA GTA CGA TG
	Oligo R: AAC AGC TCA ACA CCA GGA GA
RT-qPCRYTHDF1Ppa	Oligo F: CCC GCG ACT TAA AGA GAG CG
	Oligo R: AGA CAG AAG AAT AGG CCC GC
RT-qPCRYTHDF2Ppa	Oligo F: AAG GAA GTT TCC ACT CTG CCA
	Oligo R: CAG CCC ACA ACC TGT GTG AA
ACT_Pp	Oligo F: GTC CAC ATT AGA TTC TCG CA
	Oligo R: ACC GAG TCC AAC ATT CTA CC
Ade PRT*	Oligo F: AGTATAGTCTAGAGTATGGTACCG
	Oligo R: TAGCAATTTGATGGCAGCTC

Tabla 5. Secuencias de gRNAs diseñados para mutar los genes DF1 y DF2 de *P. patens*.

DF1
Posición 290
Fw: 5' ACG GCA GTC CTA GAC CGG GTA TGG GTT GTA AGT CCT CCA CCT TCC 3'
Rev: 5' TGA CCT GGA TGT TAC CCC CTG TTT AAG AGC TAT GCT GGA AAC AGC 3'
Posición 58
Fw: 5' TGA CCT GGA TGT TAC CCC CTG TTT AAG AGC TAT GCT GGA AAC AGC 3'
Rev: 5' AGG GGG TAA CAT CCA GGT CAA TGG GTT GTA AGT CCT CCA CCT TCC 3'
DF2
Posición 47
Fw: 5' TCT GTC TGC TGG GAG CAC CTG TTT AAG AGC TAT GCT GGA AAC AGC 3'
Rev: 5' AGG TGC TCC CAG CAG ACA GAA TGG GTT GTA AGT CCT CCA CCT TCC 3'

Tabla 6. Set de oligonucleótidos para determinar la mutación generada por los gRNAs dirigidos a los genes PpaYTHDF.

Set de oligonucleótidos para determinar la mutación ocasionada por el gRNA DF1 (58)	
OCDM1.1 FW	CCA ATT TTG CTG CTC GGG GTT G
OCDM1.1 RV	CCC AAG CCC CAA TCG ACA GC
Set de oligos para determinar la mutación ocasionada por el gRNA DF1 (290)	
OCDM1.2 FW	CTT TAT CAA CAG CCA GTA TCT CC
OCDM1.2 RV	GAA CCT GGA CTG TGA ATT GC
Set de oligos para determinar la mutación ocasionada por el gRNA DF2 (47)	
OCDM2.1 FW	CAC ATC GTT TCT CAA CAT GGG TC
OCDM2.1 RV	CGC ACG TAA GGC ACG CAG AA

Tabla 7. Oligonucleótidos flanqueados por los sitios attB para la generación de la proteína de fusión mediante sistema Gateway.

Oligonucleótido	Secuencia
attB1FdCAS13b	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCC ATG AAC ATC CCC GCT CTG GTG G
attB5RdCas13b	GGGG AC AAAC TTT TGT ATA CAA AGT TGT ATC CTC TTT GGA CAC GAT GTC G
attB5FNtrYTHDF2	GGGG ACA ACT TTG TAT ACA AAA GTT GCC ATG TAT CAG GGC AAT GTC TTG A
attB2RNtrYTHDF2	GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA GCT GTT TCC TGA TGA GAT CAC A
attB5FNtrYTHDF1	GGGG ACA ACT TTG TAT ACA AAA GTT GCC ATG AAG ATA TCT GTG AAG ACT T
attB2RNtrYTHDF1	GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA GAG CGG GGT AAC TGG CCT CAA T
DF1Ntr Fw	caccATG AAG ATA TCT GTG AAG ACT TTG
DF1Ntr Rv	ACT AAC TTC ACC GCC CAT CG
DF2Ntr Fw	cacc ATG TAT CAG GGC AAT GTC TTG
DF2Ntr Rv	GGT TTG ACG TCC TAA ATG AGA

