



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**Caracterización de las proteínas cornichon CNIH1 y CNIH2 como receptores
cargo de los transportadores de salida de auxinas PIN en el musgo**

Physcomitrium patens

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR

PRESENTA

M. en C. CAROLINA YÁÑEZ DOMÍNGUEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. OMAR HOMERO PANTOJA AYALA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

COMITÉ TUTOR

DRA. GEORGINA HERNÁNDEZ DELGADO
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

DRA. MARÍA SOLEDAD FUNES ARGÜELLO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

México, Morelos, Cuernavaca, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

RESUMEN

Las proteínas de membrana emplean la vía secretora para alcanzar su membrana de residencia. Este proceso inicia con su síntesis en el retículo endoplásmico para ser empaquetadas en vesículas COPII, y continuar hacia el aparato de Golgi antes de localizarse en su membrana blanco. Los receptores de proteínas “carga” forman parte del complejo COPII, y reclutan a las proteínas cargo para su posterior transporte a lo largo de la vía secretora. Cornichon es uno de los receptores de proteínas cargo, el cual está conservado desde los hongos hasta los vertebrados; sin embargo, está poco caracterizado en las plantas. En este proyecto, se caracterizó el papel de los dos homólogos de cornichon (CNIH1 y CNIH2) en la vía secretora del musgo *Physcomitrium patens*. La caracterización fenotípica en las mutantes reveló que los genes de cornichon no desempeñan un papel redundante sino antagónico al regular diferentes procesos de crecimiento durante la fase gametofítica del musgo. El fenotipo causado por la mutación en el gen *CNIH2* está relacionado con defectos en el transporte de auxina, y funciona como un receptor de cargo específico del transportador de salida de auxinas PINA. El carboxilo terminal del receptor cornichon regula la interacción, el tráfico y la localización de PINA en la membrana.

ABSTRACT

Newly synthesized membrane proteins pass through the secretory pathway, beginning in the endoplasmic reticulum and packaged in COPII vesicles, continuing to the Golgi apparatus before reaching their membrane of residence. Cargo receptor proteins are known to be part of the COPII complex and play a role in the recruitment of cargo proteins for further transport through the secretory pathway. The role of the cargo receptor, cornichon, is conserved from yeast to vertebrates, but poorly characterized in plants. In this project, the role of the two cornichon homologues (CNIH1 y CNIH2) in the secretory pathway of the moss *Physcomitrium patens* was characterized. The phenotypic characterization in the mutants reveals that the cornichon genes play an antagonistic role in regulating different growth processes in the gametophytic phase of the moss. The phenotype caused by the CNIH2 mutation is related to defects in auxin transport. CNIH2 is a cargo-specific receptor for the auxin efflux transporter PINA. The carboxyl terminus of CNIH2 regulates the interaction with PINA, as well as its trafficking, and its localization at the plasma membrane.

AGRADECIMIENTOS

Este Proyecto se realizó en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Omar Pantoja Ayala adscrito a la misma Intitución. Este trabajo obtuvo financiamiento por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT, ahora denominado Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología CONAHCyT, con número de proyecto 2041. Durante mis estudios Doctorales obtuve una beca CONACyT con número de registro 662829. Agradezco al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM.

A mi asesor, el Dr. Omar Pantoja Ayala, por haberme aceptado en su laboratorio para llevar a cabo este proyecto. Gracias por su entusiasmo, su objetividad y dedicación hacia este trabajo, y hacia mi formación como científica, ¡por esos buenos ratos de discusión en torno al proyecto, que me recuerdan el sentido de hacer ciencia! Ante las adversidades que se vivieron, le agradezco por haber depositado su confianza en mí por haber establecido en su laboratorio el estudio del musgo *Physcomitrium patens*.

Le agradezco mucho también, la Dra. Magdalena Bezanilla (Dartmouth College, NH, EE.UU), por haberme aceptado en su laboratorio siempre de la mejor forma posible, le agradezco por permitirme aprender sobre el musgo y por donarme todas las herramientas moleculares para poder desarrollar mi trabajo en México.

También agradezco a la Dra. Soledad Funes (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) y a la Dra. Georgina Hernández (Centro de Ciencias Genómicas, UNAM) quienes fueron parte de mi comité tutorial y siempre estuvieron al pendiente de mi trabajo y mi formación académica.

A mis sinodales la Dra. Alejandra Covarrubias, el Dr. Diego González, el Dr. Roberto Coria, la Dra. Patricia Coello y el Dr. Oscar Flores, por sus valiosos comentarios y enriquecer la discusión de mi trabajo.

A la Dra. Guadalupe Zavala de la Unidad de Microscopia Electrónica, Ibt-UNAM y al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, LNMA, UNAM, por permitirme hacer uso de las instalaciones y equipo.

A mis compañeros de laboratorio con quienes pasé divertidos ratos y otros que me ayudaron durante mis estudios doctorales: Dra. Diana M. Torres, Lic. Iván Rogel, M. en B. Griselle Vásquez Dra. Adriana Garibay, Dra. Delia Narvaéz, Biol. Bryan Mendieta y Guadalupe Muñoz, a mis “otros compañeros” del laboratorio de la Dra. Bezanilla: Dr. Mingqin Chang, Dr. CJ Bascom Jr., Jackie Sullivan, Dra. Xiaohang Cheng, Samantha Ryken y Dra. Shuzon Wu, quienes me hicieron pasar una agradable estancia en el laboratorio.

Al Dr. Daniel Lagunas, mi compañero dentro y fuera del laboratorio, él sabe lo importante que es para mí.

A mis amigos y familia, en especial a mi papás, mi hermana, mi sobrino y cuñado, porque son los que han estado siempre apoyándome incondicionalmente.

CONTENIDO

1. Introducción-----	14
1.1 <i>Physcomitrium patens</i> como organismo modelo para el estudio del tráfico vesicular-----	14-16
1.2 Organización y función del sistema de endomembranas en plantas-----	17-22
1.3 La vía secretoria en las plantas-----	22-24
1.4 El receptor de las proteínas cargo cornichon-----	25-29
1.5 El transporte de auxinas en las plantas-----	29-31
1.6 Trafico vesicular de los transportadores PIN-----	30-33
1.7 Identificación de los transportadores PIN en <i>P. patens</i> -----	34-35
2. Antecedentes-----	36-37
3. Hipótesis-----	38
4. Objetivo general-----	38
4.1 Objetivos particulares-----	38
5. Materiales y Métodos-----	39
5.1 Identificación de los homólogos de cornichon en el musgo-----	39
5.2 Material y cultivo biológico-----	39-40
5.2.1 Obtención de protoplastos y transformación por choque térmico-----	40-41
5.2.2 Análisis morfológico comparativo durante fase gametofítica del musgo <i>P. patens</i> -----	41-42
5.3 Clonación de los genes <i>CNIH1</i> y <i>CNIH2</i> -----	43
5.3.1 Fusiones traduccionales de los homólogos de cornichon a la proteína verde fluorescente EGFP-----	43-46

5.4 Generación y obtención de las mutantes nulas <i>ΔcniH2</i> por recombinación homóloga en el musgo-----	47-51
5.5 Generación y obtención de la mutante <i>cniH1</i> por sistema CRISPR-Cas9 en el musgo-----	52-57
5.6 Generación y obtención de la línea doble mutante de cornichon-----	57
5.7 Generación de líneas transgénicas fluorescentes en el musgo mediante el sistema de CRISPR-Cas9 y Reparación por Homología Dirigida-----	58-64
5.8 Ensayo de la ubiquitina dividida mbSUS en <i>S. cerevisiae</i> para interacción proteína-proteína-----	64-65
5.9 Ensayo de reconstitución estructural de los dos fragmentos de la proteína fluorescente EYFP en células epidérmicas de <i>Nicotiana benthamiana</i> -----	65
5.10 Microscopía confocal-----	65-66
5.11 Desestabilización de la estructura del aparato de Golgi por brefeldina A-----	66-67
5.12 Cambios en la localización subcelular de PINA-EGFP en protonema de musgo y ensayo de complementación-----	67-68
5.13 Expresión transitoria de las proteínas CNIH en protoplastos de <i>P. patens</i> -----	68
5.14 Análisis estadísticos-----	69
6. Resultados-----	70
6.1 Análisis filogenético de las proteínas cornichon de <i>P. patens</i> -----	74-74
6.2 Topología tridimensional de las proteínas CNIH1 y CNIH2-----	74-76
6.3 Localización subcelular de las proteínas CNIH1 y CNIH2-----	77-85
6.4 Obtención de mutantes cornichon-----	86-90

6.5 Los genes <i>CNIH</i> participan en procesos de división celular y ramificación del protonema-----	91-93
6.6 <i>CNIH2</i> está involucrado en la transición temprana del caulonema-----	94-98
6.7 Los genes <i>CNIH</i> son reguladores antagónicos del crecimiento del tallo del gametóforo-----	99-100
6.8 El transportador de salida de auxinas PINA es una proteína cargo de las proteínas CNIH1 y CNIH2 en planta-----	101-102
6.9 El transportador de salida de auxinas PINA interactúa preferencialmente con CNIH2-----	103-105
6.10 Localización subcelular del facilitador de salida de auxinas PINA en el musgo-----	106-108
6.11 Función del carboxilo- terminal de CNIH2 en el musgo-----	109-114
7. Discusión-----	115-120
8. Conclusión-----	121-122
9. Perspectivas-----	124
10 Referencias-----	125-136
11. Tablas suplementarias-----	137-149
12. Anexos-----	150-175

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. El ciclo de vida del musgo *Physcomitrium patens*.

Figura 2. El sistema endomembranal en las células vegetales.

Figura 3. Comparación de la organización del retículo endoplásmico-Golgi en las células de los mamíferos y plantas.

Figura 4. Formación de vesículas del complejo de cubierta II (COPII).

Figura 5. Receptores cargo en *S. cerevisiae*.

Figura 6. Transporte celular de las auxinas.

Figura 7. Trafico vesicular de las proteínas en *A. thaliana*.

Figura 8 Árbol filético de las proteínas PIN del musgo *P. patens*.

Figura 9. Expresión diferencial de los genes *CNIH1* y *CNIH2* en el ciclo de vida de *P. patens*.

Figura 10. Diagrama de flujo para la clonación por recombinación in vitro de 2-fragmentos Gateway.

Figura 11. Clonación por recombinación *in vitro* de 3-fragmentos Gateway.

Figura 12 Vectores Gateway para la edición génica por CRISPR-Cas9 en *P. patens*.

Figura 13. Estrategia de clonación para la inserción de secuencias que codifican para proteínas fluorescentes y codón de paro en el extremo 3' de un gen de interés.

Figura 14. Alineación de secuencias de aminoácidos de proteínas homólogas de cornichon y localización de sitios de fosforilación putativos en homólogos de cornichon en el musgo.

Figura 15. Análisis *in silico* de sitios putativos de fosforilación de las proteínas cornichon del musgo.

Figura 16. Matriz de identidad para las proteínas de cornichon de organismos representativos de plantas, algas y hongos.

Figura 17. Árbol filogenético de homólogos de Cornichon.

Figura 18. Estructura 3D predicha de las proteínas CNIH1 y CNIH2.

Figura 19. Localización subcelular de las proteínas cornichon en el musgo.

Figura 20. Generación de línea CNIH2-3xmRuby por CRISPR-Cas9 & HDR.

Figura 21. CNIH2 se localiza en el ER y en puntos insensibles a BFA.

Figura 22. Generación de la línea SEC23G-3xmNeon por CRISPR-Cas9 & HDR.

Figura 23. CNIH2 se localiza en ERES asociados a SEC23G.

Figura 24. Generación de líneas mutantes *cnih1* por el sistema CRISPR-Cas9.

Figura 25. Generación de mutantes $\Delta cnih2$ y su genotipificación.

Figura 26. Las mutantes de Cornichon tienen defectos en el crecimiento lateral del protonema.

Figura 27. Las mutantes de $\Delta cnih2$ muestran un desarrollo temprano del caulonema en el protonema.

Figura 28. Disminución del contenido de clorofila y observación de cloroplastos del protonema en las líneas mutantes sencillas $\Delta cnih2$.

Figura 29. La mutación de *CNIH2* promueve un desarrollo prematuro en las colonias del musgo.

Figura 30. Los genes *CNIH1* y *CNIH2* participan en el crecimiento del gametóforo.

Figura 31. Interacción proteína-proteína del transportador de salida de auxinas y los receptores cornichon en planta.

Figura 32. La proteína CNIH2 interactúa con mayor afinidad con el transportador PINA.

Figura 33. La proteína CNIH2 es el receptor cargo para el transportador de salida de auxina PINA.

Figura 34. El C-terminal de CNIH2 es importante para la interacción proteína-proteína con PINA

Figura 35. Localización subcelular de la proteína CNIH2 y sus mutantes C-terminal en protoplastos de *P. patens*

Figura 36. El C-terminal de CNIH2 regula el tráfico de PINA en células de protonema.

INDICE DE LAS TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla S1. Las proteínas homologas que forman la vesícula COPII en *S. cerevisiae*, *A. thaliana* y el musgo *P. patens*.

Tabla S2. Los números de copias en *A. thaliana* y *P. patens* de los genes conservados seleccionados que se sabe que codifican para los componentes centrales de la maquinaria de la auxina en las plantas con flores.

Tabla S3. Líneas de los musgos utilizados en este trabajo.

Tabla S4. Las secuencias de los sitios *att* para el sistema multisitio Gateway Pro (Invitrogen, CA, EE. UU.)

Tabla S5. La lista de los oligonucleótidos usados en este trabajo.

Tabla S6. Los homólogos de cornichon en plantas, algas y hongos utilizados en el presente trabajo.

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. El medio de cultivo para el crecimiento rutinario para el musgo (*PpNH4*).

Anexo 2. El medio de regeneración de los protoplastos (PRMB).

Anexo 3. Los reactivos de la transformación para el musgo.

Anexo 4. Los amortiguadores para la transformación del musgo.

Anexo 5. Las soluciones de resuspensión y plaqueo de los protoplastos.

Anexo 6. La fórmula para la transformación de los protoplastos.

Anexo 7. El protocolo de midipreparación para la extracción del plásmido por lisis alcalina.

Anexo 8. La extracción del ARN total por tiocianato de guanidina acida-fenol (trizol para plantas).

Anexo 9. La preparación de las células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10.

Anexo 10. La transformación de las células quimiocompetentes *E. coli* TOP10 por choque térmico.

Anexo 11. La extracción de plásmido por lisis alcalina (miniprep).

Anexo 12. El protocolo Taq polimerasa “phusion NEB” (Biolabs, New England).

Anexo 13. La reacción BP.

Anexo 14. La extracción del ADN genómico del musgo.

Anexo 15. La precipitación con etanol de los fragmentos del plásmido digerido.

Anexo 16. El método para la mutagénesis dirigida.

Anexo 17. Los mapas de plásmidos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Physcomitrium patens* como organismo modelo para el estudio del tráfico vesicular

El musgo *Physcomitrium patens* (antes denominado *Physcomitrella patens*) pertenece al grupo de las briofitas que incluye a los antoceros, musgos y hepáticas, los cuales son organismos que provienen de linajes que divergieron filogenéticamente hace alrededor de 450 millones de años del grupo de las embriofitas o plantas terrestres (McDaniel, 2021; Rensing et al., 2008b). Los estudios filogenéticos indican que las briofitas son un clado hermano de las embriofitas entre las que se encuentran las angiospermas o plantas con flor, haciendo atractivo a este musgo para el estudio evolutivo-comparativo de diversos procesos biológicos que se desarrollaron en las primeras plantas durante el proceso de colonización en ambientes terrestres (Rensing et al., 2008; Reski, 1998).

La disponibilidad de la secuencia del genoma de *P. patens*, el hecho de presentar una fase haploide predominante (gametofito) en su ciclo de vida y de que tiene una alta tasa de recombinación homóloga (HR), han podido identificar y aislar mutantes con mayor facilidad que en otro tipo de plantas. Estas características permiten analizar los fenotipos mutantes, y por lo tanto, la función de genes de interés directamente en la progenie (Kamisugi et al., 2006; Naramoto et al., 2022; Rensing et al., 2008). Debido a su morfología simple también ha permitido la observación directa de los procesos intracelulares implicados en la morfogénesis (Cove et al., 2006; Cove et al., 2009; Naramoto et al., 2022). Finalmente, el musgo se puede cultivar rápidamente en un medio simple que contiene únicamente sales inorgánicas lo cual hacen de *P. patens* un excelente modelo de estudio.

El ciclo de vida de *P. patens* presenta varias fases (Figura 1), la espora haploide da inicio a la formación del primer tejido denominado protonema. El protonema presenta un crecimiento del tipo apical y está compuesto de dos tipos de células claramente diferenciables: el cloronema y el caulonema. Las células del cloronema

presentan gran cantidad de cloroplastos y las divisiones entre dos células son transversales. Este tejido se desarrolla primero, ya que, al inicio, el musgo necesita de energía para su crecimiento por medio de la fotosíntesis. Una vez que tiene suficiente energía para metabolizar, lo cual ocurre en un periodo entre siete a diez días después de la germinación de la espora, se inicia el desarrollo del siguiente tejido que es el caulonema, el cual posee menos cloroplastos, las células son más alargadas, delgadas, y las divisiones celulares son oblicuas (Cove et al., 2006; Rounds y Bezanilla, 2013; Vidali y Bezanilla, 2012). Esta transición ocurre en respuesta a distintas señales ambientales como la luz y los nutrientes, así como a señales hormonales, principalmente las auxinas (Jang y Dolan, 2011; Thelander et al., 2005). Así, los filamentos del protonema se organizan gradualmente, de manera que las células del cloronema se encuentran en la parte basal, mientras que las células del caulonema se van formando a lo largo del filamento hacia la parte apical del protonema. Se ha propuesto que el caulonema tiene una función en la expansión de la colonia del musgo (Thelander et al., 2017). Posteriormente, durante el desarrollo del protonema, a partir de células laterales del caulonema surgen tres células que forman un nodo o brote, el cual va a propiciar la formación del gametóforo, que corresponde a la estructura adulta del musgo en la que se formarán los rizoides (parte basal) y filidios (hojas, parte apical) (Cove et al., 2006; Moody et al., 2018; Vidali y Bezanilla, 2012). En la parte apical del gametóforo, bajo condiciones de temperatura baja (16°C) se desarrollan las estructuras reproductivas: los anteridios y arquegonios (Cove et al., 2009; Kofuji et al., 2009). Los anteridios generan espermatozoides flagelados que, bajo condiciones de humedad adecuada, nadan hacia el arquegonio para fertilizar a la célula huevo. La fusión de los gametos da origen al cigoto diploide, conocido como el esporofito, el cual se asemeja a una estructura de proto-brote relativamente pequeña y conectada al gametóforo. El esporofito consiste en una seta corta, en tanto que el esporangio (cápsula de esporas) es la estructura en la que las células experimentan meiosis para formar esporas haploides unicelulares que se dispersan en el ambiente (Hiss et al., 2017; Kofuji et al., 2009; Manohar Lal y N . N . Bhandari, 2012).

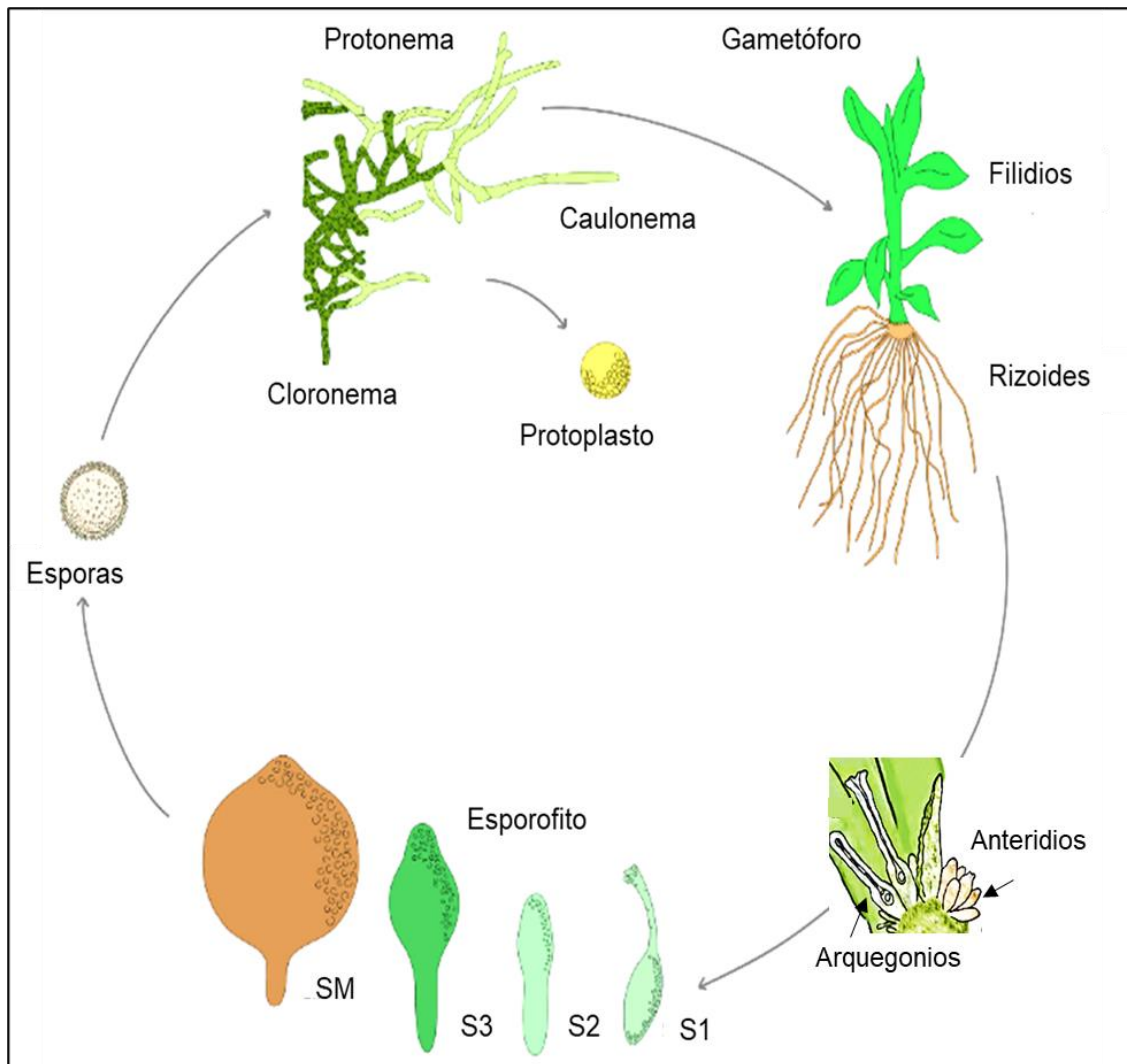


Figura 1. El ciclo de vida del musgo *Physcomitrium patens*. La espora haploide germina y da lugar al protonema compuesto de células del cloronema y caulonema. A partir del protonema se obtienen protoplastos. La siguiente fase adulta ocurre con la formación del gametóforo. Posteriormente se desarrollan las estructuras reproductivas (Arquegonio y Anteridio) en el extremo superior del gametóforo y se fertiliza el arquegonio para dar origen al Esporofito (Fases S1, S2, S3). Finalmente, el esporofito maduro (SM) da lugar a la producción de esporas que después de germinar inicia el ciclo de nuevo. Representación gráfica tomada y modificada de Ramírez-Ortiz y col. 2016(Ortiz-Ramírez et al., 2016).

1.2 La organización y función del sistema de las endomembranas en las plantas

La compartimentación funcional de la célula eucariota requiere el intercambio de proteínas, lípidos y polisacáridos entre los organelos a través de intermediarios de transporte (Morita and Shimada, 2014). El sistema de endomembranas (Figura 2) está inter-relacionado y está integrado por la envoltura nuclear, el retículo endoplásmico (RE), el aparato de Golgi (AG), las vacuolas/lisosomas, los endosomas, la membrana plasmática (PM) y las vesículas (Bonifacino, 2014; Munro, 2004; Yonemura et al., 2016). El tráfico entre las endomembranas cumple una función fundamental al dirigir y entregar correctamente las moléculas hacia los organelos para que puedan realizar sus funciones, y además el intercambio de proteínas y lípidos entre las membranas de los organelos para que mantengan su identidad.(Jürgens, 2004; Randy, 2009).