Anexo IV. Resultados del modelador RaptorX

Tabla 8. Condensado de los resultados obtenidos a través del modelador RaptorX para cada una de las PpaYTH. Un modelo con un *score* >50 es considerado como altamente probable. Un valor de uGDT (*Global Distance Test*) >50 es un buen indicador del modelo generado, el uGDT cuantifica la similitud entre la estructura de dos proteínas. *P-value* cuantifica la probabilidad de que un modelo predicho sea el peor de todo un set generado al azar *P-value* menor a 10^{-3} es un buen indicador. Estos tres valores deben ser tomados en cuenta para determinar la calidad de un modelo generado (Para más información revisar el apartado Documentation de RaptorX). Por otra parte, se proporcionan las ligas de acceso para los mejores moldes utilizados durante el proceso de predicción, el nombre de cada uno de estos moldes se encuentra en la columna siguiente: Molde; finalmente, se muestra las regiones correspondientes a cada uno de los

PpaYTH	Dominio	Molde	Nombre del molde	Referencia	Score	P-value	uGDT	Región correspondiente a cada dominio
PpaYTHDC1a	YTH	5ZUU	ATCPSF30 Dominio YTH.	(Hou et al., 2021)	155	1.68e-10	147	Ordenada (aa 217-374)
	CCCH (dedos de zinc)	10.2210/pdb2D9N/pdb	CCCH tipo dedos de zinc. Dominio 2 del factor de Especificidad Poliadenilación y Escisión.	Abe et al., datos no publicados.	43	1.11e-12	53	Ordenada (aa 60-158)
PpaYTHDC1b	YTH	5ZUU	ATCPSF30 Dominio YTH.	(Hou et al., 2021)	142	9.87e-10	128	Ordenada (aa 189-327)
	Hidrolasa de glucósidos	10.2210/pdb3WOK/pdb	Hidrolasa de grupos glucósidos.	Oyama et al., datos no publicados.	17	8.43e-02	26	Ordenada (aa 513-562)
PpaYTHDF1	YTH	6ZOT	YTHDF3 Dominio YTH.	(Li, et al., 2020)	168	2.68e-12	153	Ordenada (aa 658-838)
	Tipo ubiquitina	10.2210/pdb1P1A/pdb	Dominio Ubiquitin- parecido a hHR23B.	(Ryu et al., 2003)	81	1.31e-05	70	Ordenada (aa 1-76)
PpaYTHDF2	YTH	6ZOT	YTHDF3 Dominio YTH.	(Li et al., 2020)	174	1.65e-11	154	Ordenada (aa 589-784)

dominios predichos y si esta es ordenada o no.