El sistema de endomembranas está compuesto por muchos organelos, cada uno de los cuales debe mantener una composición única de proteínas de membrana y de proteínas solubles. El tráfico fluye en dos vías principales: el sistema secretor y el sistema endocítico (Figura 2) (Bassham et al., 2008). La vía secretora corresponde a la ruta biosintética principal (la dirección “anterógrada”) que comienza con proteínas recién sintetizadas (solubles y/o de membrana) denominadas “carga”, que se sintetizan en el retículo endoplásmico (RE). Estas proteínas cargo fluyen hacia el aparato de Golgi (AG) y, posteriormente, hacia la membrana plasmática (MP) y/o hacia la matriz extracelular (MEC). Por el contrario, la vía endocítica representa un contraflujo de proteínas endocitadas desde la MP/MEC, y que viajan a través de los endosomas hasta la vacuola (Bassham et al., 2008). Además de estas vías predeterminadas, existen varias vías "mediadas por señales" que redirigen a proteínas específicas de cualquiera de las vías predeterminadas. En tercer lugar, existen las llamadas vías “retrógradas”, que sirven como mecanismos de reciclaje para recuperar material de pasos posteriores en cualquiera de las vías, o sirven para dirigir al material recién sintetizado destinado a la vacuola desde la vía secretora predeterminada

(Bassham et al., 2008). El intercambio de material entre los organelos se lleva a cabo mediante vesículas de transporte. Estas vesículas brotan de un compartimento donante utilizando un sistema complejo y ordenado de proteínas de cubierta que se reclutan en el sitio de formación de vesículas para recolectar a las proteínas cargo y deformar la membrana local hasta que se libera una vesícula por escisión (Bonifacino, 2014; Sato y Nakano, 2007). Una vez libres, estas vesículas viajan a través del citosol en asociación con motores citoesqueléticos u otros factores de acoplamiento. Finalmente, a través de la acción de los factores de acoplamiento y anclaje, así como de algunas proteínas denominadas SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors, por sus siglas en inglés), estas vesículas deben identificar su compartimento blanco entre todas las demás posibilidades, y luego fusionar su bicapa lipídica con la membrana blanco, para entregar su cargo (Bassham et al., 2008; Brandizzi y Barlowe, 2013).

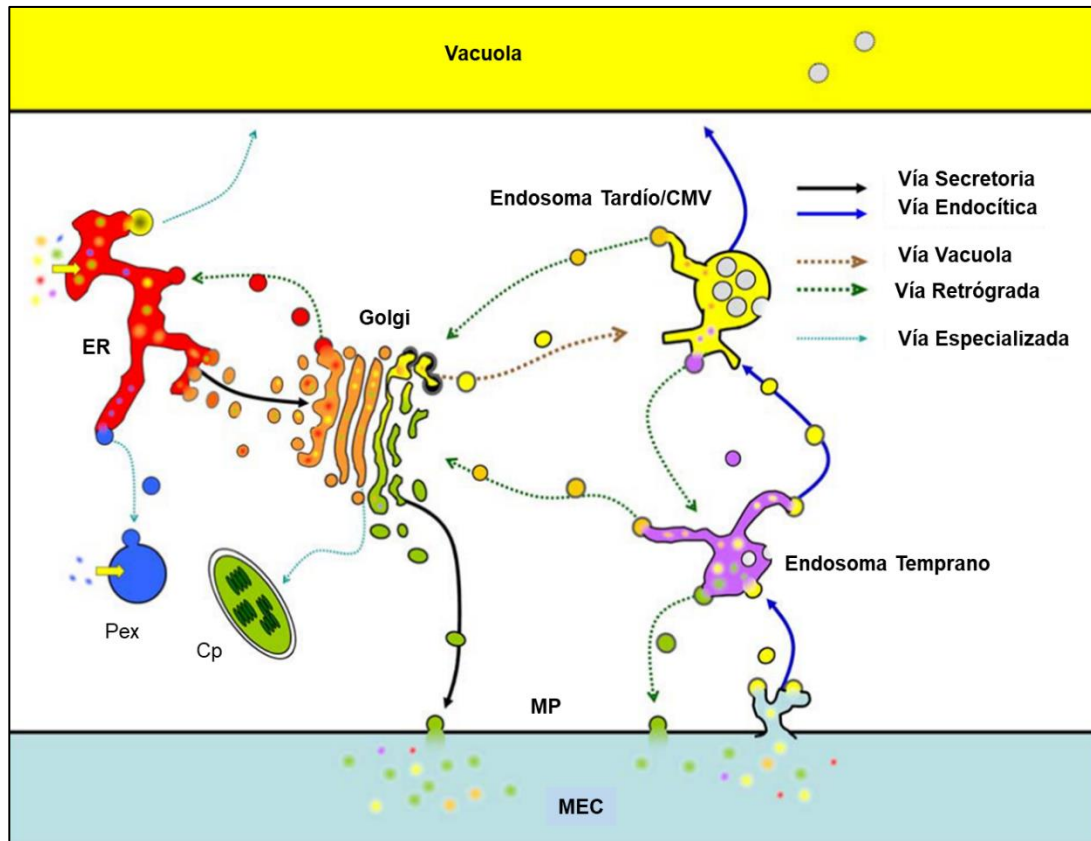


Figura 2. El sistema endomembranal en las células vegetales. Las vías secretoras tradicionales comienzan con la translocación de proteínas (flecha amarilla) hacia el retículo endoplásmico (ER), seguido por el transporte en vesículas al aparato de Golgi (secreción predeterminada, línea negra sólida). Desde el aparato de Golgi, las proteínas secretoras se transportan a la membrana plasmática (MP) o matriz extracelular (MEC, "pared celular"). También en el aparato de Golgi, las proteínas vacuolares se redirigen a la vacuola (a través del endosoma tardío) debido a señales específicas (señales vacuolares, línea marrón discontinua). El cargo que se somete a endocitosis desde el MP/MEC se transporta y fluye a través de los endosomas (endocitosis predeterminada, línea azul sólida), primero a los endosomas tempranos, luego a los endosomas tardíos donde el cargo endocítico se encuentra con el cargo vacuolar, y finalmente el cargo llega a la vacuola. Muchas vías retrógradas mediadas por señales funcionan para reciclar cargo específico en la mayoría de los compartimentos (líneas verdes discontinuas). Finalmente, varias vías de clasificación especializadas sirven para transportar proteínas peroxisomales (Pex) desde el RE hasta los peroxisomas o para transportar algunas proteínas glicosiladas desde el aparato de Golgi hasta el Cloroplasto (Cp) (líneas cian discontinuas). Imagen tomada y modificada de la revisión de Bassham, D y col. 2003(Bassham et al., 2008).

El sistema de endomembranas en las células vegetales comparte muchas características con otros organismos eucariotes, incluida la maquinaria para la formación y fusión de las vesículas, aunque también muestra características organizativas distintas que pueden implicar especializaciones adaptativas en el tráfico de membranas (Figura 3) (Jürgens, 2004; Randy, 2009). Principalmente tiene un papel central en la síntesis y secreción de proteínas y polisacáridos

importantes para la formación de la pared celular (Kim y Brandizzi, 2014). También las endomembranas de las células vegetales participan en la localización de transportadores en la membrana plasmática y tonoplasto que ayudan a los cambios rápidos en el contenido vacuolar y en la composición de la membrana en respuesta a tensiones osmóticas o iónicas, manteniendo la presión de turgencia correcta; Por otro lado, ayudan a organizar la compartimentación *de novo* durante los procesos simbióticos (Drakakaki y Dandekar, 2013; Jürgens, 2004; Morita y Shimada, 2014), así como la formación del fragmoplasto (Smertenko et al., 2017), un compartimento transitorio durante la división celular. Por otro lado, las células vegetales a diferencia de las células animales, no poseen un compartimento intermedio entre el RE-AG denominado ERGIC (Figura 3a-b) (Barlowe y Miller, 2013), y se ha estimado que poseen cientos de cisternas de Golgi (Figura 3c-d) (Saint-Jore et al., 2002). Cada cisterna del Golgi es morfológicamente distinta desde el lado cis al trans, seguidas de una red trans-Golgi (TGN, Trans Golgi Network, del inglés), que a menudo es menos extensa que en las células animales. Las cisternas del Golgi son muy móviles y parecen asociarse con la red del retículo endoplásmico (Brandizzi y Barlowe, 2013; Robinson et al., 2007).

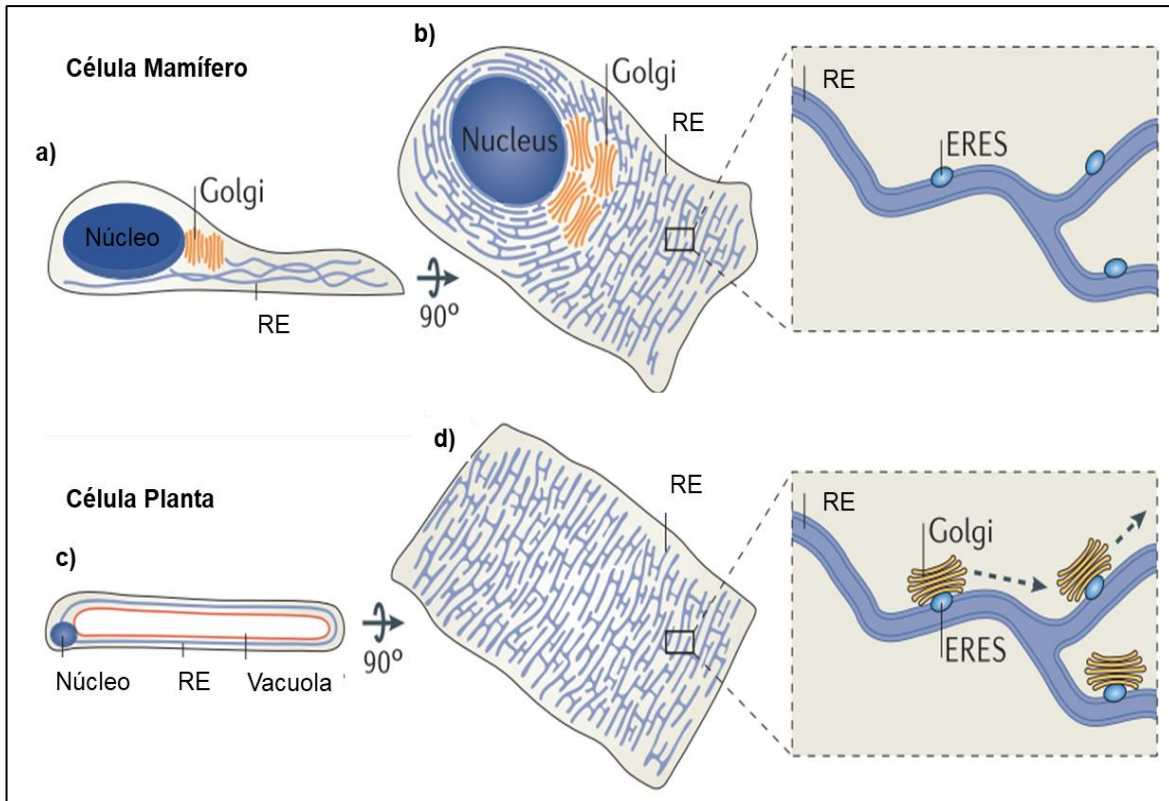


Figura 3. Comparación de la organización del retículo endoplásmico-Golgi en las células de los mamíferos y plantas. Esquema de vista lateral (a) o vista directa (b) de una célula de mamífero cultivada, que muestra el posicionamiento relativo del núcleo, la red del retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi. El recuadro muestra la distribución de los sitios de salida del RE (ERES, ER exit Sites, del inglés), que se encuentran dispersos en la red del RE citoplásmico y se concentran en las regiones cercanas al Golgi. Esquema de vista lateral (c) de una célula vegetal que muestra que el RE está intercalado entre el tonoplasto y la membrana plasmática. (d) Esquema que ilustra la distribución de la red del RE en la región cortical de una célula vegetal. El recuadro representa la organización del RE, ERES y los complejos de Golgi estrechamente asociados; la movilidad de las cisternas del Golgi está indicada por las flechas discontinuas. Imagen tomada y modificada de Brandizzi, F. & Barlowe, C., 2010 (Brandizzi y Barlowe, 2013).

Durante los últimos 30 años se ha logrado un progreso notable en el análisis del tráfico de membranas vegetales utilizando diferentes sistemas y diversos enfoques. Principalmente, se ha aprovechado el uso de la microscopía electrónica, así como el uso de las proteínas fluorescentes para visualizar los compartimentos endomembranales (Brandizzi et al., 2002). Dichos estudios a menudo se han realizado en las células de la hoja de tabaco (*Nicotiana benthamiana*), en cultivos celulares o en los protoplastos de las células de las hojas de *Arabidopsis thaliana*.

En estos sistemas se han expresado genes de interés transitoriamente y muchas veces heterológamente, lo cual, incluyendo las pocas herramientas moleculares y bioquímicas en plantas, dificulta el avance para caracterizar la función de las proteínas involucradas en el tráfico vesicular (Brandizzi et al., 2002; Robinson et al., 2007; Robinson et al., 2015). Análisis genéticos comparativos, demuestran que la mayoría de los componentes del tráfico vesicular han experimentado una expansión génica en las plantas, por lo que es común encontrar la presencia de múltiples parálogos; utilizando la genética clásica o la genética reversa para obtener mutantes de *Arabidopsis*, se ha demostrado que estos genes parálogos tienen una función conservada en el tráfico vesicular, sin embargo, algunas de las isoformas se han ido especializando en procesos biológicos del tráfico vesicular que ocasionan defectos en el desarrollo de la planta. (Bassham et al., 2008; Chung et al., 2016).

1.3 La vía secretoria en plantas

Muchas proteínas recién sintetizadas, que están destinadas hacia la membrana o que se secretan por la célula, siguen la ruta secretoria a través del RE, son empaquetadas por vesículas del complejo de proteína de cubierta II denominadas COPII (vesículas COPII), y luego entregadas al AG (Figura 4A) (Barlowe y Miller, 2013; Brandizzi y Barlowe, 2013). Las vesículas COPII se forman a partir de la activación de la GTPasa pequeña Sar1, realizada por el intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) Sec12; esto ocasiona que Sar1-GTP cambie su conformación y deje expuesto un motivo hidrofóbico que se ancla a la membrana del retículo endoplásmico (Figura 4A, i), lo cual induce una curvatura de la membrana y al reclutamiento de las proteínas Sec23-Sec24 que forman un dímero y consecuentemente, la capa interna de la vesícula COPII (Sato y Nakano, 2007). El reclutamiento de las proteínas cargo solubles, y algunas de membrana a la vesícula COPII, se lleva a cabo por la proteína Sec24, la cual actúa como un receptor de proteínas cargo (Figura 4A, ii) (Barlowe y Miller, 2013; Pagant et al., 2015). Posteriormente, las proteínas Sec13 y Sec31 forman un heterotetrámero y se unen al complejo para formar la capa externa de la vesícula COPII (Figura 4A,

iii) (Sato y Nakano, 2007). Una vez que los elementos se reclutan junto con las proteínas cargo, la vesícula COPII brota del RE para fusionarse con el AG (Figura 4A, iv). En las plantas, el sistema COPII también está presente (Chung et al., 2016) (*Ver Tabla Suplementaria 1*), los pocos reportes existentes muestran que tienen una función conservada, como en los hongos y los animales. Quizás lo más importante de resaltar sobre este complejo, es que aún sigue en debate la existencia de las vesículas COPII debido a que rara vez se han visto estructuras similares a vesículas, y en ocasiones se ha observado la formación de túbulos COPII que conectan el RE y Golgi. Parece ser que la formación de éstos túbulos depende de varios factores como el tipo celular, el tipo de organismo y el tipo de proteína cargo que se necesita para empaquetarse en este complejo COPII (Figura 4B). (Robinson et al., 2015). Recientemente, en las células animales utilizando la técnica de Cryo-EM, se demostró. que el transporte de RE-AG se lleva a cabo por la formación de túbulos, en los cuales, el complejo COPII recluta a las proteínas cargo y se encarga de formar un anillo estático del lado del RE, mientras que el complejo COPI se encarga de llevar a las proteínas cargo moviéndose sobre este túbulo para fusionarse con el AG y entregar las proteínas cargo (Weigel et al., 2021).

En el musgo *P. patens* recientemente se han identificado siete genes homólogos tanto de Sec24 como de Sec23, respectivamente. Las proteínas Sec24 y Sec23 se localizan en los sitios de salida del RE (ERES, por sus siglas en inglés), de estos, solo las isoformas Sec24C/D y Sec23D/E son indispensables para el crecimiento polarizado del protonema. En tanto que Sec23D/E median el tráfico del RE-AG; en contraste Sec23 A, B, C, F y G no se requieren para el crecimiento polarizado del protonema ya que la mutante quintuple logra crecer relativamente similar al musgo silvestre y no se observan defectos en el tráfico de RE-AG, sin embargo en esta mutante quintuple la secreción de las proteínas de la membrana plasmática se ven afectadas, por lo que se ha propuesto que las isoformas Sec23D/E son parte de un complejo COPII “canónico” en el musgo, mientras que el resto de las isoformas Sec23 se ha diversificado, formando probablemente otro tipo de ERES involucradas en vías de tráfico independiente del Golgi (Chang et al., 2022).

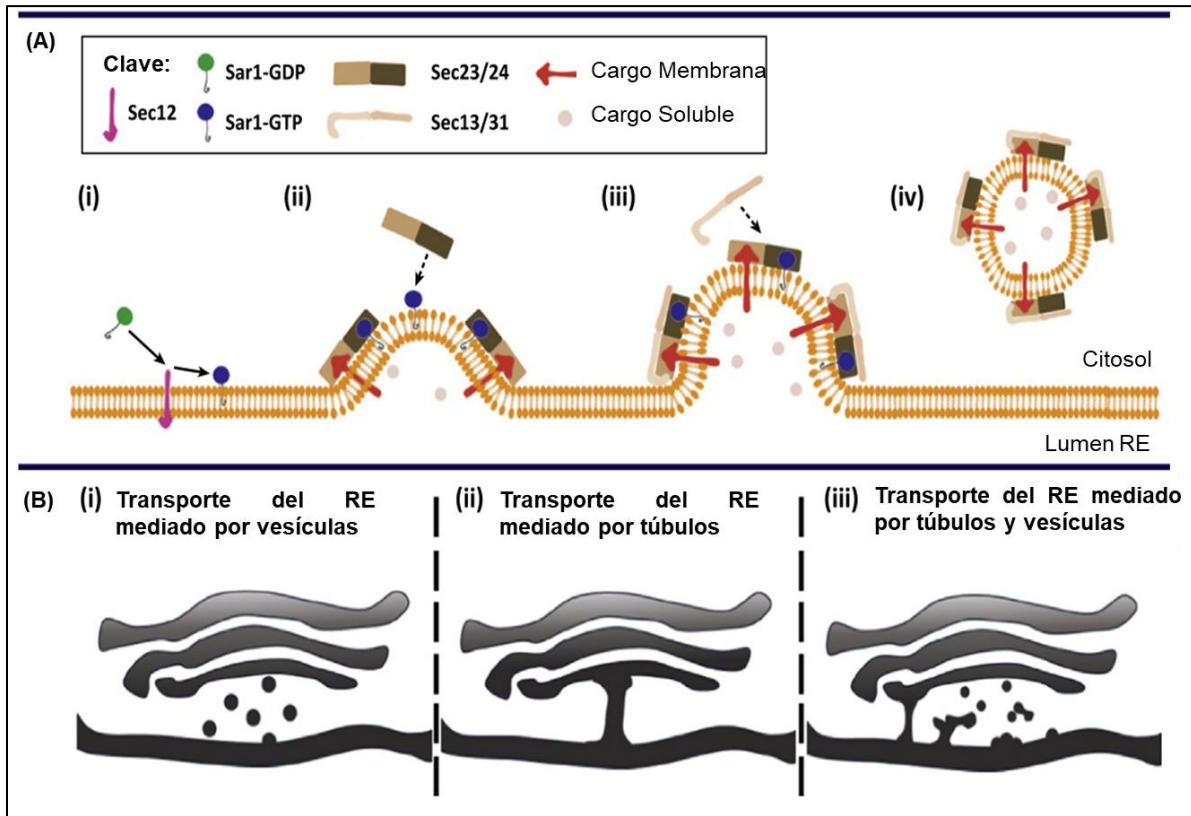


Figura 4. Formación de vesículas del complejo de cubierta II (COPII). **A)** Modelo de formación de las vesículas COPII en *S. cerevisiae*. **(i)** Conversión de la proteína 1 (Sar1)-GDP relacionada con Ras en Sar1-GTP por el factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) Sec12 (flecha), seguido del reclutamiento en el RE de Sar1 activado; **(ii)** reclutamiento del complejo de la capa interna Sec23–24 (flecha discontinua) y captura de proteínas cargo; **(iii)** reclutamiento del complejo de la cubierta externa Sec13–31 (flecha discontinua) estimula la actividad de la proteína activadora de GTPasa (GAP) de Sec23; **(iv)** brotación de las vesículas COPII con proteínas cargo del RE. **(B)** Modelos de exportación de las proteínas del RE en plantas. **(i)** Las vesículas COPII libres que contienen proteínas cargo brotan del RE y viajan a través del RE-Golgi, fusionándose finalmente con el Golgi; **(ii)** formación de túbulos mediada por COPII que conectan el RE y el aparato de Golgi que permiten el transporte anterógrado de las proteínas cargo directamente; **(iii)** tanto los túbulos como las vesículas operan en la interfaz RE-Golgi, mediando la exportación de RE en condiciones específicas (fisiológicas y ambientales). Esquemas tomados y modificados de Chung, K.P y col. 2016 (Chung et al., 2016).

1.4 El receptor de las proteínas cargo cornichon

Adicionalmente a la función de Sec24 como “receptor de proteínas cargo” (RC), existen otras proteínas residentes del RE que actúan como RC. En *S. cerevisiae* y las células animales se han identificado varios RC como ERGIC-53, p24 y proteínas Erv (Figura 5). Las células que carecen de estos receptores generalmente muestran defectos en la secreción selectiva de las proteínas cargo, por lo que son transportadas de manera ineficiente desde el RE; estos RC se mueven dinámicamente entre el RE-AG debido a las señales de reconocimiento específicas. Dentro de las proteínas Erv, se encuentra Erv14 que pertenece a una familia denominada Cornichon (Dancourt y Barlowe, 2010).

El receptor Cornichon (Cni) fue identificada inicialmente en *Drosophila melanogaster* la mosca de la fruta. Durante la ovogénesis, este RC se requiere para el tráfico celular del factor de crecimiento alfa (TGF) Gurken (Grk) hacia la membrana del ovocito, por lo que se ha propuesto que el Cni actúa como un receptor cargo, reclutando a Grk dentro de las vesículas COPII (Bökel et al., 2006; Castro et al., 2007). En *C. elegans* existe un solo homólogo y en reportes recientes se ha comprobado su interacción con los receptores tipo AMPA (AMPAr) (Brockie et al., 2013). En el humano se han identificado cuatro proteínas Cornichon (CNIH1, CNIH2, CNIH3 y CNIH4), de las cuales tres de ellas se han estudiado. Los CNIH1, CNIH2 y CNIH3 interactúan también con los receptores tipo AMPA (AMPAr), sin embargo, estas proteínas cornichon no solamente regulan la salida de los AMPAr del RE y su posterior localización en la MP, sino que también son una subunidad auxiliar regulatoria de la actividad de estos receptores (Nakagawa, 2019; Shanks et al., 2014; Shi et al., 2010). Para CNIH4 se ha demostrado que no interacciona con los AMPAr sino con los receptores acoplados a proteína G (GPCR) (Sauvageau et al., 2014).

En *S. cerevisiae* existe un homólogo llamado Erv14p. La pérdida de Erv14p, causa la formación de un sitio defectuoso de gemación debido al transporte ineficiente de la proteína Axl2p, necesaria para este proceso (Powers y Barlowe, 1998; Powers y Barlowe, 2002). Por otro lado, en estudios masivos en *S. cerevisiae*, se ha

encontrado que Erv14 es responsable del tráfico del 32% de los transportadores de membrana (Herzig et al., 2012). En el laboratorio del Dr. Omar Pantoja (Instituto de Biotecnología, UNAM) se han identificado y analizado varios cargos de Erv14 como el transportador Na^+/H^+ Nha1p (Rosas-Santiago et al., 2016), el transportador ABC Pdr12p y al antiportador droga/ H^+ Qdr2p. (Yáñez Domínguez, 2017).

Al parecer, la función del cornichon como RC y su localización subcelular se ha conservado desde hongos hasta vertebrados, lo que se sugiere que juegan una función análoga en estos organismos como es el reclutamiento de proteínas cargo de membrana y su posterior transporte a través de la ruta secretoria (Castro et al., 2007; Dancourt y Barlowe, 2010; Herzig et al., 2012).

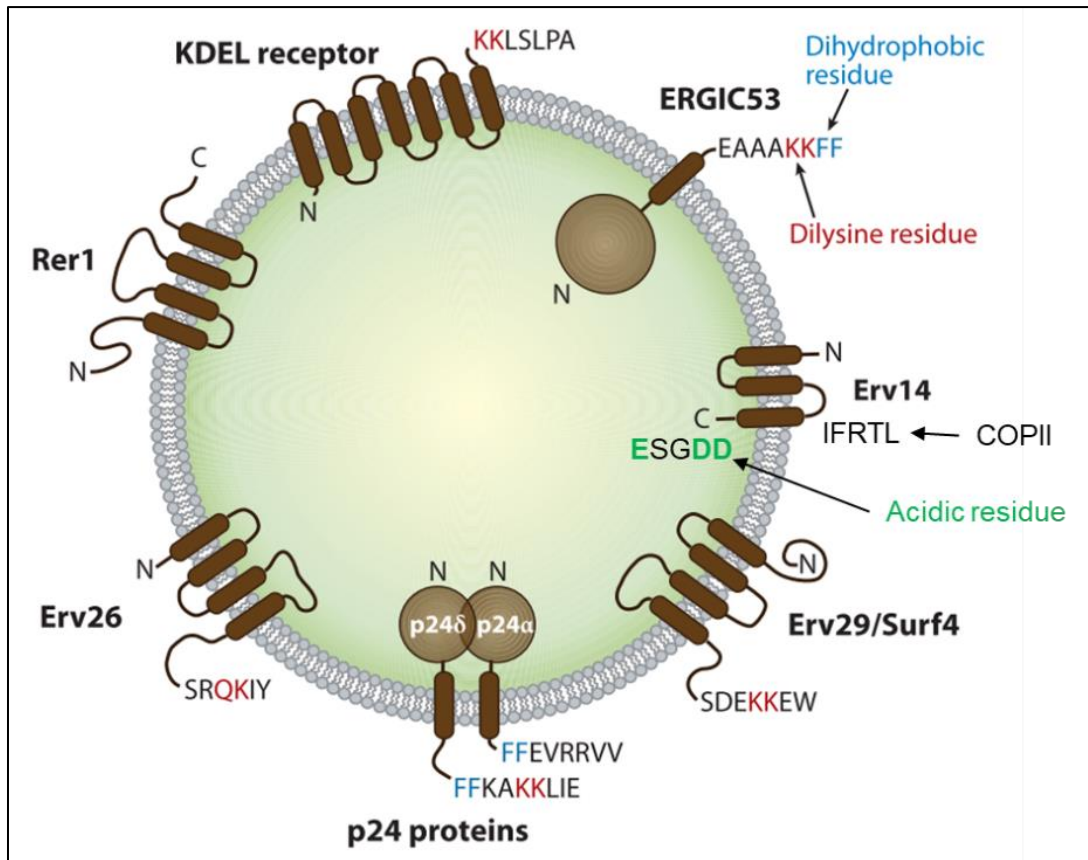


Figura 5. Receptores carga en *S. cerevisiae*. Modelo que muestra estructuras y topologías de membrana de RC en la vía secretora temprana. Se indican el N-terminal y el C-terminal. ERGIC-53, Erv14p, Erv29p, Erv26p y las proteínas p24 actúan en el transporte anterógrado de proteínas secretoras del RE. El receptor KDEL y Rer1p actúan en el transporte retrógrado de proteínas desde los compartimentos de Golgi al RE. Sin embargo, estos RC circulan entre los compartimentos RE y Golgi en vesículas intermedias formadas por los complejos COPI y COPII. Las secuencias de aminoácidos de los C-terminales de proteínas humanas se muestran para RC en los que se han identificado señales de selección. Los residuos de di-lisina están implicados en el transporte retrógrado dependiente de COPI, mientras que los residuos di-hidrofóbicos están implicados en la exportación dependiente de COPII desde el RE. Surf4 de los mamíferos es homólogo de Erv29p en *S. cerevisiae*. En Erv14, el motivo IFRTL es un motivo de interacción con COPII en el asa citoplásmica, mientras que los residuos ácidos en el C-terminal son sitios de interacción con las proteínas carga. Imagen tomada y modificada de Dancourt, J. & Barlowe, C. 2010 (Dancourt and Barlowe, 2010).

La familia de proteínas cornichon también se encuentra muy bien conservada en las plantas, pero la función que pueda tener en estos organismos ha sido poco estudiada. En nuestro grupo se ha identificado que el arroz (*Oryza sativa*) expresa dos proteínas homólogas que se denominan OsCNIH1 y OsCNIH2. La localización de OsCNIH1 se encuentra oscilando entre el RE y el AG. Usando sistemas de

expresión heteróloga, se observó que el transportador de Na⁺ OsHKT1;3 interactúa directamente con OsCNIH1, lo que se sugiere que OsCNIH1 funciona como posible receptor cargo del transportador OsHKT1 (Rosas-Santiago et al., 2015).

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado cinco homólogos de la proteína cornichon denominadas AtCNIH1, AtCNIH2, AtCNIH3, AtCNIH4 y AtCNIH5. Hasta la fecha no se ha reportado un fenotipo evidente en las mutantes de cornichon en *Arabidopsis*, solo se ha reportado que las mutantes sencillas $\Delta cni1$ y $\Delta cni4$ y la mutante doble $\Delta cni1/cni4$ muestran flujos reducidos de calcio (Ca²⁺) en la punta del tubo polínico; sin embargo, el crecimiento del tubo polínico en las mutantes es igual al de la cepa silvestre (Wudick et al., 2018). Cuatro de las proteínas cornichon se localizaron en endomembranas y en estructuras punteadas que co-localizan con el marcador de ERES AtSec24. Ciertas proteínas integrales de la membrana plasmática como lo son los canales iónicos AtGLR2.2 y AtGLR3.3 son proteínas cargo para AtCNIH1 y AtCNIH4, pero no para otras proteínas ya sean solubles o unidas a la membrana, lo que sugiere un tipo de cargo específico para estos RC. Ensayos de complementación funcional en *S. cerevisiae*, muestran que solo los AtCNIH1, AtCNIH3 y AtCNIH4 realizan la función de su homólogo Erv14p (Wudick et al., 2018). Por otra parte, plantas crecidas en deficiencia de fosfato inorgánico ocasionan un aumento en la expresión de AtCNIH5 así como varios transportadores de fosfato de la membrana plasmática pertenecientes a las familias PHT y PHO, lo que sugiere que AtCNIH5 pueda estar involucrado en el tráfico vesicular de estas proteínas (Müller et al., 2007).

Datos de un interactoma de proteínas de membrana, provenientes de plántulas de *Arabidopsis* (base de datos del *Arabidopsis* Membrane-based Interactome Network

Database, <https://associomics.dpb.carnegiescience.edu/Associomics/MIND.html>) (Jones et al., 2014), muestran que 532 proteínas, de las cuales 30% de estas proteínas son transportadores de membrana plasmática, interactúan con AtCNIH1, (Rosas-Santiago et al., 2015). Este análisis mostró que AtCNIH1 interactúa con un

transportador *AtPIN4*, el cual se ha involucrado en mantener y establecer los gradientes de auxinas durante la formación de la raíz. *AtPIN4* se expresa en el centro quiescente (CQ) y en las células circundantes de los meristemas de las raíces maduras y en desarrollo, con una localización polarizada (Friml et al., 2002). En mutantes de *Atpin4*, la distribución de auxinas se altera de tal forma que los elevados niveles de auxinas se desplazan desde las células iniciales de la columela hacia la parte superior, a un dominio más amplio y difuso que abarca el CQ y las células iniciales vasculares, fenotipo que es similar en raíces de tipo silvestre tratadas con inhibidores del transporte de auxina (Friml et al., 2002).

1.5 El transporte de auxinas en las plantas

El ácido indol-acético (IAA) es una fitohormona o auxina que regula varios aspectos del desarrollo en las plantas; a nivel celular, las auxinas tienen un papel importante en procesos de división, elongación y diferenciación celular. La distribución de auxinas en los tejidos y las células de las plantas, se distribuyen de manera diferencial, creando un gradiente de concentración de auxina dentro de la célula, así como a través de los tejidos, ocasionando de esta manera cambios morfogénéticos ante diversas señales (Garay-Arroyo et al., 2014). Además del metabolismo, el mayor determinante de la distribución diferencial de auxinas entre una célula y otra, es su transporte (Blakeslee et al., 2005; Kleine-Vehn et al., 2010; Petrasek y Friml, 2009).

Las auxinas son transportadas polarmente de una célula a otra por un proceso quimiosmótico; al ser un ácido débil (pKa 4.75), en el apoplasto (pH 5.3-5.6) el IAA se encuentra en dos formas tanto en su forma protonada (IAAH) como en su forma desprotonada o aniónica (IAA^-), lo cual permite que su absorción ocurra tanto por difusión lipofílica como por transporte activo dependiendo del pH (Blakeslee et al., 2005; Petrasek and Friml, 2009). De acuerdo con el modelo quimiosmótico, el transporte de auxinas en las plantas a un pH bajo (menor a 5) se encuentra principalmente la forma protonada en el apoplasto, por lo que difundiría con mayor

facilidad hacia el interior de la célula, sin embargo debido que el espacio extracelular en plantas tiene un pH entre 5.3-5.6, las auxinas están predominantemente en su forma desprotonada, por lo que se necesita que esta forma aniónica sea transportada hacia el interior por medio de transportadores secundarios (Yang et al., 2006). Estos transportadores pertenecen a una familia de permeasas de aminoácidos/auxinas (AAP, por sus siglas en inglés), mejor conocidas como AUX/LAX (“AUXIN1 and LIKE-AUXIN1”). En Arabidopsis, estas proteínas se componen por: AUX1, LAX2, LAX3 y LAX4 (Péret et al., 2012; Young et al., 1999). Los transportadores AUX/LAX actúan como simportadores gracias al gradiente de protones generado por la H⁺-ATPasa de la membrana (Blakeslee et al., 2005).

Una vez en el citoplasma (pH 7.0), el IAA se encuentra casi exclusivamente en su forma aniónica, por lo cual se requiere la participación de proteínas que medien su transporte hacia afuera de la célula (Blakeslee et al., 2005; Petrusek y Friml, 2009). El movimiento intercelular de IAA⁻ depende del transporte polar de auxinas que se conoce como PAT, (**P**olar **A**uxin **T**ransport), mediado por transportadores PIN (PIN-FORMED) y ABCB (ATP-Binding Cassete B) que promueven la salida de esta fitohormona (Figura 6). (Blakeslee et al., 2005; Cho y Cho, 2013; Grunewald y Friml, 2010; Kleine-Vehn et al., 2006; Petrusek y Friml, 2009; Titapiwatanakun et al., 2009; Yang y Murphy, 2009; Yang et al., 2006; Zazimalová et al., 2010). En cuanto a los transportadores de salida PIN, se ha propuesto que su localización subcelular asimétrica (polarizada) permite el flujo de auxinas de una célula a otra y a través de los tejidos (Grunewald y Friml, 2010; Kania et al., 2014).

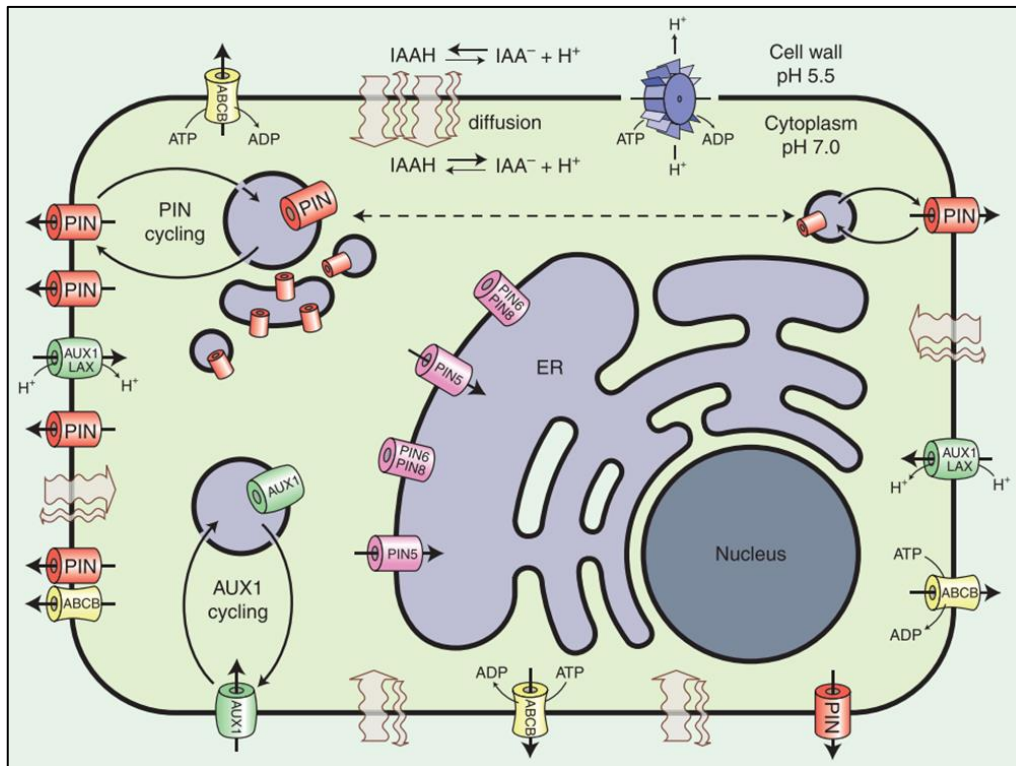


Figura 6. Transporte celular de las auxinas. Las proteínas transportadoras de salida PIN marcadas en rojo representan PIN "largos" (PIN1, 2, 3, 4 y 7), mientras que los PIN marcados en rosa representan PIN "cortos" (PIN5, 6 y 8). ER marca el retículo endoplásmico, las estructuras de color gris pálido representan ER y endosomas, las flechas completas en negrita curvadas muestran el ciclo de proteínas constitutivas y las flechas discontinuas simbolizan el proceso de transcitosis. Las flechas onduladas anchas indican un flujo de auxina mayor hacia el interior de la célula por difusión y las flechas onduladas delgadas indican un flujo de auxina menor hacia el exterior por difusión. La ATPasa de la membrana plasmática genera un gradiente de protones que permite la entrada de auxina a través de los simportadores AUX/LAX y a su vez bombeando protones fuera de la célula para mantener un equilibrio quimiosmótico. Se sugiere una posible interacción entre ABCB y PIN para la regulación de la actividad de los PIN. Imagen tomada de Zazimalová, E. et al. 2010 (Zazimalová et al., 2010).

1.6 Tráfico vesicular de los transportadores PIN

La regulación del transporte de auxinas en *A. thaliana* está principalmente bajo el control de mecanismos de tráfico celular, por lo cual, se ha establecido que la localización y mantenimiento polar de las proteínas PIN en la membrana plasmática está principalmente bajo el control de la endocitosis, el reciclaje polar y la restricción de la difusión lateral (Figura 7) (Dhonukshe et al., 2007; Kania et al., 2014; Kleine-Vehn et al., 2008). Se ha demostrado que las proteínas PIN se

internalizan a través de la endocitosis mediada por vesículas de clatrina y pueden volver a la membrana plasmática a través de distintas rutas de tráfico que involucran la Red Trans-Golgi (TGN) y los Endosomas Tempranos (EE) (Dhonukshe et al., 2007; Kitakura et al., 2011). Una de estas vías está mediada principalmente por el factor de ribosilación del ADP sensible al inhibidor brefeldina A (BFA) y el factor de intercambio de nucleótidos de guanina (ARF-GEF) denominado GNOM (Geldner et al., 2003; Steinmann et al., 1999). También existen otras vías independientes de GNOM que involucran otros ARF-GEFs como GNOM-LIKE1 (GNL1) (Teh y Moore, 2007) y BFA-Visualized Endocytic Trafficking Defective 1 (BEN1) (Tanaka et al., 2009). También se ha reportado que la GTPasa del tipo Rab, BEX5/RABA1B, así como el intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) de la proteína Rab GTPasa “VAN4” (Feraru et al., 2012; Naramoto et al., 2014), juegan un papel importante en la localización y polaridad de las proteínas PIN.

Por otro lado, el tráfico celular de algunas proteínas PIN también puede estar mediado por la vía de degradación hacia la vacuola, por lo que las proteínas PIN llegan a ser degradadas, o pueden tomar una vía alternativa hacia la membrana plasmática que involucra la formación del compartimento prevacuolar (PVC), por los cuales las proteínas PIN pueden ser transportadas hacia el TGN y de ahí hacia la MP (Grunewald y Friml, 2010; Kitakura et al., 2011; Naramoto et al., 2014). Esta vía está mediada por el retrómero que forma una capa en la cara citosólica de los endosomas, en particular las subunidades SORTING NEXIN 1 (SNX1) y VACUOLAR PROTEIN SORTING 29 (VPS29), las cuales se requieren para el reciclaje y el tráfico intracelular de las/los PIN (Jaillais et al., 2006). Recientemente, se ha demostrado que la pérdida de las subunidades del exocisto, EXO70A1 o SEC8, también participan en el control de las proteínas PIN hacia la MP y su posterior polaridad (Drdová et al., 2013). Además de estos mecanismos de tráfico, existe poca información sobre la contribución de los primeros pasos de la vía secretora involucrada específicamente en el procesamiento y tráfico de las proteínas PIN sintetizadas *de novo* (Kania et al., 2014).

La localización del transportador AUX1 también está mediada por otro tipo de proteína ARF-GEF que se encuentran en el RE, denominada AUXR4, que es importante para que AUX1 salga del RE y llegue a la membrana plasmática (Dharmasiri et al., 2006). Otro caso similar es la participación del intercambiador de nucleótidos de guanina GNOM-Like 1 (GNL1) y la proteína TWD1/FKBP4228 que se localizan en el RE, y son necesarios para la correcta localización de los transportadores ABCB (Wu et al., 2010). Cabe mencionar que la ausencia de algunas de estas proteínas no altera la localización de los transportadores PIN1 y PIN2, por lo que se propone que existen otras proteínas mediadoras de su tráfico del RE al Aparato de Golgi (AG) que no se han caracterizado en las plantas.

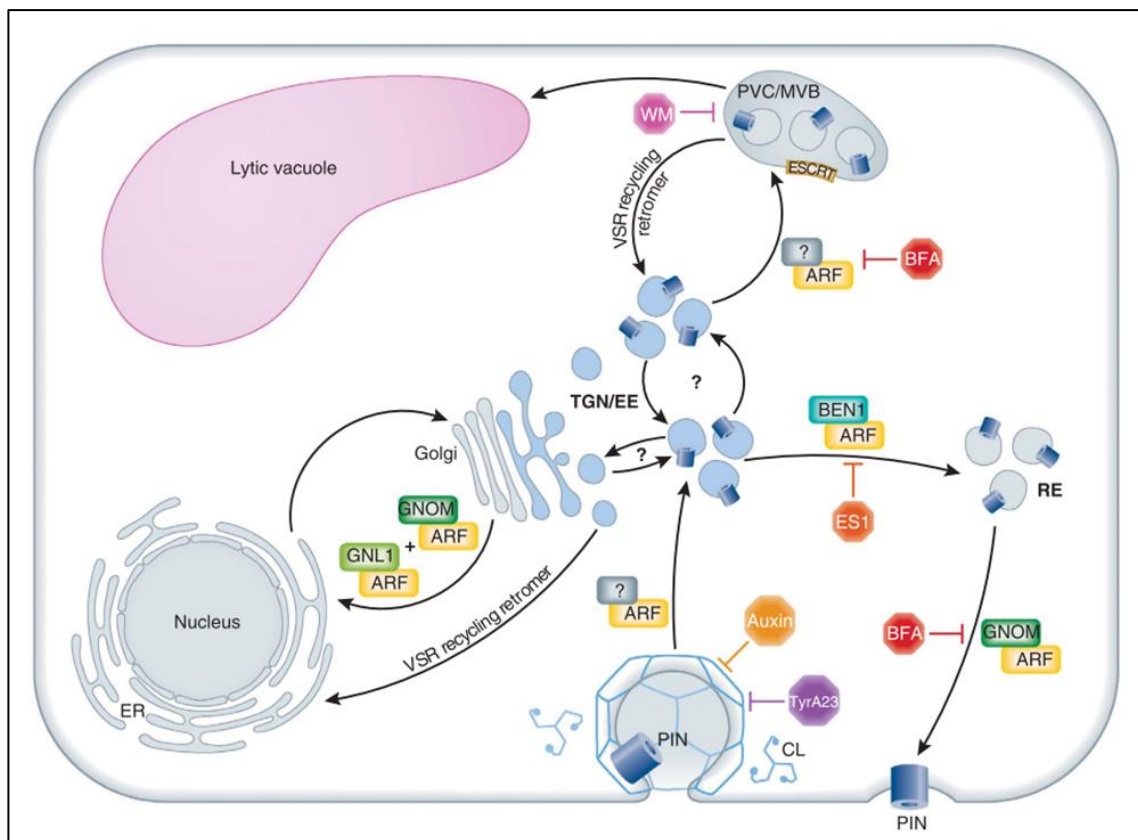


Figura 7. Tráfico vesicular de las proteínas en *A. thaliana*. Mecanismos de tráfico subcelular que controlan la polaridad y degradación de PIN. BFA, brefeldina A; EE, endosomas tempranos; ER, retículo endoplasmático; MVB, cuerpos multivesiculados; PVC, compartimentos prevacuolares; RE, endosomas de reciclaje; TGN, red trans-golgi; WM, wortmanina. Imagen tomada de la revisión de Grunewald, W. & Friml, J.2010 (Grunewald y Friml, 2010).

1.7 Identificación de los transportadores PIN en *P. patens*

De acuerdo con los datos de secuenciación del genoma, *P. patens* posee los mismos genes centrales para la biosíntesis, catabolismo, señalización y transporte de auxinas, tomando como referencia a *A. thaliana*, aunque el número de genes involucrados en estos procesos, en general, es menor (Thelander et al., 2017) (Véase *Tabla Suplementaria 2*). En *P. patens* se han identificado cuatro proteínas ortólogas a las proteínas PIN, denominadas PINA, PINB, PINC y PIND (Figura 8) (Bennett et al., 2014; Viaene et al., 2014; Zhang et al., 2020). Con base en la secuencia de aminoácidos, las proteínas PINA-C muestran una topología similar a las proteínas AtPIN1-7, las cuales presentan una asa larga localizada hacia la región intracelular (Viaene et al., 2014). En contraste, PIND muestra una topología similar a las proteínas AtPIN5 y AtPIN8, las cuales tienen un asa corta hacia el interior de la célula, como (ver Figura 8). Se ha sugerido que estos transportadores cortos están más relacionados con la homeostasis de las auxinas debido a su localización en el retículo endoplásmico (Viaene et al., 2014).

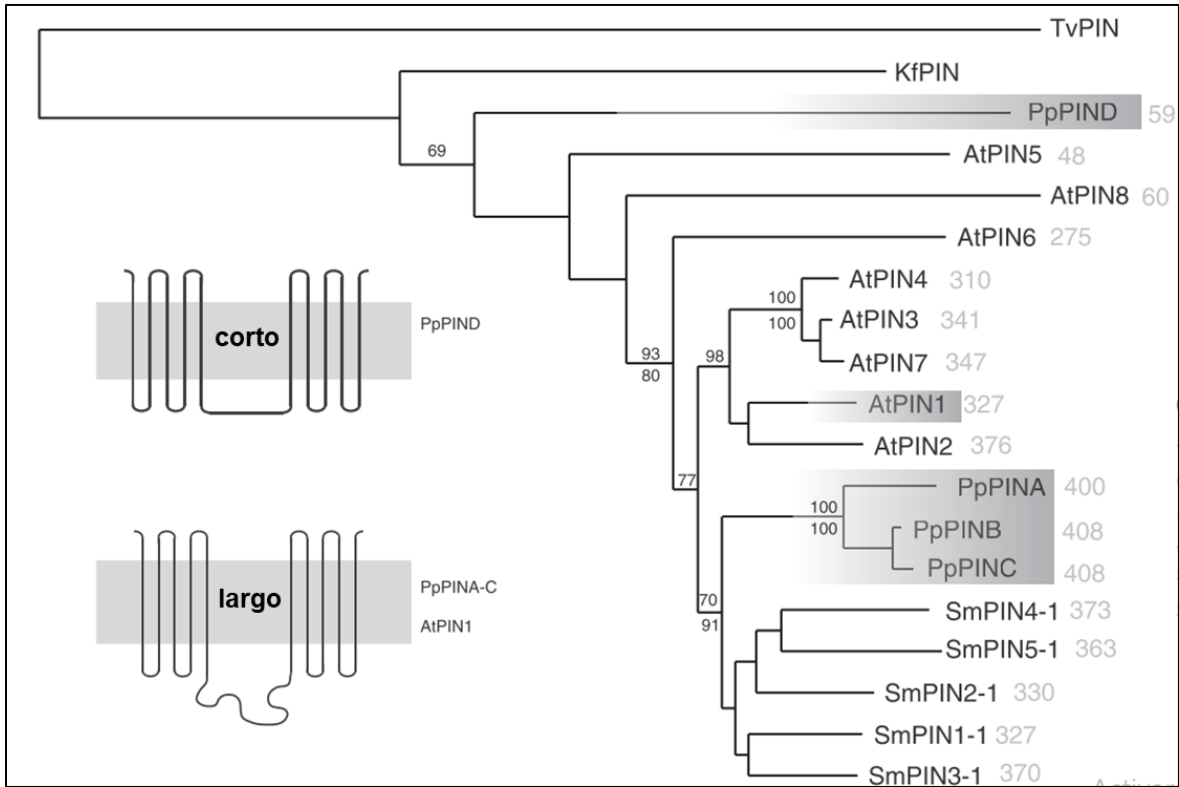


Figura 8 **Árbol filético de las proteínas PIN del musgo *P. patens*.** Filogenia de las proteínas PIN de *Arabidopsis thaliana* (AtPIN), la licofita *Selaginella moellendorffii* (SmPIN), el musgo *P. patens* (PpPIN) y el alga carofita *Klebsormidium flaccidum* (KfPIN). La secuencia similar a PIN del protista *Trichomonas vaginalis* (TvPIN) sirve para enraizar el árbol. Árbol de máxima verosimilitud que muestra los valores de soporte de las ramas \Rightarrow 70%. Los esquemas muestran la topología (servidor TMHMM (v.2.0) de los PIN cortos (PpPIND) y largos (PpPINA-C), la diferencia radica en el número de aminoácidos en el asa citoplásmica entre las regiones transmembranales para cada proteína PIN. Imagen tomada de Viaene, T. et, al. 2014(Viaene et al., 2014).