Anexo V. Figuras suplementarias

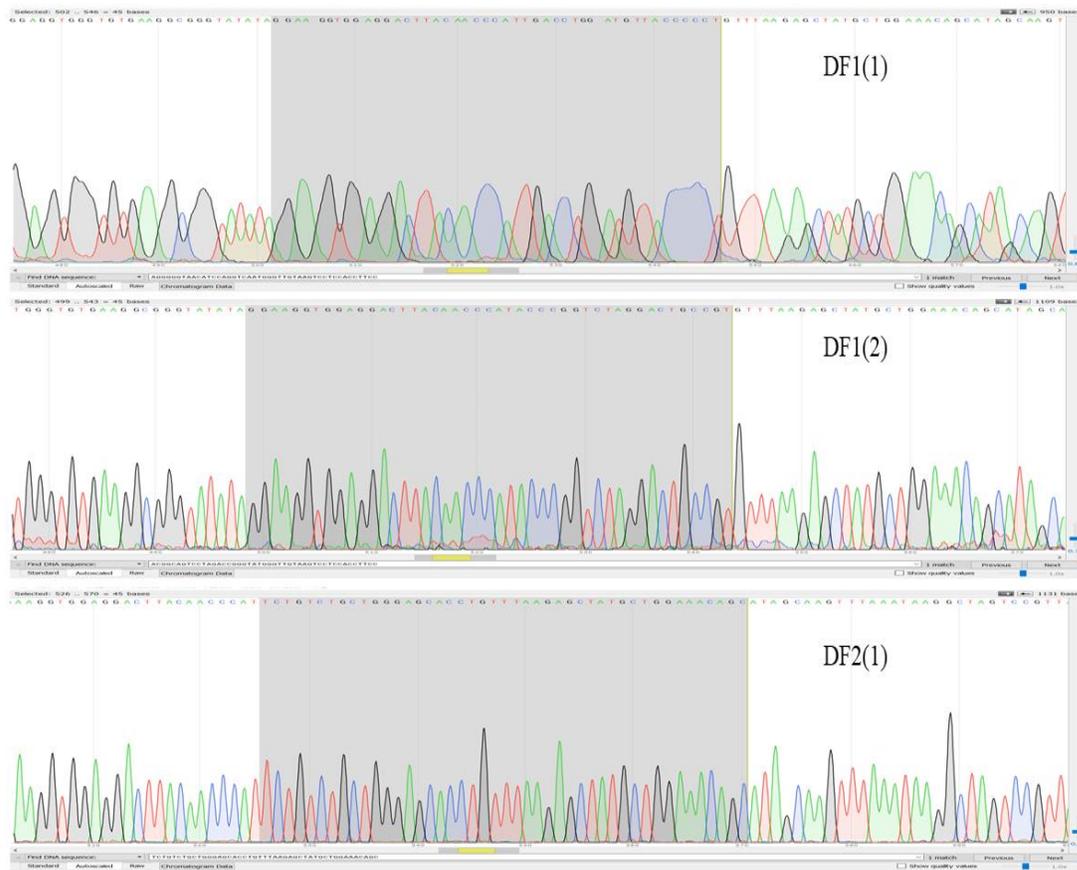


Figura 25. Resultados de secuenciación de los plásmidos con los gRNAs (área sombreada) utilizados para mutar a los genes *PpaYthdf* de interés.