2. ANTECEDENTES

A partir de datos derivados de un análisis transcriptómico de las distintas fases del desarrollo del musgo (Ortiz-Ramírez et al., 2016), se sugirió que los genes *CNIH1* y *CNIH2* se expresan diferencialmente en los estadios de desarrollo del musgo. El transcrito para *CNIH1* es abundante en las esporas, mientras que el correspondiente a *CNIH2* muestra niveles más altos que los de *CNIH1* en todo el ciclo de vida del musgo, principalmente en el caulonema, los rizoides y el esporofito (Figura 9). Esta evidencia sugiere que estos dos parálogos podrían participar en distintos procesos celulares en las diferentes etapas del ciclo de vida del musgo. El transporte de auxinas en el musgo es importante en la diferenciación del caulonema, en la formación de los rizoides y también en el desarrollo del esporofito. Se ha demostrado que la salida de IAA del protonema hacia el medio depende de la actividad de los transportadores PINA y PINB (Viaene et al., 2014). La pérdida de PINA y PINB resulta en la acumulación de IAA en el protonema, lo cual promueve la prematura transición de cloronema hacia caulonema en la célula apical; mientras que, en el gametóforo, estos transportadores regulan el crecimiento del tallo, los filidios y los rizoides. PINA y PINB son proteínas funcionales que se localizan en la membrana plasmática de manera polarizada en el protonema y en los filidios con un desarrollo temprano (Bennett et al., 2014; Viaene et al., 2014).

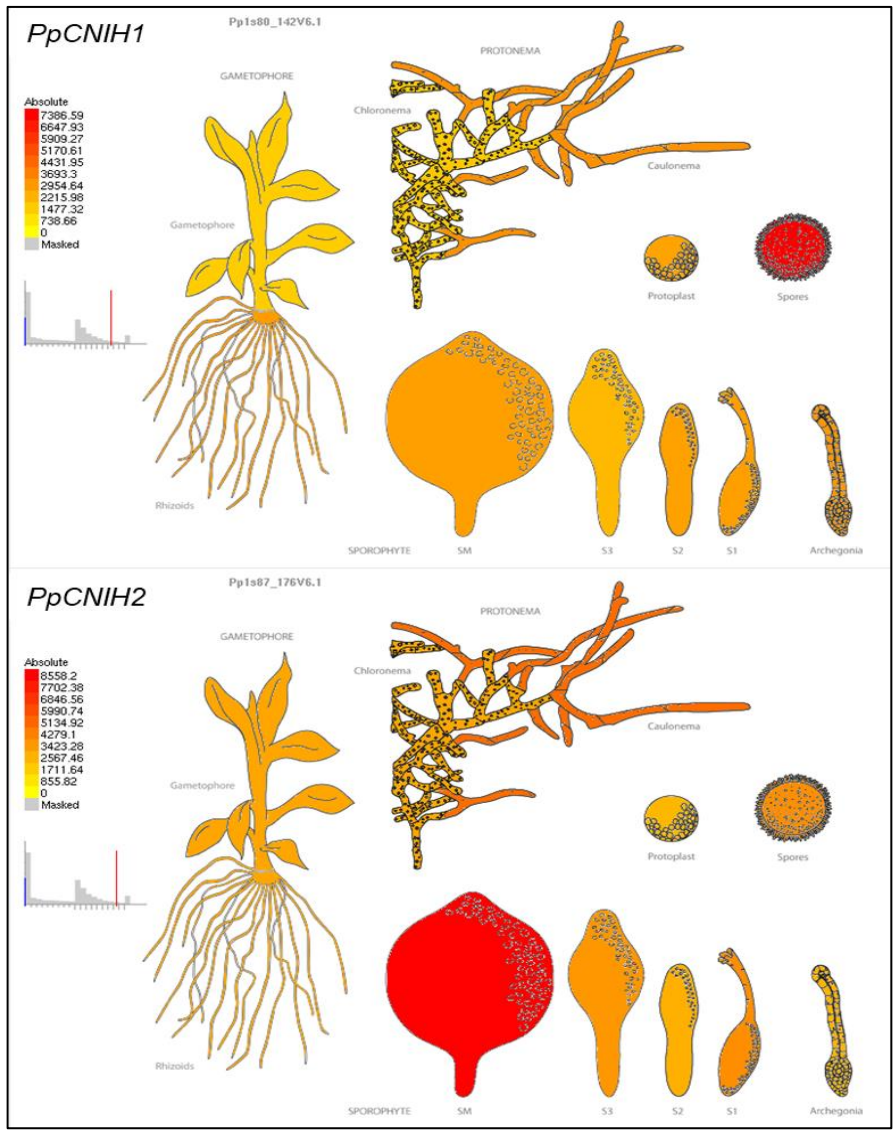


Figura 9. Expresión diferencial de los genes *CNIH1* y *CNIH2* en el ciclo de vida de *P. patens*. Mapa de expresión de los genes *CNIH1* (arriba) y *CNIH2* (abajo) en las diferentes etapas del ciclo de vida del musgo. Transcriptoma proveniente de microarreglos, utoronto.ca/efp_physcomitrella/cgi-bin/efpWeb.cgi. Ramírez-Ortiz y col. 2016 (Ortiz-Ramírez et al., 2016).

3. HIPÓTESIS

Las proteínas cornichon CNIH1 y CNIH2 tienen una función como receptores de proteínas cargo de los transportadores de salida de auxinas PIN en la vía temprana de secreción del musgo *Physcomitrium patens*.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la participación de las proteínas cornichon CNIH1 y CNIH2 como receptores cargo de los transportadores PIN en el musgo *Physcomitrium patens*

4.1 Objetivos particulares:

- Determinar la localización subcelular de las proteínas cornichon en el musgo *P. patens*.
- Caracterizar el fenotipo asociado a las mutantes cornichon durante el ciclo de vida del musgo *P. patens* e identificar posibles fenotipos asociados a los defectos en el transporte de auxinas.
- Determinar si existe interacción física entre los transportadores PINA y PINB con las proteínas CNIH.
- Determinar si la localización polarizada de los transportadores de auxinas PIN cambia en las mutantes cornichon y recuperar la localización de los PIN en las mutantes cornichon, mediante su complementación con CNIH1 y CNIH2.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Identificación de los homólogos de cornichon en el musgo

Para identificar los homólogos de cornichon en el musgo *Physcomitrium (Physcomitrella) patens* se buscó la secuencia de los genes en la base de datos Phytozome. Se realizó un Blast utilizando como referencia la secuencia de ADN codificante del gen *Erv14 (S. cerevisiae)*, bajo parámetros estándar. Se identificaron dos genes homólogos con los números de acceso: *Pp3c11_17020V3.1* y *Pp3c7_11500V3.1* a los cuales se les denominó como CNIH1 y CNIH2, respectivamente. Para identificar la similitud de las proteínas cornichon del musgo, se utilizó el programa CLC Main 8.0 para obtener un alineamiento múltiple y la matriz de identidad con las secuencias de aminoácidos de otros homólogos de cornichon en algas, plantas y hongos. Para conocer la topología tridimensional de las proteínas cornichon se utilizó el Programa CLC Main 8.0 y el servidor RosettaFold (<https://rosetta.bakerlab.org/>), que utiliza el algoritmo Alphafold2.

5.2 Material y cultivo biológico

Para la realización de este trabajo, se utilizó la línea de musgo silvestre *Physcomitrella patens subs. patens var. "Gransden 2004"*. Otras líneas de musgo que se utilizaron fue la línea knock-in *PpPINApro::PINA-EGFP* (TVT5-16, donada por la Dra. Sundberg, Department of Plant Biology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden) y la línea marcadora del aparato de Golgi *YFP-GmMan1* (donada por la Dra. Bezanilla, Department of Biological Sciences, Dartmouth College, NH, EE.UU). En la Tabla suplementaria 3 se enlistan las líneas del musgo que se generaron y utilizaron para la realización de este proyecto.

La propagación semanal de musgo consistió en homogenizar aproximadamente ¼ de tejido cultivado en una caja Petri en 5 ml de agua destilada estéril. Luego se

tomó 1 ml de la suspensión de musgo homogenizada y se plaqueó 1 ml sobre discos de celofán estéril puestos sobre cajas Petri suplementadas con medio solido *PpNH4* (*Anexo 1*). Las cajas se sellaron alrededor con cinta Micropore (3 mm) y se dejaron en cuarto de cultivo a 24°C con una densidad de flujo de fotones de 70 $\mu\text{E}/\text{s}^2$ y con fotoperiodo largo de 16/8 horas luz/oscuridad.

5.2.1 Obtención de protoplastos y transformación genética por choque térmico

Para el aislamiento de protoplastos, primero se colocó el tejido del musgo de una semana de edad en cajas Petri (90x15 mm) y se digirió con una solución final de driselasa al 0.5% y manitol al 8.5% durante una hora en agitación lenta, a temperatura ambiente. Una vez digerido el tejido, los protoplastos se filtraron a través de una capa de Miracloth (Merk-Millipore) en un tubo cónico de 50 ml estéril para separar el tejido no digerido. Para remover el exceso de driselasa, los protoplastos se centrifugaron a 700 g por 6 min y se descartó el sobrenadante, luego se lavaron y resuspendieron suavemente con una solución de manitol al 8.5% y se volvieron a centrifugar; este proceso se repitió tres veces más. Una vez lista la pastilla de protoplastos, estos se utilizaron para su posterior transformación genética o como material inicial para regenerar el protonema y analizar el fenotipo.

La transformación genética de los protoplastos se realizó mediante la técnica de polietilenglicol (PEG) y choque térmico descrito en el manual "Moss Methods" del laboratorio de la Dra. Bezanilla, con algunas modificaciones que se describen a continuación. En tubos cónicos de 15 ml estériles, se agregaron 15 o 30 μg de ADN total a transformar, luego la pastilla de protoplastos se resuspendió en la solución 3M (*Anexo 3 y 4*) a una concentración estimada de 2×10^6 protoplastos por mililitro (*Anexo 6*); se tomaron 300 μl y se agregaron al tubo cónico de 15 ml con el ADN a transformar, se mezcló suavemente y se agregó inmediatamente 300 μl de la solución PEG (*Anexo 3 y 4*), y se volvió a mezclar suavemente hasta homogenizar completamente. La suspensión de protoplastos se incubó por 10 min a temperatura ambiente y luego se transformaron con un choque térmico de 45°C por 3 min. Para la recuperación de los protoplastos los tubos se mantuvieron en

agua destilada por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se dejaron por 30 min con 5 ml de una solución de manitol al 8.5%. La suspensión de protoplastos se centrifugó a 1,600 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Finalmente, los protoplastos se resuspendieron en 500 μ l de medio *PpNH4* líquido suplementado con manitol al 8.5% y 10 mM de CaCl_2 (para transformación transitoria, *Anexo 5*) o en 1 ml del mismo medio adicionado con 0.3% agar (para transformación estable, *Anexo 5*). Finalmente, se plaqueó sobre el celofán puesto en medio de regeneración de protoplastos PRMB (*Anexo 2*) y se dejaron por cuatro días en un cuarto de cultivo a 24°C, con una densidad de flujo de fotones de 70 $\mu\text{E/s}^2$ y con fotoperiodo largo de 16/8 h luz/oscuridad.

Para la obtención de concentraciones mayores de ADN plasmídico se utilizó el protocolo descrito en el *Anexo 7*.

5.2.2 Análisis morfológico comparativo durante fase gametofítica del musgo *P. patens*

Para el análisis morfológico del protonema, primero se obtuvieron protoplastos a partir de tejido de protonema de siete días de crecimiento; una vez obtenidos los protoplastos, éstos se resuspendieron en 0,5 μ l de medio de cultivo líquido (medio *PpNH4* suplementado con manitol al 8,5 % y CaCl_2 10 mM) y se sembraron sobre celofán en placas de medio PRMB (medio *PpNH4* suplementado con manitol al 6 % y CaCl_2 10 mM, *Anexo 2*) por tres días y luego se transfirieron a medio de crecimiento estándar *PpNH4* durante cuatro días. Una vez regenerado el protonema a partir de los protoplastos, el tejido se montó en un portaobjetos con medio líquido *PpNH4* y se cubrió con un cubreobjetos para su posterior observación en el microscopio. Para montar los protonemas primero se cortó un pedazo pequeño de celofán con la ayuda de una navaja estéril; luego, cuidadosamente con pinzas de disección, se tomó el pedazo de celofán y se colocó en el portaobjetos de manera invertida, para que los protonemas crecidos sobre el celofán estuviesen en contacto con el medio líquido en el portaobjetos. Una vez hecho esto, con la ayuda de las pinzas de disección, se deslizó el pedazo

de celofán para poder desprender los protonemas. El tejido se observó bajo un microscopio invertido (Nikon, Eclipse) con un objetivo de 10X y/o 20X, y las imágenes se adquirieron con una cámara digital (Nikon 7500).

Para determinar defectos en la división de los protonemas y observar su morfología celular, se utilizó el método de tinción de la pared celular con Calcofluor White y se observó en un estereomicroscopio de fluorescencia (Zeiss Axioscope) con un objetivo de 10X o 20X. Las imágenes se obtuvieron con una cámara CCD (Photometrics CoolSnapcf Monocromática) y se analizaron con el software ImageJ/Fiji (Schindelin et al., 2012). Las imágenes de cada línea se ajustaron para aumentar la nitidez y el contraste para mejorar la observación de las divisiones celulares.

Para el análisis de gametóforos se realizó un ensayo de colonia. Se eligieron al azar distintas secciones de tejido de protonema de siete días crecidas sobre celofán de un tamaño de 3x3 mm, el tejido contenido en esa área se sembró cuidadosamente con pinzas estériles en medio sólido *PpNH4* y se cultivaron a 24 °C, con un fotoperíodo de 16 /8 h luz/oscuridad durante cuatro semanas. Los gametóforos con más de cinco filidios y rizoides bien formados se recolectaron y contaron en un estereomicroscopio. Las imágenes de la colonia de musgos y los gametóforos se tomaron con una cámara digital (Olympus o Sony α).

5.3 Clonación de los genes *PpCNIH1* y *PpCNIH2*

Para obtener el material inicial necesario para la clonación de los genes *cornichon* y para la aplicación de otras técnicas moleculares rutinarias, se utilizaron los protocolos descritos en la sección de *Anexos 8 al 12*. De manera general, para realizar las reacciones de RT-PCR para generar el ADN complementario (ADNc) por medio de una transcriptasa reversa, se extrajo ARN total del protonema del musgo. Posteriormente se realizó una reacción de PCR para amplificar el ADNc de *CNIH1* y *CNIH2*, respectivamente, y se utilizó el sistema Gateway (Invitrogen, CA, EE. UU.) para la clonación de estos.

5.3.1 Fusiones traduccionales de los homólogos de *cornichon* a la proteína verde fluorescente EGFP

Para determinar la localización subcelular de *CNIH1* y *CNIH2*, se fusionó la región codificante de cada *cornichon* a la proteína verde fluorescente EGFP en la región carboxilo terminal. Para realizar las construcciones pertinentes se utilizó la estrategia de recombinación *in vitro* de 2-fragmentos, que consiste en la clonación multisitio de dos fragmentos a recombinar en un vector de expresión para el musgo, compatible con la metodología Gateway Pro (Invitrogen, CA, EE. UU.) (Véase sección *Anexos: mapas de los plásmidos*). A continuación, se muestra un esquema:

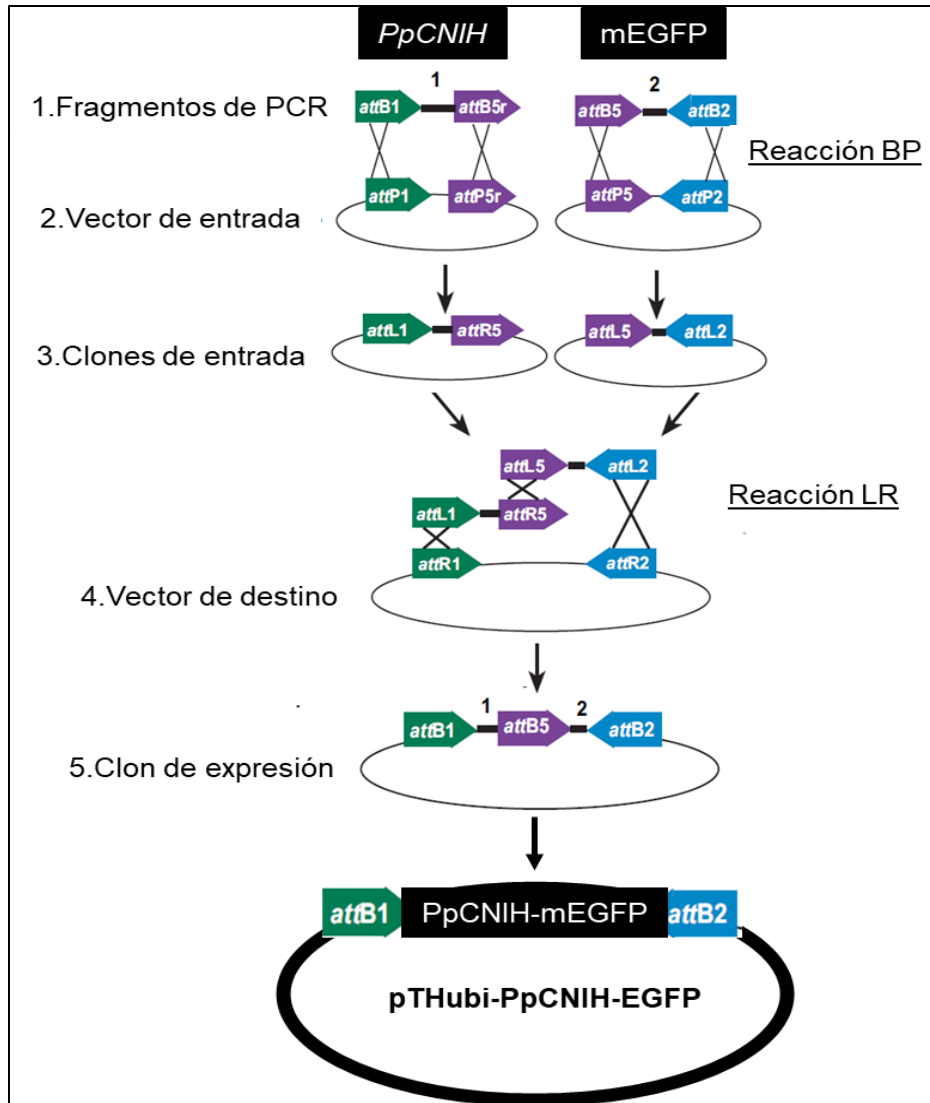


Figura 10. Diagrama de flujo para la clonación por recombinación in vitro de 2-fragmentos Gateway. 1) Obtención de los fragmentos de PCR mediante amplificación de las secuencias codificantes cornichon (*PpCNIH*) y la proteína monomérica verde fluorescente (mEGFP) con sus respectivos oligonucleótidos, ambos conteniendo las secuencias attB1 y attB5r para *PpCNIH* y las secuencias attB5 y attB2 para mEGFP. 2) En una reacción BP se clonó en los vectores de entrada pDONR-P1P5r el *PpCNIH* y en otro vector pDONR-P5P2 la mEGFP (3). 4) Empleando una reacción LR, se recombinó en conjunto los clones de entrada y el vector destino de expresión (pTHubi-gate). 5) Finalmente se obtuvo el clon de expresión pTHubi-*PpCNIH*-mEGFP.

A partir de ADNc de musgo, se amplificó por PCR (*Anexo 12*) la región codificante de *CNIH1* y *CNIH2*, respectivamente, utilizando oligonucleótidos que tuvieran los sitios attB1 y attB5r (ver *Tablas suplementarias 4 y 5*), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 98°C por 30 s (1 ciclo), desnaturalización a 98°C por 10 s, luego alineamiento de los oligonucleótidos a 56°C por 30 s, y

síntesis del fragmento de ADNc a 72°C 30 s (por 35 ciclos), finalmente extensión a 72°C por 10 min (1 ciclo) y termino de la reacción a 12°C de manera infinita (∞).

Una vez amplificado el producto de PCR, se introdujo en el vector pDONR-P1P5r mediante una reacción BP (Invitrogen, CA, EE. UU.) (Anexo 13). Células quimiocompetentes *E. coli* TOP10 se transformaron con la reacción BP (Anexo 10). Las células se plaquearon en cajas con medio LB suplementadas con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se incubaron a 37°C por 24 h. Algunas colonias se seleccionaron para extraer el ADN plasmídico (Ver Anexo 11) y digerirlo con la enzima de restricción *PvuII* (ThermoScientific, CA, EE.UU.) con el fin de identificar lo(s) clones positivos.

Para verificar la inserción correcta de los marcos abiertos de lectura de *CNIH1* y *CNIH2*, los clones positivos se mandaron a secuenciar utilizando los oligonucleótidos M13-Fw y M13Rv a la Unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología-UNAM. Para la fusión de mEGFP en el carboxilo terminal de los parálogos de cornichon, se realizó una reacción de recombinación Gateway por multisitio de dos fragmentos (Invitrogen, CA, EE.UU.) con una clonasa LR II plus, con la construcción pDONR-P1P5r-*PpCNIH* y pDONR-P5P2 - mEGFP en un vector de destino pTHUbi-gate, para generar pTHUbi-CNIH1-mEGFP o pTHUbi-CNIH2-mEGFP. Se utilizaron las siguientes concentraciones para la reacción LR:

• pDONR-P1P5r (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0.5-1 μl
• pDONR-P5P2 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0.5-1 μl
• pTHUbi-gate (150 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0.5-1 μl
• LR II Plus	0.5 μl
• Incubación 24 h a temperatura ambiente	
• proteinasa K (parar la reacción)	0.5 μl , 10 min a 37°C

Células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10 se transformaron con la reacción LR triple (Anexo 10). Las células se plaquearon en cajas con medio LB suplementadas con ampicilina/carbenicilina (50 µg/µl) y se incubaron a 37°C por 24 h. Algunas colonias se seleccionaron para extraer el ADN plasmídico (Ver Anexo 11) y digerirlo con la enzima de restricción *XhoI* (Invitrogen, CA, EE. UU.).

Para expresar transitoriamente cada construcción en los protoplastos del musgo, los protoplastos se transformaron con 30 µg de ADN total. Después de la transformación, las plantas se regeneraron en medio PRMB durante cuatro días; después de lo cual se trasladaron a medio *PpNH4* suplementado con higromicina (15 µg/ml) en donde crecieron durante tres días en condiciones estándar, antes de observarlas al microscopio confocal.

5.4 Generación y obtención de las mutantes nulas $\Delta cnih2$ por recombinación homóloga

Para obtener la mutante nula de *CNIH2* en el musgo se utilizó el reemplazamiento del gen mediante la técnica de recombinación homóloga. Esta técnica consiste en reemplazar la región del locus *CNIH2* por un casete de selección con antibiótico, mediante el sistema de recombinación homóloga.

Para obtener la mutante nula de $\Delta cnih2$, primero se amplificaron productos de PCR de un tamaño de ~1,000 nt, hacia arriba de la región de homología 5' y hacia abajo de la región de homología 3'. El molde se obtuvo del ADN genómico del musgo (Véase Anexo 13) y se utilizó una Taq polimerasa de alta fidelidad (Anexo 12).

Diseño de los oligonucleótidos para amplificar el brazo 5': El oligonucleótido 'sentido' se diseñó con una secuencia conteniendo el sitio *attB1*, seguido de un sitio de restricción no común, en este caso se utilizó *PmeI* (ThermoScientific, CA, EE.UU.), y luego de ~20 nt de la secuencia genómica. Al oligonucleótido 'antisentido' se le incluyó el sitio *attB4* seguido de ~20 nt de la secuencia genómica.

Diseño de los oligonucleótidos para amplificar el brazo 3': Al oligonucleótido 'sentido' se le incorporó el sitio *attB3* seguido de ~20 nt de la secuencia genómica; al oligonucleótido 'antisentido' se tomaron ~20 nt de la secuencia genómica, seguido del sitio de restricción *PmeI* y, finalmente, conteniendo la secuencia *attB2*.

Para el brazo 5' se amplificó un producto de PCR de 1,274 pb antes del sitio de inicio 5' del gen y para el brazo 3' se amplificó un producto de PCR de 1,284 pb después del codón de terminación del gen. Una vez amplificados los brazos 5' y 3', éstos se clonaron independientemente en los vectores de entrada pDONR-P1P4 y pDONR-P3P2, respectivamente, mediante una reacción BP, de acuerdo con el protocolo en el Anexo 13.