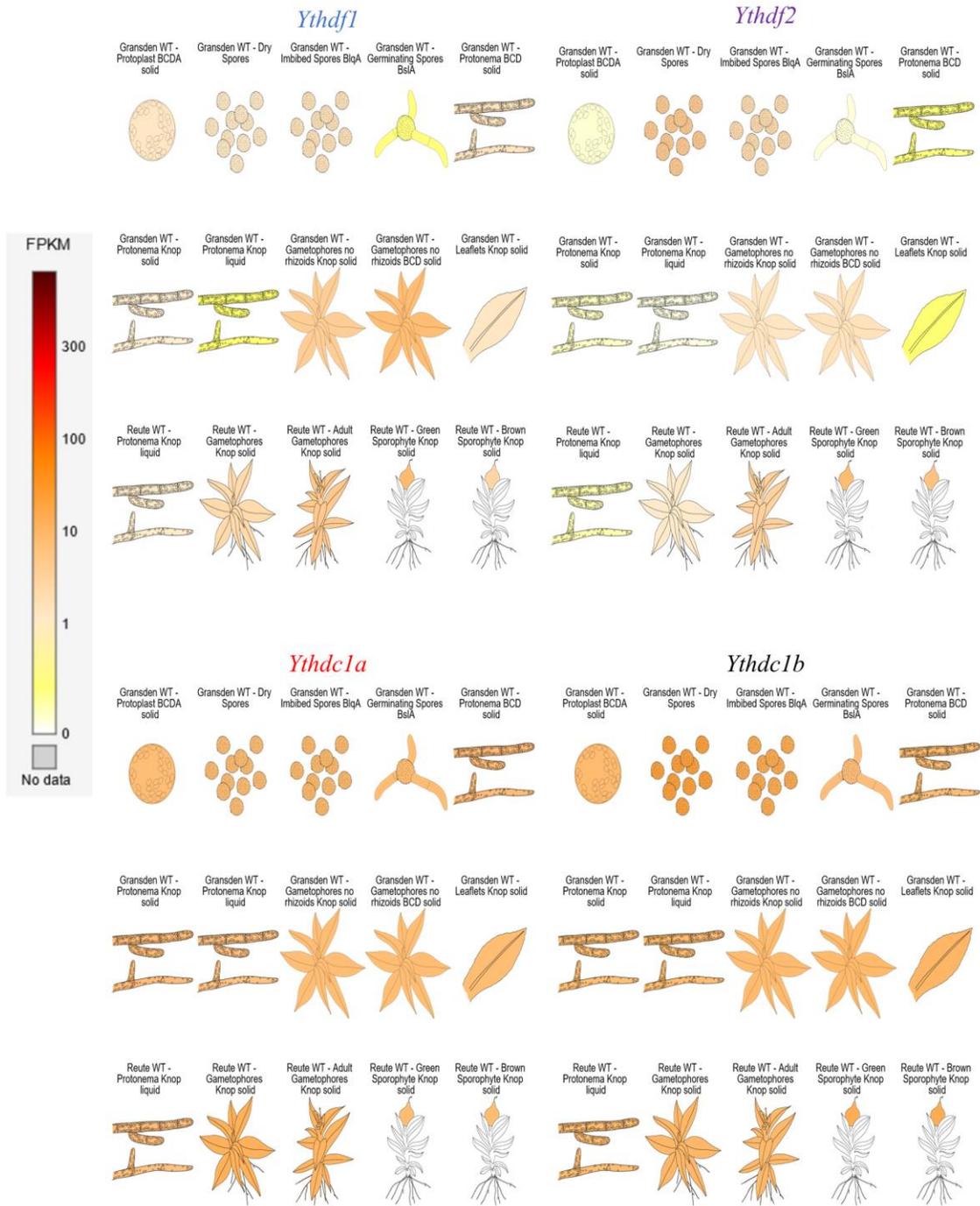


Figura 26. Atlas de expresión de los genes *PpaYth* generados en la plataforma PEATmoss. En este se evidencia que los *PpaYthdc* se acumulan de forma más uniforme a lo largo de todos los estadios del musgo en comparación con los *PpaYthdf*.

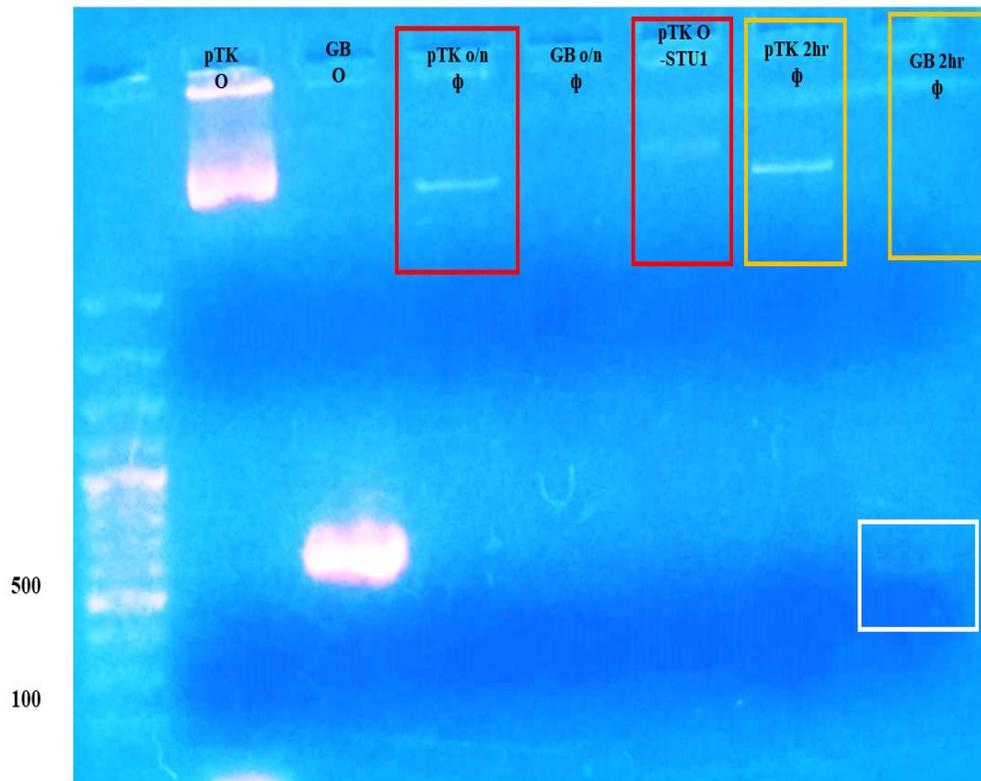


Figura 28. Digestión (con la enzima *StuI*) del vector pTK-UBI-Gate, el gBlock que contiene la construcción del gRNA-GFP. De izquierda a derecha se muestra el vector pTK y la construcción del gBlock, ambos sin digerir; a continuación, se muestran tanto el vector pTK y la construcción del gBlock incubados durante toda la noche (o/n), en este caso no se aprecia el fragmento que corresponde al gBlock digerido. Después, encerrado en rojo se muestra el producto del vector pTK incubado en la reacción de restricción en ausencia de *StuI*. Finalmente, también se probó una reacción de digestión de 2 horas (tal como lo sugiere el fabricante), para ambas construcciones, las cuales muestran ligeros cambios en su tamaño, tal como ocurre con las incubadas toda la noche, señal de la correcta reacción de restricción.

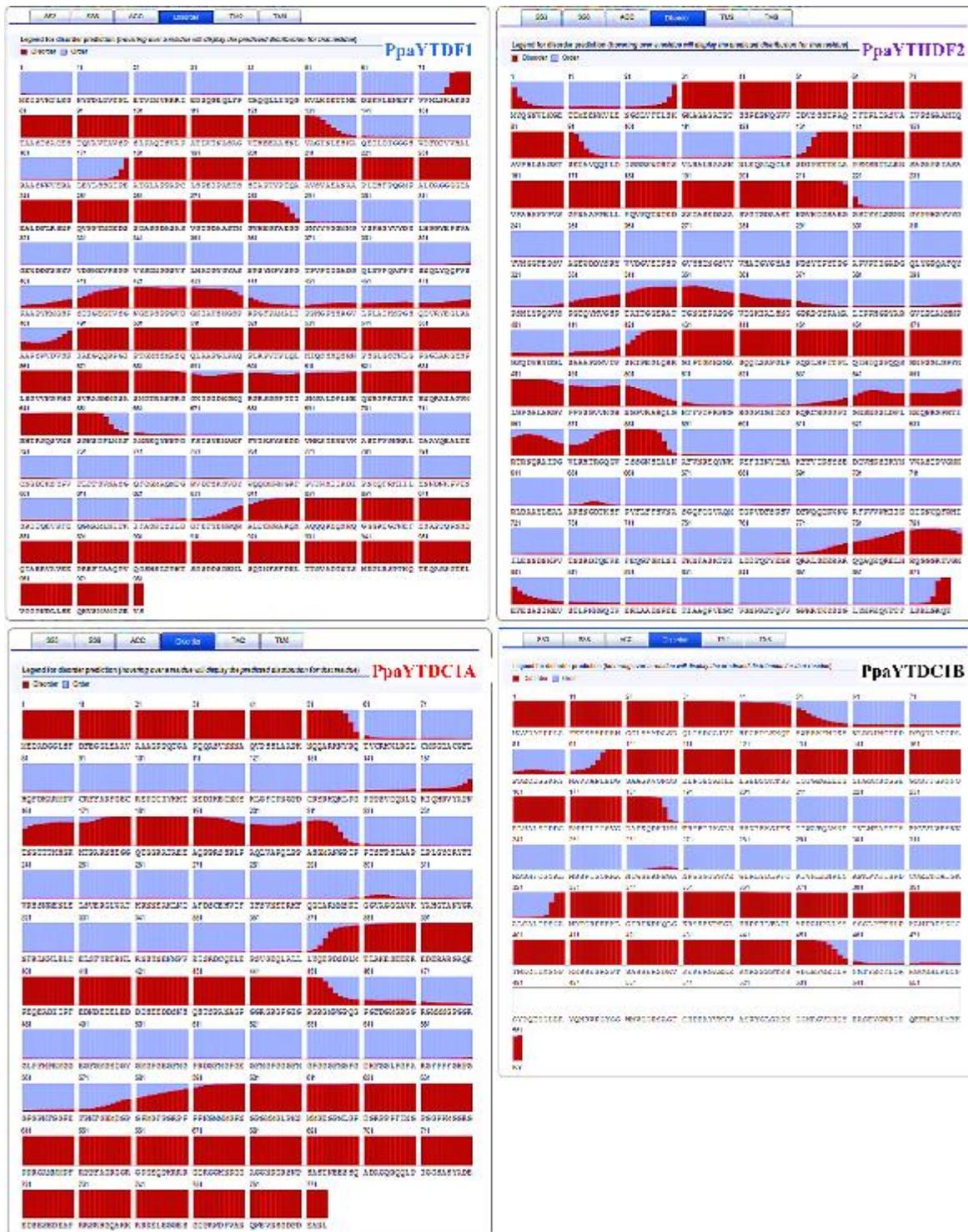


Figura 29. Desorden en la estructura de las PpaYTH. En cada uno de los paneles se muestran las regiones desordenadas en color rojo, mientras los residuos con estructura determinada se presentan en morado. En el panel superior izquierdo se muestra la predicción para PpaYTHDF1 57% de desorden, a la derecha, PpaYTHDF2: 43%.

En el panel inferior izquierdo se presenta PpaYTHDC1A: con un 52% de desorden. Finalmente, a la derecha PpaYTHDC1B: 43% de desorden en su estructura. El análisis se realizó con RaptorX utilizando el método DISOPRED2, el cual utiliza un algoritmo de aprendizaje automático capaz de estimar la probabilidad de que un residuo esté desordenado.