Posteriormente, las células quimiocompetentes *E. coli* TOP10 se transformaron con los productos de las reacciones BP (Anexo 10). Las células se plaquearon en

cajas con medio LB suplementadas con kanamicina (50 µg/µl) y se incubaron a 37°C por 24 h. Algunas colonias se seleccionaron para extraer el ADN plasmídico (Ver Anexo 11). Para identificar alguna clona correspondiente a los brazos 5' o 3', se digirió el ADN plasmídico con la enzima de restricción *PvuII*. Se corroboraron las secuencias de los clones candidatos de entrada para cada brazo.

Para generar el molde homólogo, los clones de entrada y el plásmido pDONR-R4R3-loxP-Hygro-loxP (clon de entrada que contiene el casete de resistencia a higromicina) se recombinaron *in vitro* en el plásmido pGEM-gate, en una reacción LR II plus triple. Las concentraciones de los clones de entrada y el vector destino que se utilizaron fueron:

• pDONR-P1P4 (20 µg/µl)	1 µl
• pDONR-Hygro-R4R3 (20 µg/µl)	1 µl
• pDONR-P3P2 (20 µg/µl)	1 µl
• pGEM-gate (150 µg/µl)	1 µl
• LR II Plus	1 µl
• Incubación 24 horas a temperatura ambiente	
• proteinasa K (parar la reacción)	0.5 µl, 10 min a 37°C

Las células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10 se transformaron con la reacción LR triple (Anexo 10). Las células se plaquearon en cajas con medio LB suplementadas con ampicilina/carbenicilina (50 µg/µl) y se incubaron a 37°C por 24 h. Algunas colonias se seleccionaron para extraer el ADN plasmídico (Ver Anexo 11) y para identificar alguna clona con la secuencia deseada con los brazos 5' y 3', el ADN plasmídico se digirió con la enzima de restricción *PvuII*. Finalmente, antes de transformar los protoplastos del musgo, se obtuvieron midi-preparaciones (Ver Anexo 7) de la construcción para linearizarla digiriendo un total de 60 µg/µl de ADN plasmídico agregando 5 µl de la enzima *PmeI* (ThermoScientific, CA,

EE.UU.) con 30 μ l del amortiguador de la enzima de restricción aforando hasta un volumen final de 300 μ l de H₂O ultrapura estéril. Para digerir completamente el plásmido se dejó incubando la reacción por 16 h a 37°C.

La construcción linearizada se precipitó con etanol (*Anexo 14*) antes de transformar los protoplastos. En el siguiente esquema se muestra el diseño experimental de cómo se obtuvo la construcción con el molde de homología.

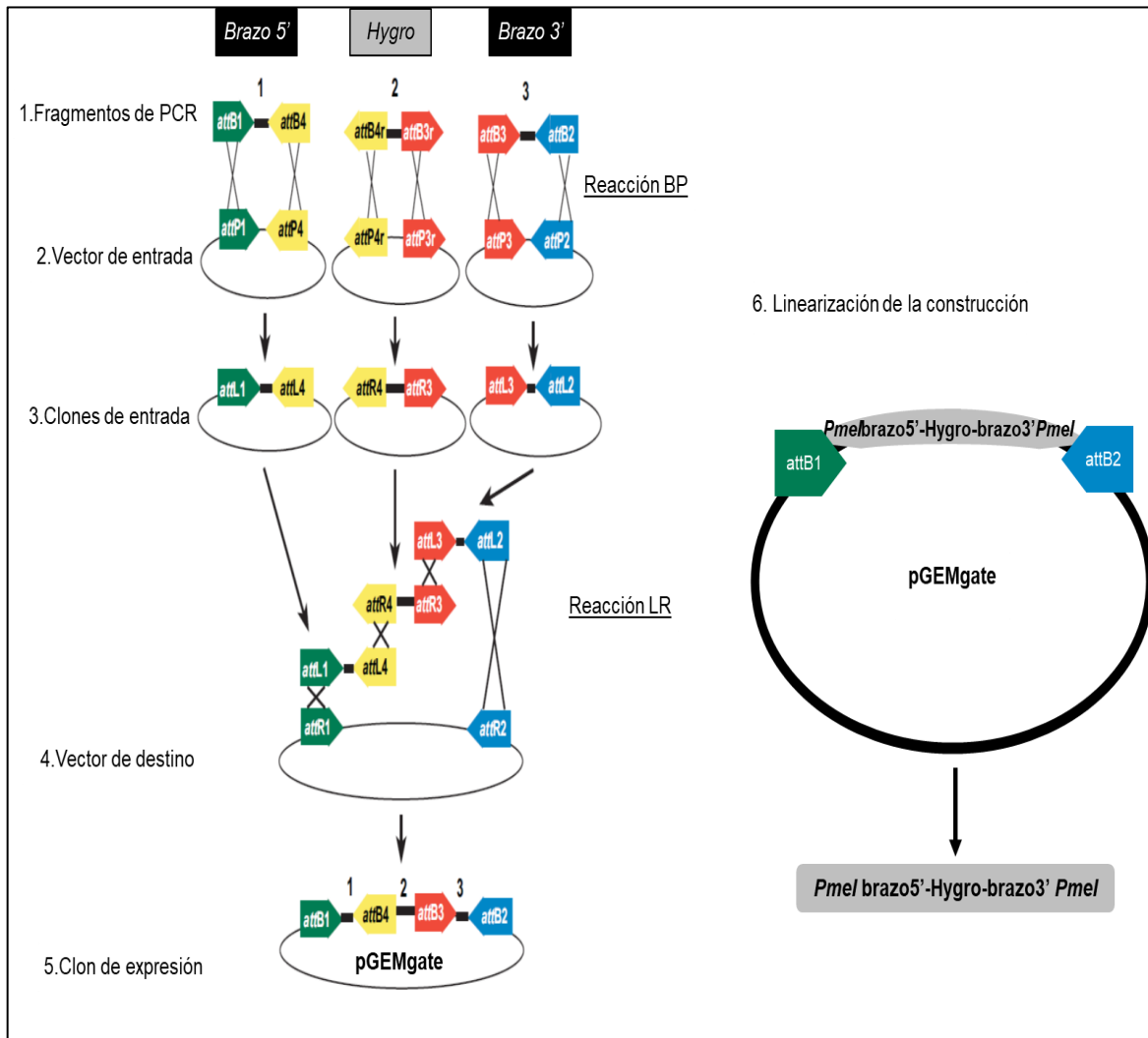


Figura 11. Clonación por recombinación *in vitro* de 3-fragmentos Gateway. 1) Obtención de los fragmentos de PCR mediante amplificación de los brazos 5' (Elemento 1) y 3' (Elemento 3), respectivamente, y del casete de selección a higromicina (Elemento 2) con sus respectivos oligonucleótidos, ambos diseñados adicionalmente con las secuencias attB1 y attB4 para el brazo 5', attB4 y attB3 para el casete de selección a higromicina y las secuencias attB3 y attB2 para el brazo 3'. 2) En una reacción BP se clonó en los vectores de entrada pDONR-P1P4, pDONR-P4P3 y pDONR-P3P2 el brazo 5', el casete de selección y el brazo 3', respectivamente (3). 4) En una reacción LR triple se recombinaron en conjunto los clones de entrada y el vector destino de expresión (pGEM-gate) y, 5) se obtuvo el clon de expresión con los Elementos 1, 2 y 3. 6) El clon de expresión es linearizado por una digestión con la enzima *PmeI* antes de la transformación de protoplastos del musgo.

Para la transformación de los protoplastos se ocuparon 30 µg de ADN total. Después de la transformación, los protonemas se regeneraron en medio PRMB durante cuatro días. Posteriormente, los tejidos se pasaron a medio *PpNH4* suplementado con higromicina (15 µg/ml) y se dejaron en medio selectivo por una

semana. Los transformantes potenciales se cambiaron a placas de antibiótico durante dos intervalos de 1 semana. Finalmente, las plantas restantes (transformantes estables) se recogieron con pinzas estériles y se cultivaron en medio *PpNH4* (sin celofán) durante 3-4 semanas para permitir un crecimiento máximo para la extracción de ADN genómico (*Anexo 13*).

Para identificar potenciales líneas mutantes en el gen *CNIH2*, se extrajo ADN genómico de cada colonia independiente. Para confirmar la sustitución del gen *CNIH2* por el casete de higromicina se realizó un análisis de PCR. Una vez identificadas las líneas mutantes, se escogieron dos mutantes nulas, y para comprobar que estas mutantes no expresaran el gen, se extrajo ARN total y se sintetizó el cDNA para corroborar que no tuvieran el transcrito, lo cual se confirmó mediante amplificación del gen *CNIH2* por PCR utilizando los cebadores 298-Fw y 299-Rv (*Tabla Suplementaria S5*).

5.5 Generación y obtención de la mutante *cnih1* por el sistema CRISPR-Cas9

Para obtener mutantes *cnih1* se empleó la técnica CRISPR-Cas9 (Mallett et al., 2019). Esta técnica está basada en el sistema de inmunidad bacteriano CRISPR-Cas9. El sistema CRISPR-Cas9 es una herramienta muy valiosa que permite editar con precisión el genoma utilizando una endonucleasa guiada por ARN (Cas9) para iniciar rupturas de doble cadena de manera controlada. La introducción de la enzima Cas9 y un ARN guía (sgRNA) específico (sgRNA) en las células blanco es un proceso para generar rupturas de doble cadena de ADN.

El sgRNA contiene ~20 bases homólogas a un ADN de interés en el extremo 5' (conocido como proto-espaciador) y también contiene una región que se une a Cas9. El complejo Cas9:sgRNA se une y corta la secuencia blanco de ADN, siempre y cuando la secuencia del proto-espaciador reconozca un motivo adyacente (PAM) en dirección 5', con la hebra de ADN no complementario. Una vez que ocurre una ruptura de doble cadena se genera un daño al ADN, por lo cual el sistema de reparación de la célula blanco se activa, a través de una de las dos vías principales: la unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés) o la reparación dirigida por homología (también conocida como recombinación homóloga o RH). La reparación por NHEJ da lugar a inserciones o deleciones de nucleótidos ("indels"). Las indels resultantes a menudo interrumpen la función del gen al alterar el marco de lectura traduccional dentro de una región codificante de la proteína. Este proceso permite modificar con precisión un gen de interés (Jasin and Rothstein, 2013; Mallett et al., 2019).

Hasta hace poco, la recombinación homóloga ha sido una poderosa herramienta para la modificación de genes en el musgo *P. patens*, sin embargo, se ha demostrado que la edición del genoma mediada por CRISPR-Cas9 puede ser más eficiente que la recombinación homóloga tradicional, sobre todo porque este sistema CRISPR-Cas9 da la oportunidad de editar eficientemente el genoma en múltiples loci, y también integrar secuencias en ubicaciones precisas en el genoma utilizando una transformación transitoria simple (Mallett et al., 2019).

Para este proyecto se utilizó el sistema modular para mutaciones por CRISPR-Cas9 desarrollado en el laboratorio de la Dra. Bezanilla (Mallet et al., 2019). En la Figura 12 se muestran los vectores compatibles con la tecnología Gateway para realizar mutantes por CRISPR-Cas9 en el musgo:

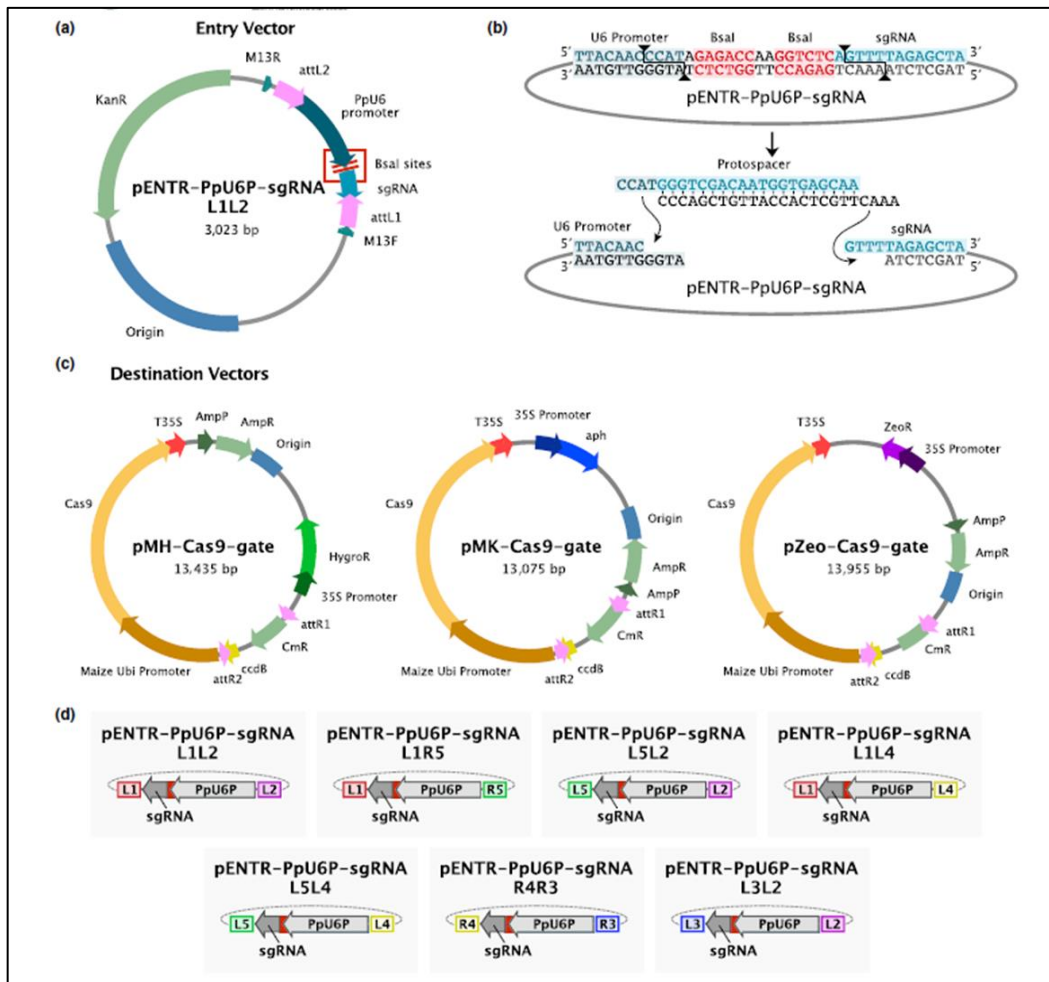


Figura 12 Vectores Gateway para la edición genética por CRISPR-Cas9 en *P. patens*. a) Mapa del vector de entrada que contiene el promotor U6 para impulsar la expresión del sgRNA flanqueado por sitios att. b) Secuencia de ADN de la unión del promotor U6-sgRNA dentro del clon de entrada, separada por sitios *BsaI* invertidos. Tras la digestión del clon de entrada con *BsaI*, se generan extremos cohesivos únicos del vector que permiten la ligación direccional de oligonucleótidos diseñados que contienen el protoespaciador. c) Mapas de los vectores de destino pMH-Cas9-gate, pMK-Cas9-gate y pZeo-Cas9-gate para selección con higromicina, G418 y zeocina en plantas, respectivamente. d) Vectores de entrada que se generaron en base al plásmido que se muestra en (a) con sitios att modificados que permiten la compatibilidad con las reacciones de Multisite Gateway. Figura tomada de Mallet, D. et al 2019(Mallet et al., 2019).

Diseño del ARN guía o protoespaciador:

Para generar la construcción de proto-espaciadores *CNIH1*, estos se diseñaron con el software CRISPOR (crispor.tefor.net) utilizando *P. patens* (Phytozome V11) como genoma y *S. pyogenes* (5'NGG3') como parámetros PAM. Se eligieron cuatro proto-espaciadores de acuerdo con el alto porcentaje de especificidad para el sitio de reconocimiento palindrómico (PAM) de la enzima Cas9 y la baja frecuencia de generar mutaciones no deseadas (off-targets). Con el propósito de generar mutaciones al azar en el gen y obtener alguna mutante nula, se eligieron cuatro distintos proto-espaciadores para reconocer secuencias en cada uno de los cuatro exones predichos del gen *CNIH1*.

Cada protoespaciador y su complemento inverso se sintetizaron como oligonucleótidos agregando la secuencia CCAT en el extremo 5' de cada uno para crear extremos cohesivos compatibles con *BsaI* (ThermoFisher, CA, EE. UU.). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se encuentran en la Tabla suplementaria 5. Cada par de oligonucleótidos se apareó por PCR (500 pmol de cada uno, 10 µl de volumen total, con las siguientes condiciones de PCR: 98 °C por 3 min, después se bajó gradualmente la temperatura a 0,1 °C por segundo hasta llegar a la T_m teórica de los oligonucleótidos y se mantuvo por 10 min, finalmente se bajó la temperatura a 0,1 °C por segundo hasta llegar a los 25 °C). Paralelamente, se linealizaron los vectores de entrada pENTR-*PpU6P*-L1L5r, L5L4, L4L3 y L3L2 con la enzima de restricción *BsaI* de 14-16h a 37°C, luego se cargó toda la digestión del plásmido en un gel de agarosa al 1% (100 V, 40 min) y se purificó el plásmido digerido y linearizado por medio de un kit (Zymo Research, CA, EE.UU.). Estos vectores de entrada compatibles con el sistema Gateway contienen entre los sitios attB específicos, la secuencia promotora *PpU6P* y un sitio de restricción para la enzima de restricción *BsaI*, el cual sirve para clonar el protoespaciador.

Cada protoespaciador se ligó con sus respectivos vectores de entrada, utilizando la ligasa de ADN "Instant Sticky-end Ligase Master Mix" (New England Biolabs, MA, EE.UU.), de la siguiente manera:

• pENTR linearizado con <i>BsaI</i>	20-100 ng
• protoespaciador (1:100 dilución)	1 µl
• Ligasa	hasta 5 µl
• Mezclar ~7-10 veces. Incubar 10 min a temperatura ambiente	

Inmediatamente después, las células quimiocompetentes *E. coli* TOP10 se transformaron con todo el volumen de la reacción de ligación. Las células transformadas se plaquearon en medio LB sólido, suplementadas con kanamicina (50 µg/ml). Después, las colonias transformantes se seleccionaron para la extracción del plásmido. Para corroborar la correcta inserción de cada protoespaciador en el vector de entrada, se realizó un análisis de restricción con la enzima *BsaI*, aquellas colonias que no se digirieron se tomaron como clones positivos debido a que, cuando la inserción ocurre correctamente, el protoespaciador del sitio *BsaI* se pierde. Se escogió un clon positivo para cada clon de entrada y se secuenció.

Se obtuvieron cuatro construcciones: pENTR-L1L5r-protospacer 1, pENTR-L5L4-protospacer 2, pENTR-L4L3-protospacer 3 y pENTR-L3L2-protospacer 4. Estas cuatro construcciones se recombinaron con el vector de expresión pMZeo-Cas9-gate mediante una reacción de recombinación Gateway multisitio de cuatro fragmentos (Invitrogen, CA, EE. UU.) con la enzima LR clonasa II plus, siguiendo las especificaciones del fabricante, para obtener la construcción pMZeo-Cas9-cnih1-sgRNA1-sgRNA2-sgRNA3-sgRNA4. Las concentraciones fueron las siguientes:

• pENTR-L1R5 (20 µg/µl)	1.3 µl
• pENTR-L5L4 (20 µg/µl)	1.3 µl
• pENTR-R4R3 (20 µg/µl)	1.4 µl

• pENTR-L3L2 (20 µg/µl)	1.3 µl
• pMZeoCas9-gate (150 µg/µl)	2.6 µl
• LR II Plus	2 µl
• Incubación 24 h a temperatura ambiente	
• Proteínasa K (parar la reacción)	0.5 µl, 10 min a 37°C

El/Los producto(s) de esta reacción LR se emplearon para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10 que, a continuación, se plaquearon en medio LB sólido suplementado con ampicilina/carbenicilina (50 µg/ml) y se incubaron a 37°C por 16-18 h. Una vez obtenidas las colonias transformantes, se extrajo el ADN plasmídico, el cual se digirió con la enzima de restricción *MfeI* (New England Biolabs, MA, EE.UU.). Los clones positivos se seleccionaron y se secuenciaron para comprobar la construcción correcta; se almacenaron para su posterior extracción plasmídica.

Protoplastos del musgo se transformaron con la construcción pMZeo-Cas9-cnih1-sgRNA1-sgRNA2-sgRNA3-sgRNA4. Para el protocolo del sistema CRISPR-Cas9, los protoplastos se transformaron con una concentración de 15 µg de ADN total. Para la selección de las líneas transgénicas CRISPR-Cas9 se empleó el antibiótico zeocina (50 µg/µl). Los protoplastos transformados estuvieron bajo selección durante una semana; el celofán se cambió a medio *PpNH4* recién preparado tres veces por semana. Finalmente, las colonias sobrevivientes se colectaron cuidadosamente con pinzas estériles y se cultivaron en medio *PpNH4* (sin celofán) durante 3-4 semanas para permitir un crecimiento máximo para la extracción de ADN genómico (ver anexo 14).

Para genotipificar las mutantes potenciales *cnih1*, fue necesario diseñar oligonucleótidos que permitieran la amplificación de productos de PCR ≤1000 pb que flanquearan el sitio seleccionado de la mutación por los proto-espaciadores y que permitieran observar las diferencias en el tamaño de la banda de PCR en

comparación con la región de ADN wt. Las colonias de musgo con las mutaciones potenciales se identificaron utilizando los cebadores 1268-Fw y 1512-Rv (Tabla S5). Se seleccionaron aquellas colonias en las que el producto de PCR amplificado tenía un tamaño diferente al esperado. El producto de PCR de algunas posibles líneas mutantes se purificó mediante un paquete comercial (Promega, WI, EE.UU.), de acuerdo a las especificaciones del fabricante, para obtener la confirmación de la mutación del producto de la PCR mediante secuenciación. El análisis de la expresión del gen mutante de *CNIH1* se corroboró mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores 252-Fw y 253-Rv (Tabla S5).

5.6 Generación y obtención de la línea doble mutante de cornichon

Para la generación de la doble mutante de los genes cornichon, se empleó la línea parental *cnih1-23* para crear la mutante nula Δ *cnih2* mediante recombinación homóloga, en la que el gen *CNIH2* se reemplazó por el casete de resistencia a la higromicina, como se describe anteriormente en la sección 5.4.

5.7 Generación de líneas transgénicas fluorescentes mediante el sistema de CRISPR-Cas9 & Reparación por Homología Dirigida

Para generar las líneas de musgo transgénico *PpCNIH1-3xmRuby*, *PpCNIH2-3xmRuby* y *PpSEC23G-3xmNeon*, se empleó el sistema CRISPR-Cas9 en combinación con el sistema de reparación homóloga dirigida (Mallett et al., 2019). La reparación dirigida por homología es una vía endógena que repara rupturas de doble cadena de ADN usando un molde de ADN disponible que comparte regiones de homología a ambos lados del sitio de ruptura (Jasin and Rothstein, 2013). Usando CRISPR/Cas9, dirigido por homología, la reparación se puede aprovechar proporcionando un molde del donante de ADN junto con la enzima Cas9 y el sgRNA para reparar la región blanco con extrema precisión (Mallett et al., 2019).

Se utilizó el sistema modular para mutaciones por CRISPR-Cas9 & HDR desarrollado en el laboratorio de la Dra. Bezanilla (Mallett et al., 2019). Los vectores para CRISPR-Cas9 se describen en la Figura 13. A continuación, se muestran los vectores compatibles con la tecnología Gateway que se utilizaron para generar las regiones de homología:

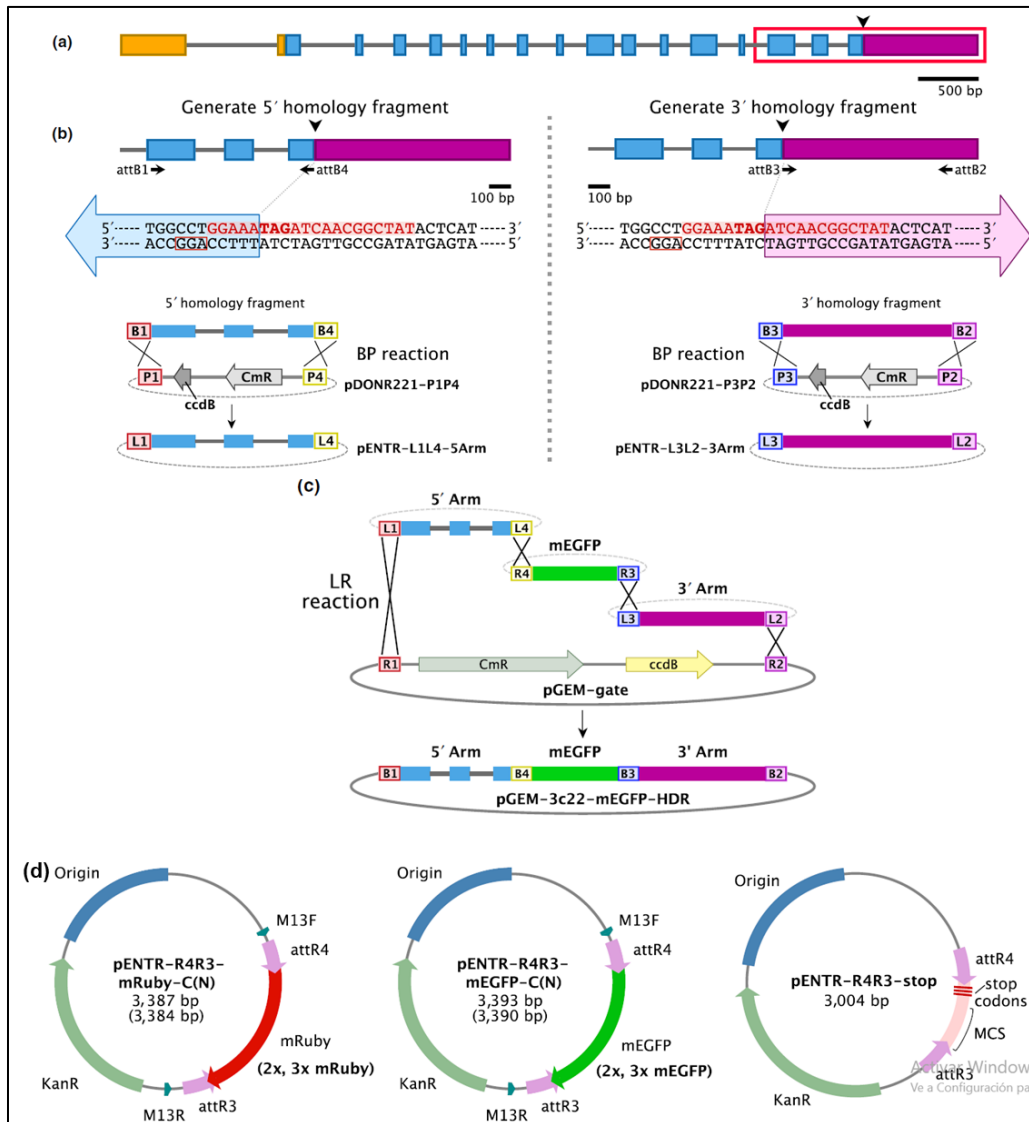


Figura 13. Estrategia de clonación para la inserción de secuencias que codifican para proteínas fluorescentes y codón de paro en el extremo 3' de un gen de interés. (a) Modelo genético que representa un gen de interés. La flecha representa el sitio de inserción de mEGFP deseado. Los exones se representan con cajas, y los intrones se representan como líneas. La 5'UTR, la región codificante y la 3'UTR están representadas por naranja, azul y púrpura, respectivamente. El cuadro rojo delinea la sección del modelo genético que se muestra en (b). (b) Generación de los fragmentos de homología 5' (Elemento 1) y 3' (Elemento 3) por PCR con sus respectivos sitios attB y posterior reacción BP en vectores pDONR. En la secuencia de ADN se muestra la correspondiente a la unión entre la región codificante y la UTR 3', con la "TAG" en negrita, que representa el codón de terminación, la secuencia roja que representa el sitio de unión del protoespaciador y el cuadro rojo que representa el PAM. Las flechas azules y moradas grandes representan los fragmentos de homología 5' y 3', respectivamente. (c) Esquema que muestra los vectores de entrada creados en (b) sometidos a una reacción Gateway Multisite LR con un vector de entrada mEGFP (Elemento 2) y un vector de destino para hacer el plásmido donante de homología de ADN final. (d) Vectores de entrada para el Elemento 2, construidos para facilitar la inserción de secuencias que codifican proteínas fluorescentes y el casete de paro usando la reparación dirigida por homología (Mallett et al., 2019).

Diseño del ARN guía o proto-espaciador

Para la inserción de secuencias codificantes para proteínas fluorescentes (knock-in), se diseñó un ARN guía que empalmara en la secuencia de paro del gen para hacer fusiones al carboxilo terminal, como se describió en la sección 5.5. Empleando este programa, se obtuvieron ocho y siete posibles ARN guías para *CNIH1* y *CNIH2*, respectivamente; todas con una alta especificidad para el sitio de reconocimiento palindrómico (PAM) de la enzima Cas9, de los cuales se escogió el ARN guía más cercano al sitio del codón de término, con una alta especificidad por el reconocimiento del PAM, y un menor número de sitios inespecíficos (off-targets).

El ARN guía para cada gen se sintetizó sin incluir la secuencia PAM y agregando en el extremo 5' la secuencia CCAT- para dirigir la clonación de cada protoespaciador, también se sintetizó un oligonucleótido reverso complementario del proto-espaciador para facilitar la clonación de ADN de doble cadena del proto-espaciador elegido en el vector de entrada pENTR-PpU6P-L1L2. Los pasos subsecuentes para alinear los proto-espaciadores son los mismos que se describen en la sección 5.5. Para identificar posibles clones positivos, algunas construcciones se digirieron con la enzima de restricción *Bsal*. Para corroborar que cada proto-espaciador para cada gen de cornichon estuviera correctamente insertado, se escogió un clon de cada construcción y se secuenciaron. Una vez generado cada clon de entrada, L1-*PpU6P*-sgRNA-cn1-tag-L2 y L1-*PpU6P*-sgRNA-cn2-tag-L2, se transfirieron independientemente al vector de expresión pMZeo-Cas9 por medio de una reacción LR simple con las siguientes condiciones:

• pENTR-L1L2 (12.5-37.5 ng/μl)	1 μl
• pMZeo-Cas9 gate (150 ng/μl)	0.25 μl
• Amortiguador 1X TE pH 8.0	hasta 2 μl
• LR clonasa II	0.5 μl

- Incubación 24 h a temperatura ambiente
- Proteínasa K (parar la reacción) 0.5 µl, 10 min a 37°C

Las células quimiocompetentes *E. coli TOP10* se transformaron con esta reacción y se sembraron en cajas con medio LB suplementado con ampicilina/carbenicilina (50 µg/µl). Para identificar algún clon positivo, se seleccionaron varias colonias y se realizó una PCR en colonia con los oligonucleótidos: 5-Ubi-prom-rev y cn1-tag-Rv ó cn2-tag-Rv (Tabla S5) que amplificaron un fragmento de 668 bp, que corresponde a la región 3' del gen de ubiquitina y al protoespaciador del cornichon 1 y cornichon 2, respectivamente. Aquellas colonias positivas fueron sujetas a extracción del plásmido y su posterior análisis de restricción con la enzima *MfeI*. Las construcciones finales se denominaron: pMZeo-Cas9-*PpU6P*-sgRNA-cn1 y pMZeo-Cas9-*PpU6P*-sgRNA-cn2. Se seleccionó y almacenó una colonia positiva para su posterior uso.

Generación del molde HDR

Para obtener el templado de homología necesario para insertar la secuencia codificante de la proteína fluorescente en el extremo 3' del gen *CNIH1* y *CNIH2*, se diseñaron un par de oligonucleótidos para amplificar las secuencias de homología brazo 5' y brazo 3', para el gen *CNIH1* y *CNIH2*, respectivamente. Para *CNIH1* se amplificó un fragmento de 1,104 pb antes del codón de término (brazo 5') y 1,081 pb después del codón de término (brazo 3'). Para *CNIH2* se amplificó un fragmento de 1,109 pb antes del codón de término (brazo 5') y 1,110 pb después del codón de término (brazo 3'), mediante una reacción de PCR. Posteriormente, los brazos 5' y 3' de cada gen cornichon se clonaron en los vectores de entrada pDONR-P1P4 y pDONR-P3P2, respectivamente, mediante una reacción BP. A continuación, la reacción BP se incubó durante 14-16 h a 25°C, para posteriormente emplear el producto en la transformación de células quimiocompetentes *E. coli TOP10* que se sembraron en cajas con medio LB suplementado con kanamicina (50 µg/µl). Se seleccionaron tres colonias de cada

construcción para la extracción de plásmido y su posterior análisis. Se digirió el plásmido de las tres colonias con la enzima de restricción *PvuII* y se escogió un clon positivo de cada construcción para secuenciar con la ayuda de los oligonucleótidos M13-Fw y M13-Rv, obteniéndose así la clonación de los brazos 5' y 3' para *CNIH1* pDONR-B1-cn1-B4 y pDONR-B3-cn1-B4, y para *CNIH2* pDONR-B1-cn2-B4 y pDONR-B3-cn2-B2.

El brazo 5' de *CNIH*, contiene la secuencia PAM, que se reconoce por la enzima Cas9, una vez en el musgo, por lo tanto, se utilizó como molde la construcción pDONR-B1-cn2-B4 y se realizó un cambio de un nucleótido por medio de la técnica de mutagénesis sitio-dirigida (ver Anexo 16) generando una mutación sinónima, que elimina la secuencia PAM pero no altera la secuencia original. Aquellas colonias con el plásmido mutagenizado, se les extrajo el ADN plasmídico y se realizó un análisis de restricción con la enzima *PvuII*. El (los) clon (es) positivo(s) se secuenciaron para corroborar la mutación puntual del brazo 5'.

Una vez obtenidos los brazos 5' y 3' en los vectores de entrada, se realizó una reacción LR triple en conjunto con el vector pDONR-3xmRuby-C-R4R3, para transferir los brazos de homología en un vector de expresión pGEM, de manera que estos brazos flanquearan a la secuencia 3xmRuby, generando las construcciones pGEM-cnih1-brazo5'-3xmRuby-brazo3' y pGEM-cnih2-brazo 5'-3xmRuby-brazo 3' en el vector destino pGEM-gate. La reacción *in vitro* se realizó de la siguiente manera:

• pDONR-P1P4 brazo 5' (20 µg/µl)	1 µl
• pDONR-3xmRuby-C-R4R3 (20 µg/µl)	1.5 µl
• pDONR-P3P2 brazo 3' (20 µg/µl)	1 µl
• pGEM-gate (150 µg/µl)	0.5 µl
• LR II Plus	1 µl
• Incubación 24 h a temperatura ambiente	

- | | |
|------------------------------------|-----------------------|
| • Proteínasa K (parar la reacción) | 0.5 µl, 10 min a 37°C |
|------------------------------------|-----------------------|

La siguiente combinación de las construcciones finales se co-transformaron en protoplastos de musgo silvestre:

1. pMZeo-Cas9-*PpU60*-sgRNA-cn1 y pGEM-CNIH1-3xmRuby
2. pMZeo-Cas9-*PpU6P*-sgRNA-cn2 y pGEM-CNIH2-3xmRuby

Para generar las construcciones necesarias y obtener la línea de musgo transgénico Sec23G-3xmNeon, se utilizó la misma técnica y procedimiento anteriormente descrito; en este caso la construcción pMH-Cas9-*PpU6P*-sgRNA-sec23g fue una donación de la Dra Bezanilla. Para producir la construcción de homología final, requerida para insertar la etiqueta fluorescente 3xmNeon en el lado correspondiente al C-terminal del gen y en marco de lectura, se utilizó la técnica de recombinación *in vitro* de tres fragmentos del sistema Gateway con las siguientes construcciones donadas por la Dra. Bezanilla: pDONR-B1-sec23-brazo5'-B4', pDONR-R4R3-3xmNeon-C y pDONR-B3-sec23 brazo3'-B2, para recombinarse en el vector de destino pGEM-gate mediante una reacción LR II plus triple. Las construcciones pMH-Cas9-*PpU6P*-sgRNA-sec23g y pGEM-sec23G-3xmNeon finalmente se co-transformaron en protoplastos utilizando la línea CNIH2-3xmRuby como fondo genético.

Los protoplastos se co-transformaron con 7.5 µg en total de construcción de plásmido CRISPR-Cas9/sgRNA y 7.5 µg de plásmido de homología (Mallet et al. 2019). Después de la transformación, las plantas se regeneraron en PRMB durante cuatro días. Posteriormente, las plantas se pasaron a medio *PpNH4* suplementado con zeocina (50 µg/ml) o higromicina (15 µg/ml) y se dejaron en medio de selección por una semana; a continuación, para que los musgos eliminaran los plásmidos se cambió el celofán cada semana (tres veces) a medio *PpNH4* sin antibiótico. Finalmente, las plantas restantes o posibles transformantes se recogieron con pinzas estériles y se cultivaron en medio *PpNH4* (sin celofán)

durante 3-4 semanas para permitir un crecimiento máximo para su extracción de ADN genómico y su posterior genotipificación.

Para identificar y seleccionar las colonias transformadas con las construcciones CNIH1-3xmRuby, CNIH2-3xmRuby o Sec23G-3XmNeon, se emplearon los oligonucleótidos descritos en la Tabla S5.

5.8 Ensayo de la ubiquitina dividida, mbSUS, en la levadura *S. cerevisiae* para identificar interacciones proteína-proteína

Para la detección de interacciones proteína-proteína, se empleó el sistema de ubiquitina dividida basado en el apareamiento (mbSUS) en células de *S. cerevisiae* (Grefen et al., 2009). Las construcciones de plásmidos se generaron utilizando la secuencia codificante de PINA, CNIH1, CNIH2, CNIH2-141 y CNIH2-137, sin el codón de terminación y se clonaron independientemente en el plásmido pDONR221 mediante una reacción de BP (Invitrogen, CA, EE. UU.). Se utilizaron células quimiocompetentes *E. coli* TOP10 y se transformaron con cada reacción BP (Anexo 10). Las células se plaquearon en cajas con medio LB suplementadas con kanamicina (50 µg/µl) y se incubaron a 37°C por 24 h. Algunas colonias se seleccionaron para extraer el ADN plasmídico (Ver Anexo 11) y digerirlo con la enzima de restricción *PvuII* (ThermoScientific, CA, EE.UU.) con el fin de identificar lo(s) clones positivos. Para verificar la inserción correcta de los marcos abiertos de lectura de PINA, CNIH1, CNIH2, CNIH2-141 y CNIH2-137, los clones positivos se mandaron a secuenciar utilizando los oligonucleótidos M13-Fw y M13-Rv a la Unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología-UNAM.

Posteriormente, se empleó una reacción LR con cada clon de entrada (Invitrogen, CA, EE. UU.) para transferir el gen *PINA* al vector de expresión pMETYC_GW (clones Cub) y los genes *CNIH1* y *CNIH2*, al vector de expresión pXN32_GW (Nub clones).

Para el ensayo mbSUS, se prepararon los medios de crecimiento como se describió anteriormente (Lalonde et al, 2010). Las cepas de *S. cerevisiae* THY.AP4 (*MATa ura3, leu2, lexA::LacZ::trp1 lexA::HIS3 lexA::ADE2*) y THY.AP5

(*MAT α* *URA3*, *leu2*, *trp1*, *his3 loxP::ade2*) se transformaron con los vectores pMETYC_GW y pNX32_GW, respectivamente. Las células de *S. cerevisiae* se transformaron mediante el tratamiento con LiAc (Lalonde et al., 2010).

5.9 Ensayo de reconstitución estructural de dos fragmentos de la proteína fluorescente EYFP en células epidérmicas de *Nicotiana benthamiana*

La reconstitución estructural de los fragmentos N-terminal y C-terminal de la proteína fluorescente EYFP (BiFC) se realizó de acuerdo con (Rosas-Santiago et al., 2015). Se clonó la secuencia codificante de *CNIH1*, *CNIH2* y *PINA* en el vector de entrada pDONR-221, mediante una reacción de BP. Para obtener el clon de expresión de cada gen empleado en los ensayos BiFC, se llevó a cabo una reacción LR (Invitrogen, CA, EE. UU.) con los vectores de expresión pYFC43 o pYFN43. Células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10 se transformaron con la reacción LR que fueron posteriormente plaqueadas en medio LB sólido suplementado con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se incubaron a 37°C por 16-18 h. Una vez obtenidas las colonias transformantes, se les extrajo el ADN plasmídico que se digirió con la enzima de restricción *PvuII*. Los clones positivos se corroboraron por secuenciación. El ADN plasmídico de cada construcción se transformó por electroporación en células de la cepa *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 y se cultivaron en 30 ml de medio LB con rifampicina (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y espectinomicina (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) o kanamicina (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a 28°C a una O.D.₆₀₀ de 0,3 a 0,5.

Las hojas de tabaco se infiltraron con las construcciones pYFC43-*PpPINA*, pYFC43-*AtPIP2A*, pYFN43-*PpCNIH1*, pYFN43-*PpCNIH2* y pYFN43-*AtPIP2A* con un cultivo bacteriano con una O.D.₆₀₀ de 0,3, resuspendido en un amortiguador (fosfato de sodio pH 7,0, acetosiringona 0,1 mM (Sigma) y glucosa 28 mM). Después de 48 h la fluorescencia se observó en las epidermis de las hojas de *Nicotiana benthamiana* en un microscopio confocal invertido Olympus FV1000.

5.10 Microscopía confocal

Para observar la expresión transitoria de *CNIH1*-mEGFP o *CNIH2*-mEGFP, se emplearon las longitudes de onda (λ) de excitación y emisión para EGFP de 488

nm y 510 nm, respectivamente, en un microscopio confocal invertido Olympus FV1000 nm con un objetivo de aceite de inmersión Apo 60x de 1,49 N.A. Para la línea transgénica CNIH2-3xmRuby, la fluorescencia se observó en un microscopio confocal LSC Nikon Ti2, empleando una λ de excitación de 561 nm y una λ de emisión de 647 nm con un objetivo de aceite de inmersión Apo 60x de 1,49 N.A. Para la adquisición de imágenes se tomaron secciones ópticas de 0,50 μm o 1 μm de grosor en el eje Z. Las Imágenes fueron visualizadas y analizadas con el software ImageJ (Schindelin et al., 2012).

Para el análisis de co-localización entre Sec23G y CNIH2, la fluorescencia de Sec23G-3XmNeon se cuantificó utilizando una λ de excitación a 488 nm y se observó a una λ de emisión de 510 nm. Para observar la fluorescencia de CNIH2-3xmRuby se empleó el láser con una λ de 543 nm y se observó a una λ de emisión de 655 nm. Se tomaron imágenes confocales cada 0,50 μm de grosor en el eje Z. Las Imágenes fueron visualizadas y analizadas en ImageJ (Schindelin et al., 2012). Para el análisis de co-localización, se empleó el complemento Co-loc2 en Image-J para derivar el coeficiente de correlación de Pearson; valores superiores a 0,5 son indicativos de co-localización positiva.

La cuantificación del tamaño de los puntos asociados a las diferentes proteínas se realizó en ImageJ de tres imágenes confocales ópticas diferentes de cada una de las siguientes líneas: CNIH2-3xmRuby, Sec23G-3xmNeon y YFP-Golgi, respectivamente. Para detectar los puntos, las imágenes se binarizaron utilizando un umbral de máxima entropía; las vesículas se seleccionaron con la herramienta “wand tool”, se midió el área (μm^2) de 35 vesículas aleatorias.

5.11 Desestabilización de la estructura del Aparato de Golgi por la brefeldina A

Para el tratamiento con brefeldina A (BFA), varias piezas de celofán que contenían tejido de protonema de una semana de cultivo se cortaron cuidadosamente con un bisturí y se colocaron en placas de medio *PpNH4* suplementadas con 50 μM de

BFA o DMSO (placas de control). Las placas se incubaron durante 24 h a 24°C (16 h/8 h régimen de luz/oscuridad). Para la observación con microscopía confocal del protonema, se cortó un trozo de celofán que contenía el protonema y se colocó boca abajo sobre una almohadilla de agar que contenía 50 µl de medio de Hoagland, 1% de agar y 1% de sacarosa. Se retiró el celofán deslizándolo con cuidado, dejando el tejido adherido a la almohadilla de agar. Se añadieron 10 µl de medio de Hoagland líquido y sacarosa al 1% sobre el tejido, se cubrió con un cubreobjetos y se selló con una mezcla de vaselina, lanolina y parafina (1:1:1). Para mantener el tejido expuesto a BFA durante la observación, se añadió BFA 50 µM a la mezcla de medio líquido de Hoagland. La fluorescencia de ambas líneas transgénicas se registró en un microscopio confocal invertido Olympus FV1000. La fluorescencia del marcador YFP-Golgi de EYFP se observó empleando λ de excitación y emisión de 488 nm y 524 nm, respectivamente. La fluorescencia de la línea CNIH2-3xmRuby se observó empleando λ de excitación y emisión de 543 nm y 655 nm; con un objetivo de inmersión en aceite de 60x con un N.A. 1.3 y empleando una potencia de láser de 0.5% para EYFP y 5% para mRuby.

5.12 Cambios en la localización subcelular de PINA-EGFP en protonema de musgo y ensayo de complementación

Para observar cambios en la localización subcelular de PINA en mutantes simples de cornichon, empleamos la línea reportera *PpPINA_{pro}::PpPINA-EGFP*. La mutante simple *cnih1* se obtuvo mediante la técnica CRISPR-Cas9, mientras que la mutante simple Δ *cnih2* se obtuvo mediante recombinación homóloga, como se describió anteriormente. Se seleccionaron mutantes individuales de cada gen cornichon y se observaron bajo un microscopio confocal para identificar la localización de la fluorescencia asociada a PINA-EGFP en las células apicales del protonema. Se cortó un trozo de celofán que contenía protonema de 7 días y se colocó en un portaobjetos de microscopio que contenía 20 µl de medio líquido *PpNH4* y se cubrió con un cubreobjetos y se selló con esmalte de uñas para la observación de EGFP (0.5% potencia de láser λ de excitación y emisión de 488

nm y 510 nm, respectivamente) con un objetivo de inmersión de aceite de 60X con un N.A 1.3 en un microscopio confocal invertido (Olympus FV1000).

Para el ensayo de complementación de la mutante $\Delta cnih2$, se clonó la secuencia codificante de CNIH2, CNIH2-141 y CNIH2-137, con codón de paro, en el vector pDONR-221, mediante una reacción de BP. Estas construcciones posteriormente se clonaron en el plásmido de expresión pMZeo-Ubi-gate mediante una reacción de LR simple. los clones se verificaron mediante análisis de restricción y se secuenciaron para verificar la correcta clonación. Cada construcción se transformó en protoplastos para la expresión transitoria en la mutante $\Delta cnih2-3/ PpPINApro::PpPINA-EGFP$. Para la identificación de PINA-EGFP, los protonemas de fluorescencia se mantuvieron en selección con zeocina durante 10-15 días antes de observarlos en un microscopio confocal como se describe anteriormente en esta sección. Para cuantificar cambios en la intensidad de la fluorescencia de PINA-GFP en la punta de la célula apical, las imágenes confocales se proyectaron en Z y se cambiaron a imagen de 8 bits (0-255), con un semicírculo se delimitó un área de interés (ROI) de $46,8 \mu m^2$.

5.13 Expresión transitoria de las proteínas CNIH en protoplastos de *P. patens*

Para corroborar que las versiones CNIH2, CNIH2-141 y CNIH2-137 se localizaron correctamente, estas se expresaron transitoriamente en protoplastos del musgo. La región codificante de cada una de las versiones silvestre y mutantes de CNIH2 se fusionaron a la proteína verde fluorescente y se clonaron en el vector pTHUbi-gate. Las clonaciones se realizaron mediante recombinación *in vitro* de 2-fragmentos descrito en la sección 5.3.1 y la obtención de protoplastos y su transformación se realizó de acuerdo con lo descrito en la sección 5.2.1. Los protoplastos transformados se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente por 24 a 72 h, en la solución Liquid Plating Media o LPM con 10 mM $CaCl_2$ (ver anexo 5).

5.14 Análisis estadísticos

Los datos se presentan como diagramas de caja obtenidos con Excel. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando Excel. Se utilizó la prueba *t* de Student; para los análisis morfológicos del protonema, y para el análisis de los gametóforos se utilizó ANOVA y la prueba post hoc Tukey-Kramer. Los valores de *p* mayores a 0,05 se reportan cómo no significativos, mientras que los valores de *p* \leq 0,05 o 0,001 se reportan como significativos y altamente significativos, respectivamente.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis filogenético de las proteínas cornichon de *P. patens*

El musgo *P. patens* tiene dos genes cornichon en su genoma, denominados CNIH1 (*Pp1s80_142V6*) y CNIH2 (*Pp1s87_176V6*); cada gen codifica para una proteína de 156 aminoácidos. Con la finalidad de averiguar el grado de similitud de las proteínas CNIH1 y CNIH2 en comparación con otras proteínas, se realizó un análisis de alineamiento múltiple. Para este análisis se escogieron secuencias de aminoácidos provenientes de algas, plantas y hongos (Tabla S6). De acuerdo con los resultados que se muestran en la Figura 14, CNIH1 y CNIH2 comparten motivos similares, uno de éstos es el motivo IFRTL, identificado en la secuencia homóloga cornichon Erv14p de *Saccharomyces cerevisiae*, que se ha caracterizado como un dominio de interacción con Sec24, la cual es uno de los componentes principales de las vesículas COPII. En el caso de los homólogos del cornichon en plantas, el motivo consenso [I]-[F/N]-[X]-[L] también está presente en las proteínas de cornichon de *P. patens* (Figura 14, línea izquierda). Otro de los motivos que se identificaron en las proteínas CNIH1 y CNIH2 es el motivo ácido [E]-[E]-[E/D] (Figura 14, línea derecha), el cual, en hongos y plantas, es un sitio de interacción con sus respectivas proteínas cargo. A diferencia de las proteínas de otras especies, las proteínas CNIH1 y CNIH2 presentan, 15 aminoácidos adicionales en su extremo carboxilo. Esta C-terminal se caracteriza por la presencia de aminoácidos susceptibles de ser fosforilados (como Ser y Thr) (Figura 14, flechas amarillas). De acuerdo con un análisis de predicción de fosforilación *in vitro* (NetPhos3.1; Blom et al., 1999), los residuos de Thr145,148 y 150 de CNIH1 y el residuo Thr148 de CNIH2 son potencialmente fosforilables (Figura 15A y B), lo que sugiere que estos pueden ser fosforilados *in vivo*.

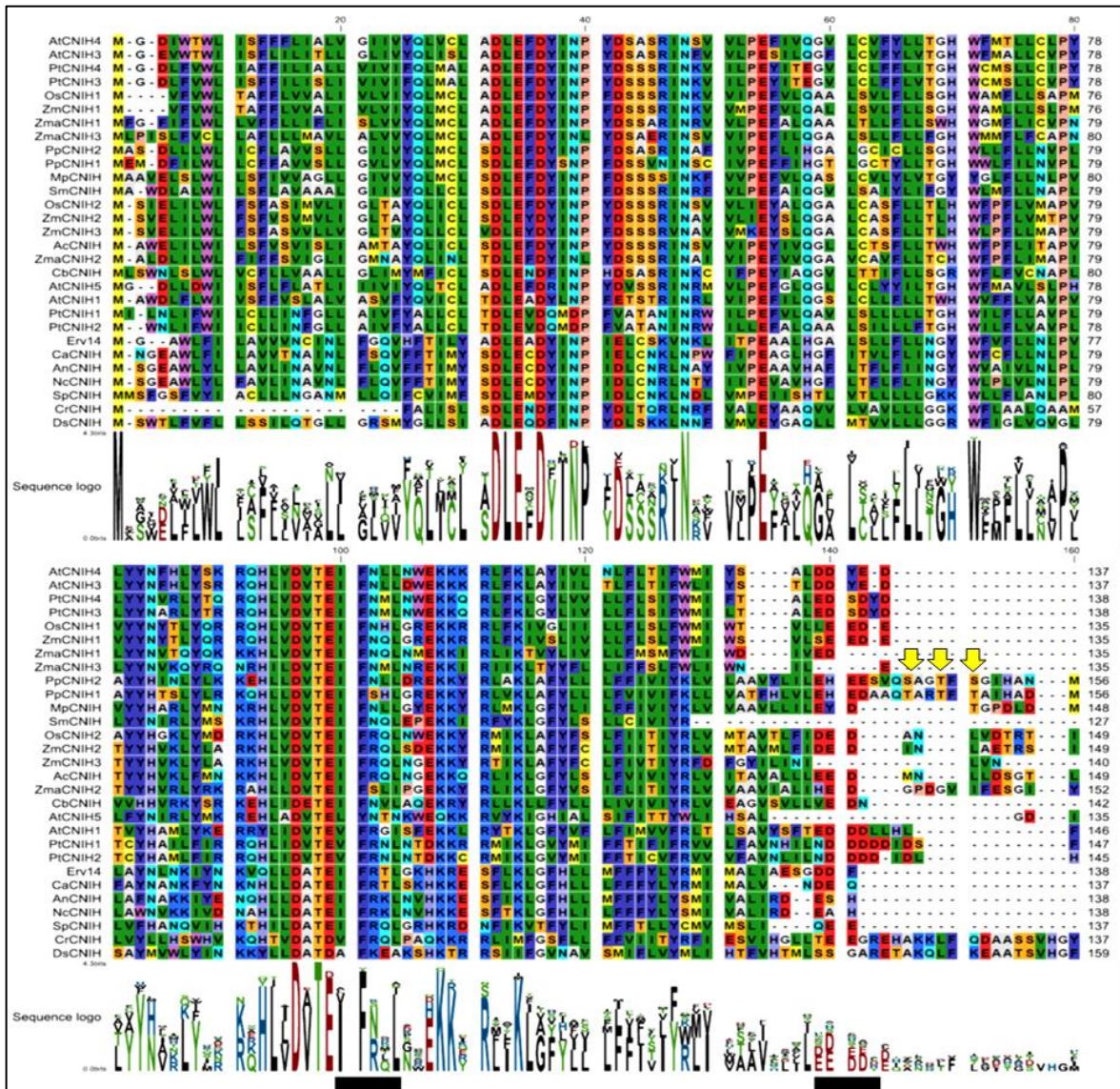


Figura 14. Alineación de secuencias de aminoácidos de proteínas homólogas de cornichon y localización de sitios de fosforilación putativos en homólogos de cornichon en el musgo. Alineación de secuencias de aminoácidos de homólogos de cornichon de algas, plantas y hongos; las barras negras horizontales izquierda y derecha, muestran el motivo de consenso IFNXL y el motivo ácido (Ac. Dom), respectivamente. Las flechas indican los sitios putativos de fosforilación en los residuos de Ser y/o Thr, identificados por el servidor de predicción NetPhos3.1. En la tabla S6 se encuentran los números de acceso de las secuencias utilizadas en la imagen.

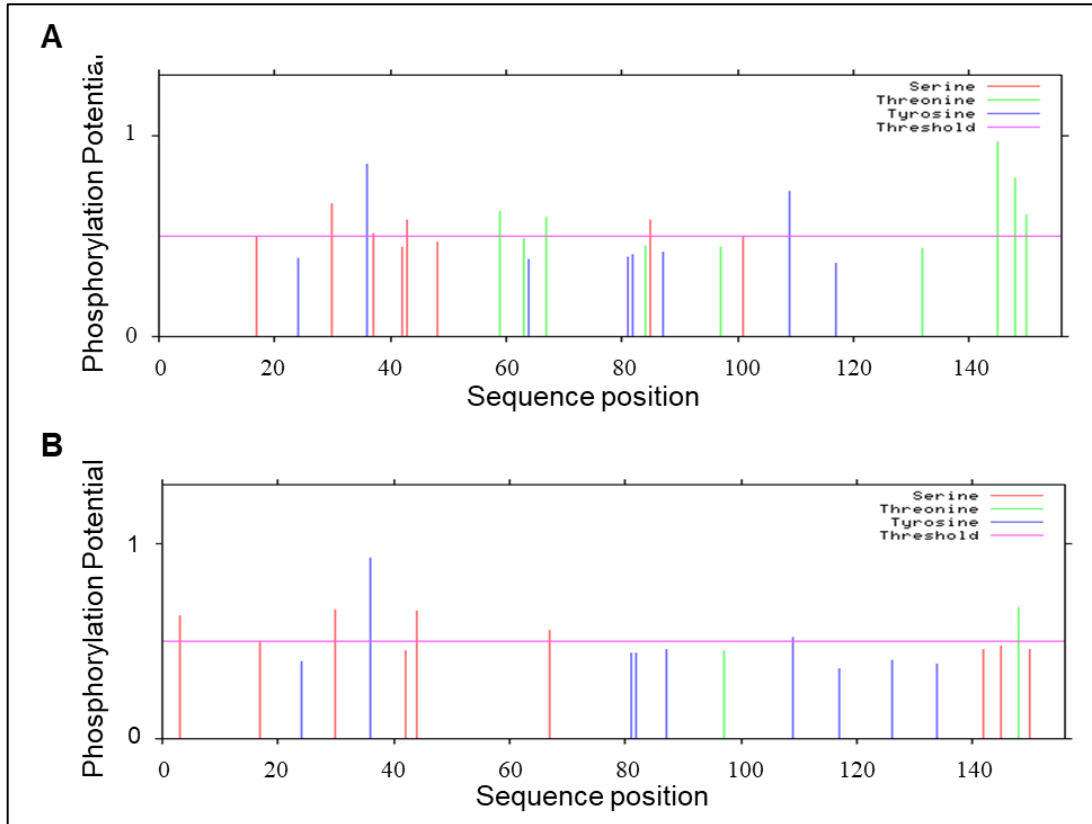


Figura 15. Análisis *in silico* de sitios putativos de fosforilación de las proteínas cornichon del musgo. A) Sitios de fosforilación previstos para la proteína CNIH1. **B)** Sitios de fosforilación previstos para la proteína CNIH2. Código de color: serina en rojo, treonina en verde y tirosina en azul. Para este análisis *in silico* se utilizó la predicción del servidor NetPhos3.1(Blom et al., 1999) (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>).

Por otro lado, para conocer el nivel de identidad de las proteínas CNIH1 y CNIH2 respecto a sus homólogos, se realizó un análisis comparativo de matriz de identidad entre todas las secuencias de aminoácidos de las proteínas cornichon elegidas. Los resultados demostraron que las proteínas CNIH1 y CNIH2 son similares en un 72 %; con respecto al alga carofita *Chara braunii*, a la hepática *M. polymorpha* y la licofita *S. moellendorfi*, ambas proteínas cornichon de *P. patens* comparten entre un 45 y un 61% de identidad. Este nivel de identidad disminuye con los homólogos de las angiospermas hasta un 36-50% de identidad y, alrededor del 30% entre los homólogos de los hongos (Figura 16).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29		
AtCNIH4	1		61.75	70.29	69.57	56.93	58.39	57.25	53.24	46.79	42.95	46.67	51.08	47.68	45.03	46.21	45.03	44.81	40.56	53.85	40.41	36.49	33.33	33.33	30.71	30.99	30.99	24.82	27.22	24.53	
AtCNIH3	2	112		63.04	65.94	54.01	54.74	55.07	51.80	46.15	41.67	46.67	48.92	46.36	45.03	43.45	45.70	40.26	42.66	51.75	38.36	37.16	35.37	34.75	34.29	32.39	32.39	25.53	27.85	26.42	
PtCNIH4	3	97	87		93.48	62.32	62.32	58.99	55.71	42.95	41.03	45.03	46.57	43.42	42.11	43.15	45.39	41.29	39.58	46.53	41.10	38.51	35.37	33.10	30.90	33.57	35.66	25.35	24.60	25.79	
PtCNIH3	4	96	91	129		63.04	63.04	60.43	52.14	44.23	42.31	46.36	47.14	44.74	42.76	42.47	46.71	40.65	38.19	47.92	42.47	40.54	36.73	31.69	29.08	32.17	32.87	25.35	24.60	25.79	
OsCNIH1	5	78	74	86	87		93.33	63.77	58.99	44.23	44.87	49.33	47.10	44.37	43.71	45.52	43.05	41.56	41.26	43.66	40.41	38.78	36.30	32.86	31.43	29.58	30.99	31.21	26.92	26.42	
ZmCNIH1	6	80	75	86	87	126		63.77	56.12	42.95	43.59	48.67	46.38	42.38	42.38	44.83	41.72	38.96	39.86	45.77	39.73	37.41	34.25	32.14	30.71	30.28	30.99	33.33	28.21	28.30	
ZmaCNIH1	7	79	76	82	84	88	88		63.50	42.95	39.74	46.62	48.53	46.67	45.33	45.45	47.33	41.83	38.03	44.29	42.18	36.49	35.37	32.86	29.50	31.91	31.91	29.50	24.53	27.50	
ZmaCNIH3	8	74	72	78	73	82	78	87		43.31	38.85	42.95	48.89	45.03	42.38	44.37	44.37	40.26	41.96	42.14	39.46	35.81	33.78	34.51	32.86	34.51	35.92	33.57	23.12	26.88	
PpCNIH2	9	73	72	67	69	69	67	67	68		71.79	61.15	52.87	48.41	48.04	47.13	49.04	48.41	51.59	39.74	39.49	40.13	38.85	32.69	33.12	33.76	34.39	31.85	26.42	26.88	
PpCNIH1	10	67	65	64	66	70	68	62	61	112		56.05	45.86	43.95	43.95	42.68	47.13	43.95	44.59	32.69	38.22	39.49	37.58	29.49	29.94	31.21	30.57	26.75	25.79	24.30	
MpoCNIH	11	70	70	68	70	74	73	69	64	96	88		57.43	52.67	52.67	50.00	56.67	50.98	49.66	43.24	45.75	43.51	41.83	35.81	37.84	35.81	35.14	29.73	25.80	28.75	
SleCNIH	12	71	68	68	66	65	64	66	66	83	72	85		48.00	45.33	49.65	50.00	43.14	50.70	49.26	40.82	39.46	37.67	35.46	37.68	35.25	37.41	30.66	29.56	26.25	
OsCNIH2	13	72	70	66	68	67	64	70	68	76	69	79	72		87.25	70.47	71.81	60.53	45.70	42.00	45.75	38.31	40.13	30.87	31.54	30.20	33.56	28.67	29.56	29.56	
ZmCNIH2	14	68	68	64	65	66	64	68	64	77	69	79	68	130		74.50	69.13	61.84	46.36	40.00	47.06	38.31	39.47	30.87	32.89	29.53	32.21	28.67	28.30	30.19	
ZmCNIH3	15	67	63	63	62	66	65	65	63	74	67	74	70	105	111		59.06	53.95	42.07	36.11	43.62	36.42	35.57	31.47	29.37	31.47	34.97	28.47	26.42	27.84	
AcoCNIH	16	68	69	69	71	65	63	71	67	77	74	85	75	107	103	88		63.82	50.99	40.67	50.33	41.56	40.79	33.56	36.24	30.87	33.56	30.67	31.45	30.19	
ZmaCNIH2	17	69	62	64	63	64	60	64	62	76	69	78	66	92	94	82	97		43.51	39.87	44.87	36.94	35.48	26.97	28.29	26.32	28.61	24.84	27.84	27.84	
CbCNIH	18	58	61	57	55	59	57	54	60	81	70	74	72	69	70	61	77	67		34.48	38.10	36.49	34.69	33.80	35.21	34.51	36.62	34.51	30.82	28.75	
AtCNIH5	19	77	74	67	69	62	65	62	59	62	51	64	67	63	60	52	61	61	50		37.58	33.56	31.76	27.27	26.24	26.06	25.35	22.14	24.68	26.25	
AtCNIH1	20	59	56	60	62	59	58	62	58	62	60	70	60	70	72	65	77	70	56	56		47.97	47.62	31.51	30.82	24.66	26.03	27.89	21.38	25.16	
PtCNIH1	21	54	55	57	60	57	55	54	53	63	62	67	58	59	59	55	64	58	54	50	71		87.76	28.38	29.05	27.70	25.68	28.38	27.84	25.82	
PtCNIH2	22	49	52	52	54	53	50	52	50	61	59	64	55	61	60	53	62	55	51	47	70	129		26.71	27.40	27.40	26.03	26.53	25.95	25.16	
ScErv14	23	47	49	47	45	46	45	46	49	51	46	53	50	46	46	45	50	41	48	39	46	42	38		72.14	61.43	59.29	43.87	24.84	23.90	
CaCNIH	24	43	48	43	41	44	43	41	46	52	47	56	52	47	49	42	54	43	50	37	45	43	48	101		68.35	67.63	46.38	24.53	26.42	
AnCNIH	25	44	46	46	46	42	43	45	49	53	49	53	49	45	44	45	46	40	49	37	36	41	40	86	95		86.96	46.76	25.79	22.84	
NcCNIH	26	44	46	51	47	44	44	45	51	54	48	52	52	50	48	50	50	45	52	36	38	38	83	94	120		46.84	24.53	22.81		
SpCNIH	27	35	36	36	36	44	47	41	47	50	42	44	42	43	43	41	46	38	49	31	41	41	42	39	62	64	65	64		27.50	25.62
CreCNIH	28	43	44	39	39	42	44	39	37	42	41	40	47	47	45	42	50	43	49	39	34	43	41	39	39	41	39	41	39	44	37.74
DsCNIH	29	39	42	41	41	42	45	44	43	43	39	46	42	47	48	43	48	43	46	42	40	41	40	38	42	36	35	41	60		

Figura 16. Matriz de identidad para las proteínas de cornichon de organismos representativos de plantas, algas y hongos. Los valores de la esquina superior derecha corresponden al porcentaje de identidad de proteínas, mientras que la esquina inferior izquierda muestra el número de aminoácidos idénticos. Resaltado en negritas corresponde a las proteínas cornichon de musgo. Los datos fueron analizados con el software CLC Main Workbench 8.1. Ver Tabla S6.

Para conocer la posición evolutiva de las proteínas *PpCNIH1* y *PpCNIH2* con respecto a sus homólogos utilizados en este trabajo, se realizó un análisis filogenético simple utilizando el método UPGMA. Los resultados mostraron que las proteínas cornichon de estos organismos se agrupan en tres categorías principales, las cuales se muestra en la Figura 17. En el grupo A encontramos proteínas cornichon exclusivamente de algas que se separan de las demás proteínas cornichon, ya que tienen una identidad menor (entre 24-26%) en comparación con sus ortólogos en plantas y hongos; el grupo P corresponde a plantas y el grupo F a los hongos, respectivamente. De manera general, las proteínas cornichon de plantas se encuentran conservadas, por lo que podemos

sugerir que cumplen una función de receptores cargo similar a los homólogos en animales y hongos; sin embargo, la alta variabilidad en las secuencias de aminoácidos sugiere que las proteínas de plantas podrían tener funciones diferentes a las de otras especies de acuerdo con su historia evolutiva.

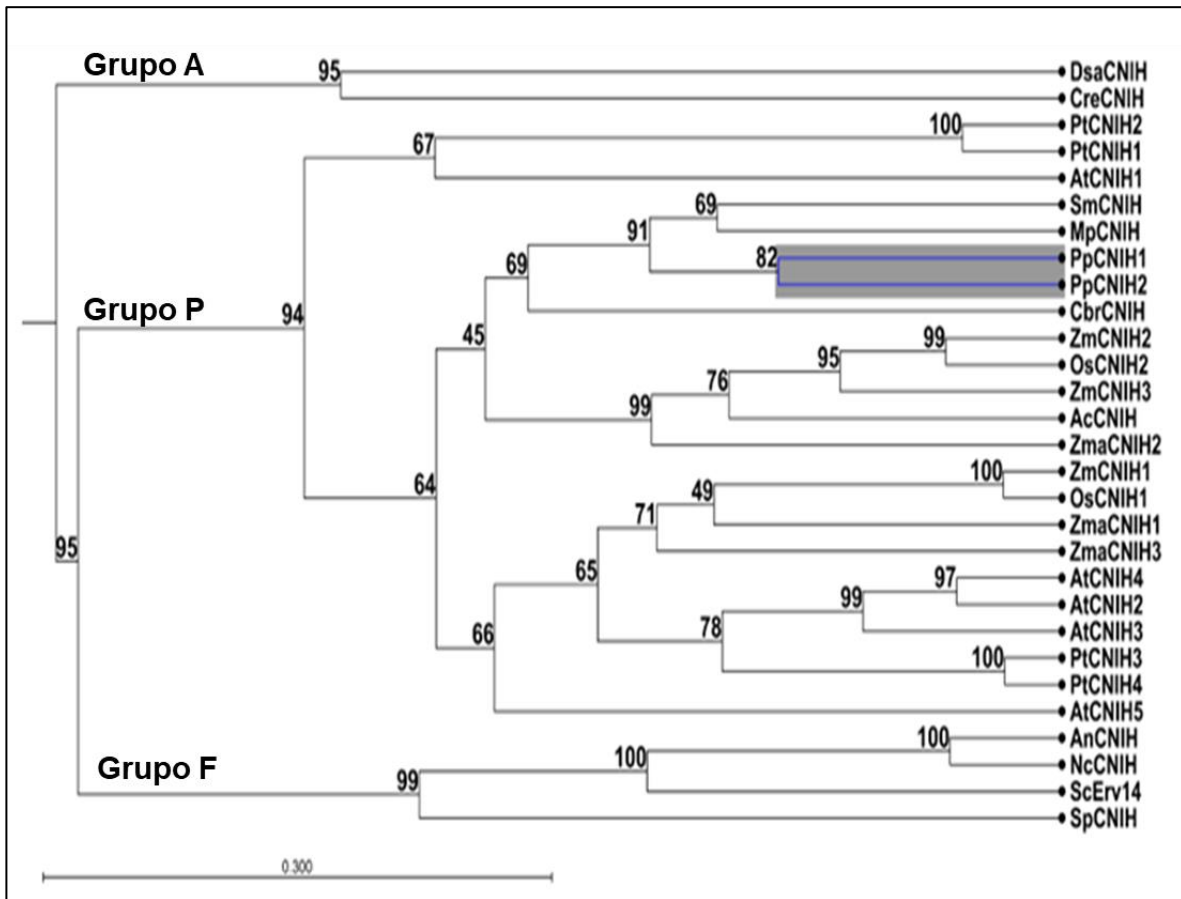


Figura 17. Árbol filogenético de homólogos de Cornichon. El grupo A está representado por algas, el grupo P corresponde a plantas y el Grupo F, correspondiente a hongos. Los valores representan el porcentaje de soporte de las ramas del árbol. Los datos fueron analizados con el software CLC Main Workbench 8.1.

6.2 Topología tridimensional de las proteínas CNIH1 y CNIH2

La estructura tridimensional de las proteínas constituye un factor importante para conocer su función o actividad. En el caso de la proteína homóloga a cornichon Erv14p, se ha predicho que posee tres dominios, con el amino-terminal (N-terminal, orientado en el lado citoplasmático, y el carboxilo-terminal (C-terminal),

orientado hacia el lumen de retículo endoplásmico (Powers and Barlowe, 2002); así mismo, se ha predicho con base a los niveles de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle que *OsCNIH1* también tiene una estructura como su homólogo en *S. cerevisiae* (Rosas-Santiago et al., 2015). Recientemente, con la ayuda de la microscopía electrónica criogénica o Cryo-EM (por sus siglas en inglés), se obtuvo la estructura tridimensional de las proteínas cornichon de ratón *MmCNIH2* y *MmCNIH3*, con lo que descubrió que éstas tienen cuatro dominios transmembranales, con sus regiones N-terminal y C-terminal expuestas al lado extracelular (Nakagawa, 2019; Zhang et al., 2021). Cabe mencionar que estas proteínas poseen dos inserciones que no se encuentran en las proteínas de hongos y de plantas.

Con el desarrollo de dos nuevos algoritmos para la predicción de estructuras proteicas, AlphaFold2 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) y RoseTTAFold (<http://rosetta.bakerlab.org>) analizamos la estructura molecular de las proteínas cornichon de *P. patens*. De acuerdo con los resultados obtenidos, las predicciones mostraron que las proteínas *PpCNIH* poseen cuatro hélices alpha que corresponden a los cuatro dominios transmembranales (Figura 18), similar a las proteínas *MmCNIH2* y *MmCNIH3* de ratón. Además, de acuerdo con la predicción, se observa que la región C-terminal de ambas proteínas cornichon se pliega en una estructura de hélice alfa. Estudios adicionales podrían ayudar a identificar la posible función de este arreglo tridimensional.

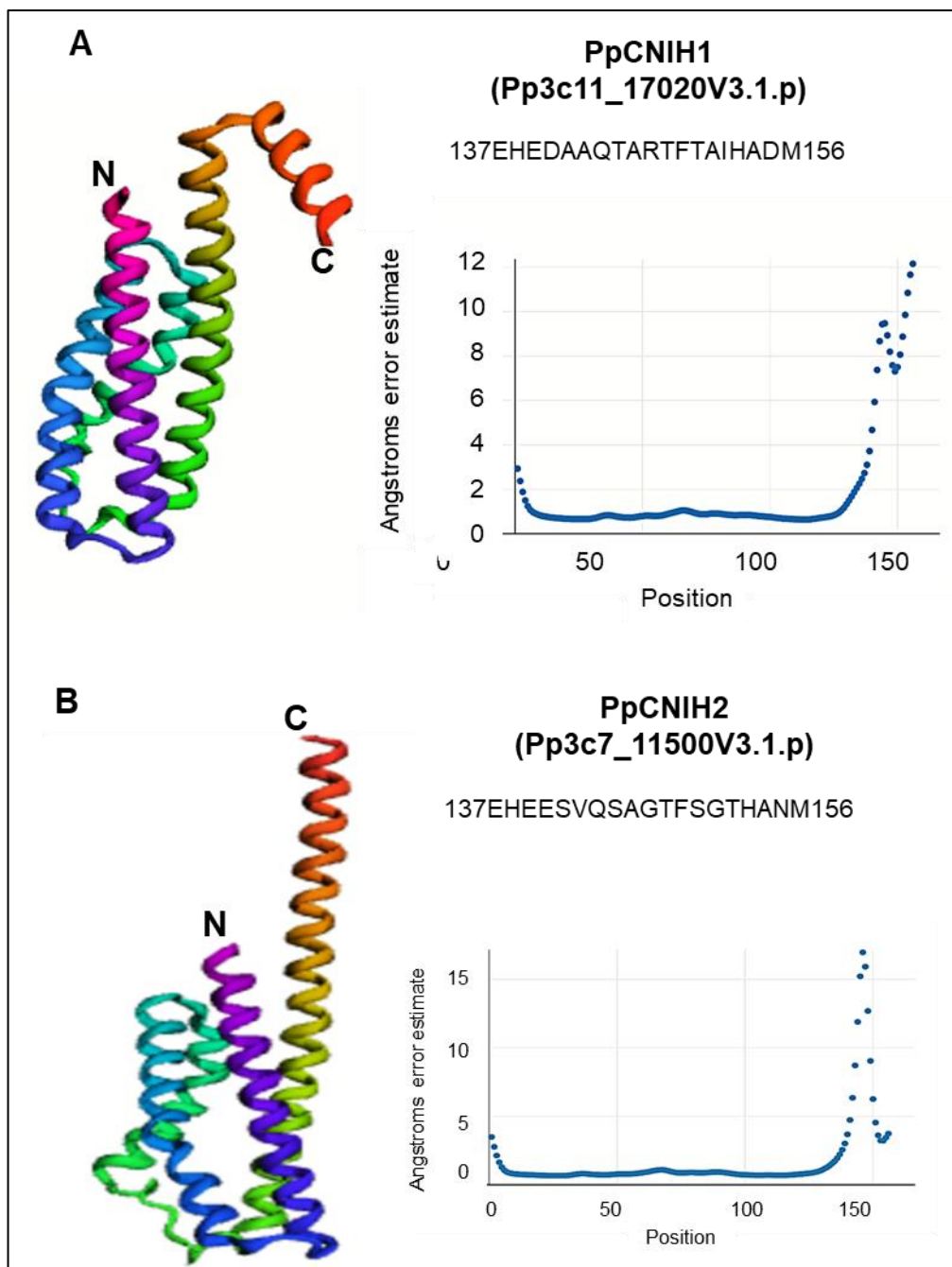


Figura 18. Estructura 3D predicha de las proteínas CNIH1 y CNIH2. La predicción de la estructura tridimensional de las secuencias de aminoácidos de cornichon CNIH1 **(A)** y CNIH2 **(B)** se utilizó como plantilla para el servidor Robetta (<http://robetta.bakerlab.org>). Las imágenes resaltan los aminoácidos que corresponden al C-terminal de cada cornichon del musgo, comenzando desde la posición 137 a la 156. Los gráficos muestran la estimación del error en Angstrom para cada posición de aminoácido de CNIH1 y CNIH2, respectivamente.

6.3 Localización subcelular de las proteínas CNIH1 y CNIH2

Para conocer la localización subcelular de CNIH1 y CNIH2 en las células del musgo, se hicieron fusiones traduccionales en el carboxilo terminal con la proteína fluorescente monomérica EGFP (mEGFP), bajo la expresión constitutiva del promotor de ubiquitina de maíz ó *ZmUbi*. Con estas construcciones se transformaron protoplastos de *P. patens* y después de una semana se observó fluorescencia en células del protonema. Como se ha visto en otras especies, las proteínas CNIH1 y CNIH2 se localizan en estructuras reticulares, con apariencia tubular y de cisterna, características del retículo endoplásmico (RE) (Harant and Lang, 2020). También se observó que la fluorescencia asociada a ambas proteínas se localiza en puntos dispuestos sobre el RE. Además, observamos que la fluorescencia se localizó alrededor del núcleo, lo que sugiere que se trata de retículo perinuclear, y también observamos su localización en la periferia de la célula, lo cual es característico del RE cortical (Figura 19). Para determinar las estructuras a las cuales se asocian las proteínas cornichon, se optó por realizar un ensayo de co-localización en las células del protonema del musgo, sin embargo, se observó que la sobre-expresión de las fusiones traduccionales afectaba seriamente el crecimiento del musgo (Figura 19B), lo cual impidió la realización de estos análisis.

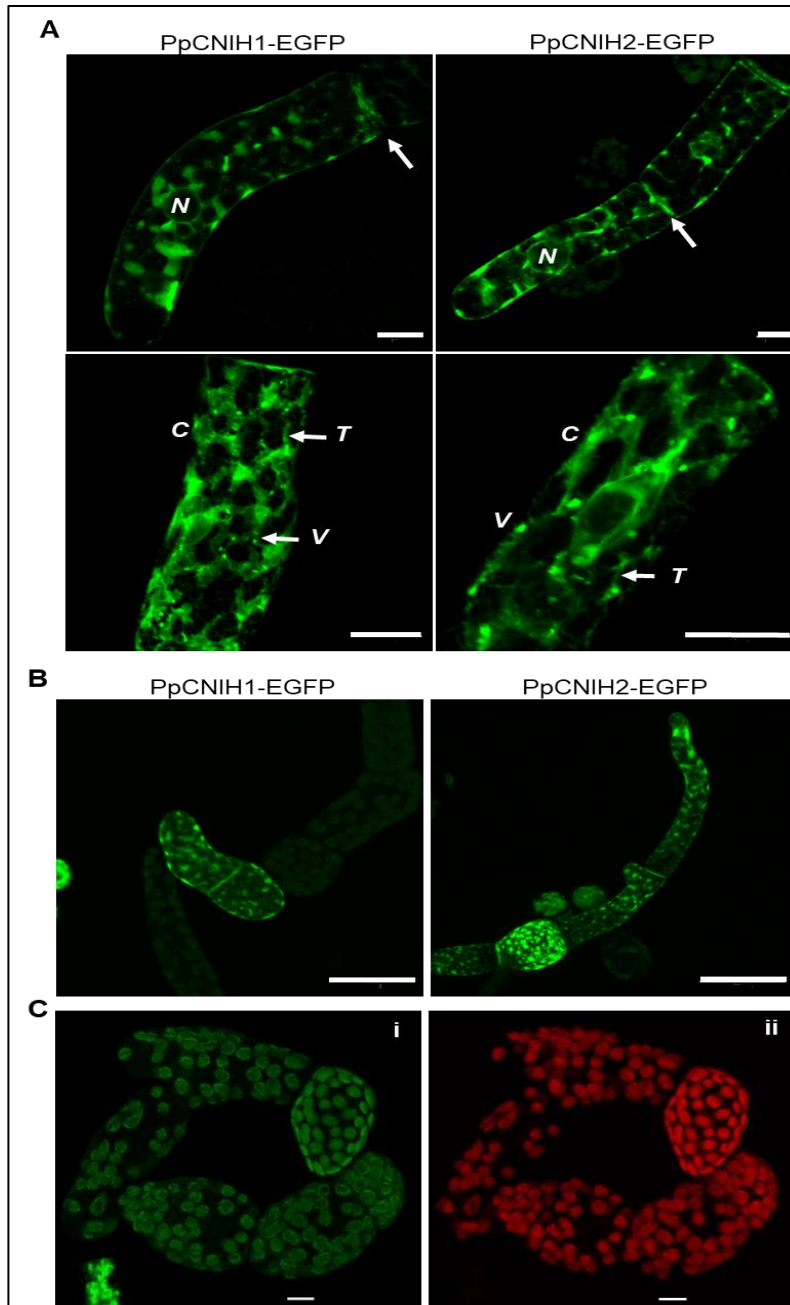


Figura 19. Localización subcelular de las proteínas cornichon en el musgo. A) Imagen confocal que muestra la localización subcelular de *ZmUbi*pro::PpCNIH1-EGFP expresado transitoriamente (columna izquierda) y *ZmUbi*pro::PpCNIH2-EGFP (columna derecha) en células del protonema apicales de siete días. Las flechas indican la localización en la placa celular de ambas proteínas (primera fila). N = núcleo. Identificación de cornichones de musgo en los subdominios de RE como túbulos (T) y cisternas (C), y en puntos asociados al ER (V) (segunda fila), escala 10 μ m. **B)** Imagen confocal que muestra el protonema de siete días después de la regeneración de protoplastos transformados con construcciones para su sobreexpresión. El desarrollo del protonema se vio afectado por la sobreexpresión de proteínas cornichon del musgo, escala 50 μ m. **C)** Protonemas silvestres. La imagen de la izquierda muestra el canal de emisión para la proteína EGFP (520 nm) por lo que se observa la autofluorescencia de la clorofila (i). La imagen de la derecha muestra la autofluorescencia de los cloroplastos (emisión a 633 nm, ii). Escala 100 μ m.

Posteriormente se utilizó el sistema de CRISPR-Cas9 y HDR para generar líneas estables que expresan las proteínas cornichon fusionadas a la proteína fluorescente mRuby bajo el control de sus promotores endógenos (líneas knock-in), y en diferentes líneas con marcadores de compartimentos de la vía secretoria temprana como ER-GFP-Higro, Golgi-YGP-Kan y Sec24C-EGFP-Higro. La estrategia fue fusionar hacia la parte carboxilo terminal de *PpCNIH1* y *PpCNIH2*, tres veces la región codificante de la proteína fluorescente mRuby, utilizando el sistema de CRISPR-Cas9 y HDR (Figura 20A); esto con el fin de evitar problemas con la selección del antibiótico y asegurar la emisión de la fluorescencia en las células del musgo; sin embargo, desafortunadamente, no se logró obtener líneas transgénicas CNIH1-3xmRuby o CNIH2-3xmRuby en ninguna de las línea celulares, posiblemente por la baja eficiencia del sgRNA. Sin embargo, si se obtuvo la línea CNIH2-3xmRuby en el fondo silvestre, por lo tanto, se continuó con la caracterización de esta línea transgénica.

En la Figura 20 se muestra la caracterización genética y morfológica de esta línea CNIH2-3xmRuby. Para identificar que la inserción de la fusión traduccional en el extremo C-terminal de CNIH2 fuese la correcta se realizó una prueba de PCR con oligonucleótidos que flanquean al sitio de inserción de la secuencia 3mRuby. Con estos se obtiene un amplificación de 2,699 nt en la recombinante, y uno de 557 nt en la línea silvestre (Figura 20B). Para corroborar que la fusión no afectó al desarrollo del musgo, se realizó un ensayo en colonia. Las colonias de los musgos transgénicos crecieron de forma similar a las colonias de los musgos silvestres (Figura 20C).

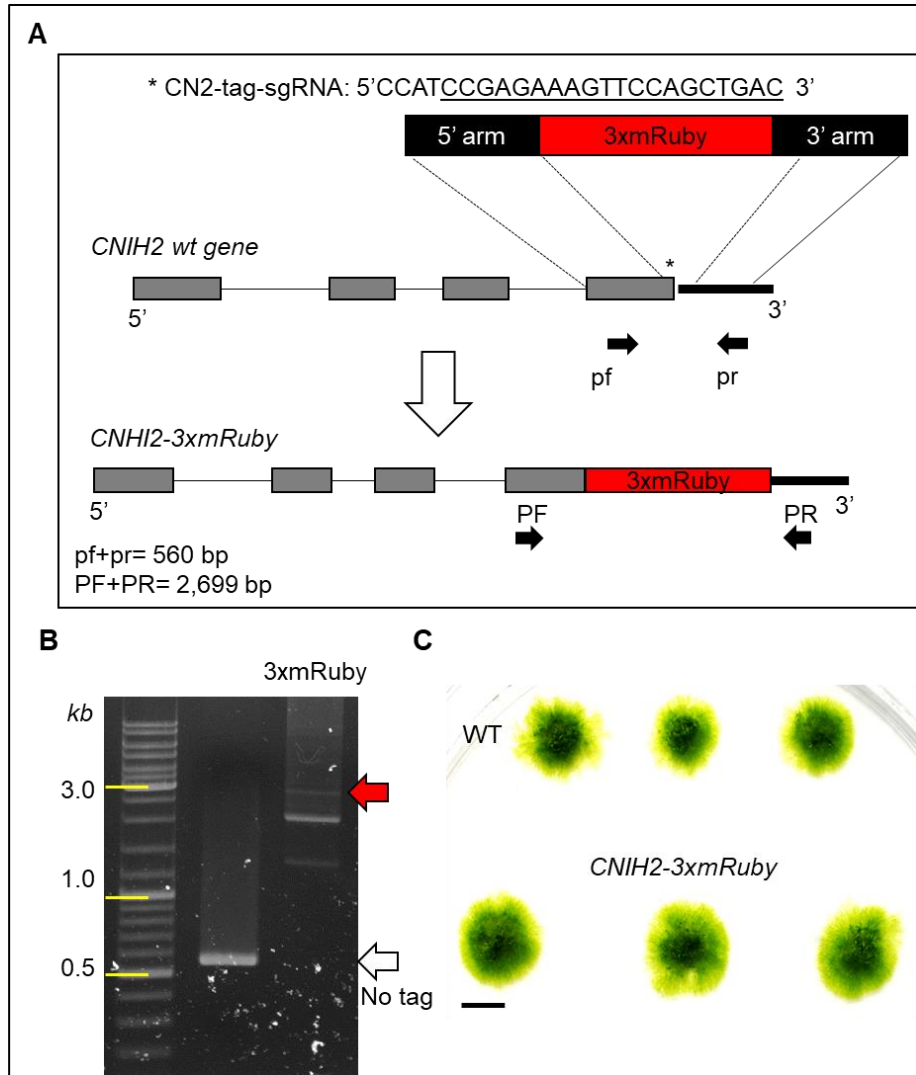


Figura 20. Generación de línea CNIH2-3xmRuby por CRISPR-Cas9 & HDR. A) Diseño y representación de la línea estable CNIH2-3xmRuby en el extremo C-terminal del gen. Guía de la secuencia del sgRNA para generar una doble ruptura en el ADN (asterisco) y secuencia de codificación 3xmRuby flanqueada por secuencias homólogas de recombinación. Los cebadores pf y pr amplificaron un fragmento de 557 pb por PCR en línea WT sin insertar la etiqueta. Los cebadores PF y PR amplificaron un fragmento de 2699 pb por PCR en línea con la inserción de una etiqueta 3xmRuby. **B)** Gel de agarosa al 1 % que muestra los productos de PCR esperados en la línea knock-in CNIH2-3xmRuby (flecha roja) y sin ninguna etiqueta (flecha blanca). **C)** Imágenes de colonias de musgo de la línea CNIH2-3xmRuby cultivadas junto con la línea WT. Escala= 2 mm.

Una vez obtenida la línea transgénica, se propagó hasta tener tejido fresco y homogéneo para observar la localización de CNIH2 en el protonema en un microscopio confocal. La fluorescencia asociada a CNIH2-3xmRuby se identificó principalmente en puntos móviles que se concentraban en la parte apical de la célula del protonema (Figura 21A). También se observó que estos puntos se localizaban alrededor del núcleo y entre las uniones celulares. Este tipo de compartimento subcelular es similar al aparato de Golgi o a los sitios de salida del retículo (ERES) característicos en plantas. Para discriminar entre estos dos sitios, se realizó un ensayo con el inhibidor brefeldina A (BFA). Se sabe que en plantas la BFA inhibe a pequeñas GTPasas del tipo ARF que participan en el tráfico retrogrado del Golgi al RE, causando estructuras agregadas del Golgi, llamados cuerpos de brefeldina (Chardin and McCormick, 1999). En el musgo, se ha reportado que la BFA colapsa la estructura del Golgi causando que la fluorescencia se observe en el retículo endoplásmico (Roberts et al., 2018). Por lo cual la línea CNIH2-3xmRuby se trató con 50 μ M de BFA por 24h; como control positivo se empleó una línea que expresaba la manosiltransferasa de soya fusionada a la proteína fluorescente YFP (YFP-Gman), marcador del aparato de Golgi, en específico del cis-Golgi (Figura 21 B). A las 24 h se observó que, en la línea reportera del Golgi, la fluorescencia ya no estaba en puntos/vesículas, sino que se observó de manera difusa en el RE (Figura 21 B, inferior derecho). Sorpresivamente, la localización de CNIH2 no mostró ningún cambio ante el inhibidor (Figura 21B), sugiriendo que CNIH2 no es una proteína residente de Golgi y/o que probablemente no tiene contacto con el cis-Golgi, a diferencia de su homólogo Erv14p, el cual se sabe que oscila entre el RE y el AG. Estos resultados nos condujeron a preguntarnos si la identidad de esas estructuras punteadas correspondía a los sitios de salida del RE o ERES. Para esto se utilizó SEC23G ya que se observó que su localización (Chang et al., 2022) era muy similar a la localización de CNIH2. Por lo tanto, en el fondo genético de CNIH2-3xmRuby se generó una línea marcadora de SEC23G, tal como se muestra en la Figura 22A-B. Esta línea transgénica no afectó el crecimiento del musgo (Figura 22 C).

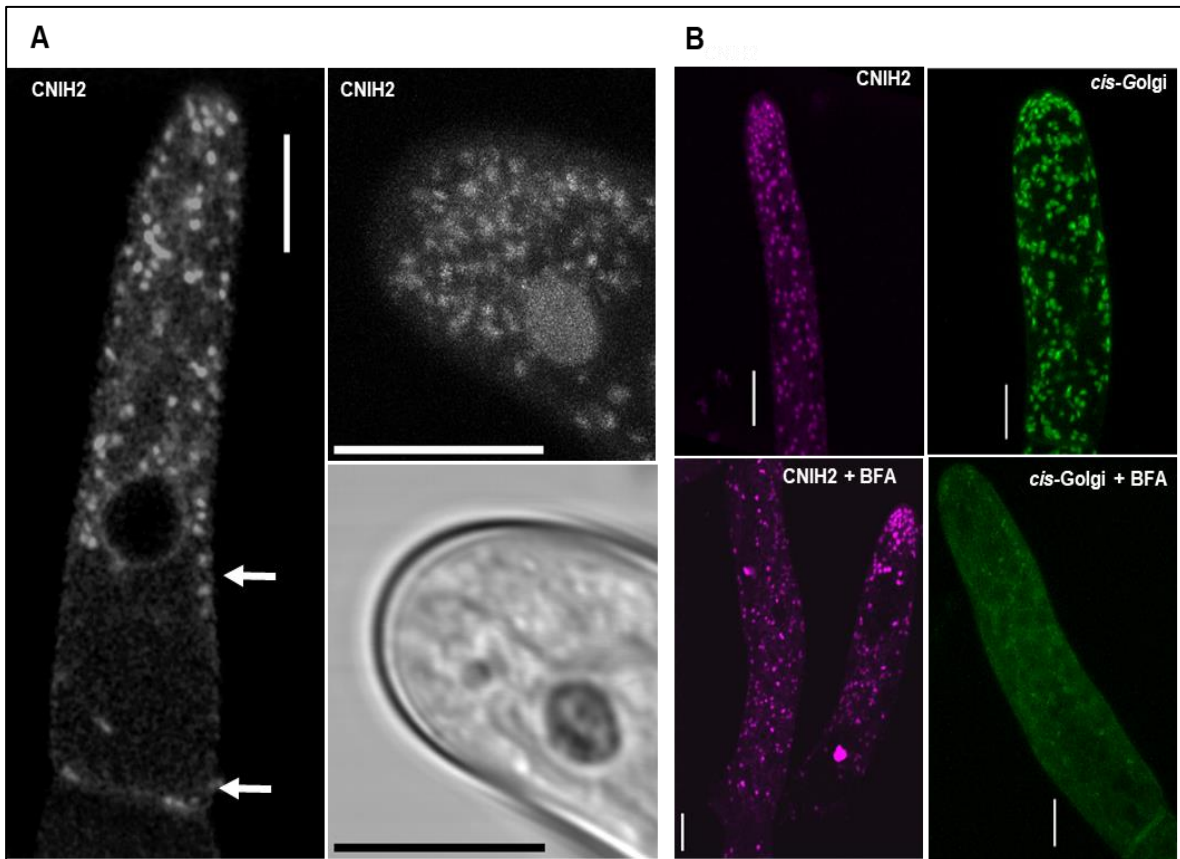


Figura 21. CNIH2 se localiza en el ER y en puntos insensibles a BFA. A) La localización subcelular de CNIH2 endógeno en la célula apical del protonema se observa en el retículo endoplásmico y puntos asociados (izquierda) y concentrado en la zona apical (derecha); imagen confocal tomada de la línea de musgo transgénico CNIH2-3xmRuby; las flechas indican la localización en la periferia de la célula; escala 10 μm . **B)** Localización subcelular de CNIH2-3xmRuby (izquierda) y YFP-GmMan (cis-Golgi, derecha;) en la célula apical del protonema antes (arriba) y después de la exposición a 50 μM de brefeldina A durante 24 h (+BFA; abajo); escala 10 μm

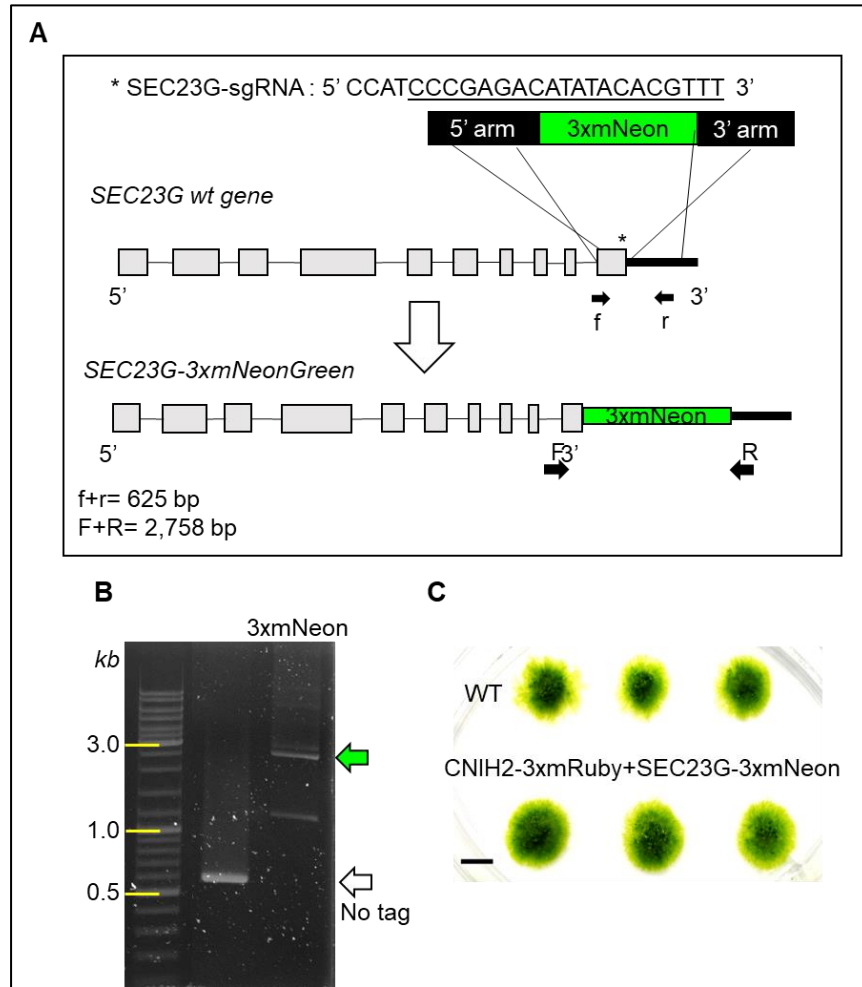


Figura 22. Generación de la línea SEC23G-3xmNeon por CRISPR-Cas9 & HDR. A) Diseño y representación de la línea estable SEC23G-3xmNeon en el extremo C-terminal del gen. Guía de la secuencia de sgRNA para generar una doble ruptura en el ADN (asterisco) y secuencia de codificación 3xmNeon flanqueada por secuencias homólogas de recombinación. Los cebadores f y r amplificaron un fragmento de 625 pb por PCR en la línea WT sin insertar la etiqueta. Los cebadores F y R amplificaron un fragmento de 2,758 pb por PCR con la inserción de una etiqueta 3xmNeon. **B)** Gel de agarosa al 1% que muestra los productos de PCR esperados en la línea knock-in CNIH2-3xmNeon (flecha verde) y sin ninguna etiqueta (flecha blanca). **C)** Imágenes de colonias de musgo de la línea CNIH2-3xmRuby + SEC23G-3xmNeon cultivadas junto con la línea WT. Escala= 2 mm.

La fluorescencia asociada a SEC23G se observó en puntos móviles en la célula apical del protonema, similar a la localización subcelular de CNIH2. También se observó que algunos puntos asociados a SEC23G-3xmNeon y CNIH2-3xmRuby co-localizaban (Figura 23A). Para cuantificar el grado de co-localización de estos puntos, se realizó un análisis cuantitativo utilizando el coeficiente de correlación de

Pearson a partir de las imágenes de seis diferentes células apicales del protonema, obteniendo un valor de p promedio de 0,66, lo cual muestra que existe una co-localización parcial de estas dos proteínas (Figura 23B). Para corroborar que el análisis de co-localización fue significativo, las imágenes correspondientes a Sec23G se giraron horizontal o verticalmente, y se repitió el análisis de co-localización, observando que los coeficientes de correlación fueron significativamente más bajos (Figura 23B), aunado a este análisis de co-localización, en las células apicales del protonema se cuantificó el tamaño de las vesículas que corresponden a CNIH2, SEC23G y al subcompartimento del cis-Golgi. Los resultados mostraron que los tamaños son muy similares entre CNIH2 y SEC23G pero ambos son distintos al tamaño del cis-Golgi, en conjunto estos análisis nos sugieren que CNIH2 se localiza en una población específica de ERES que comparte parcialmente con la proteína Sec23G.

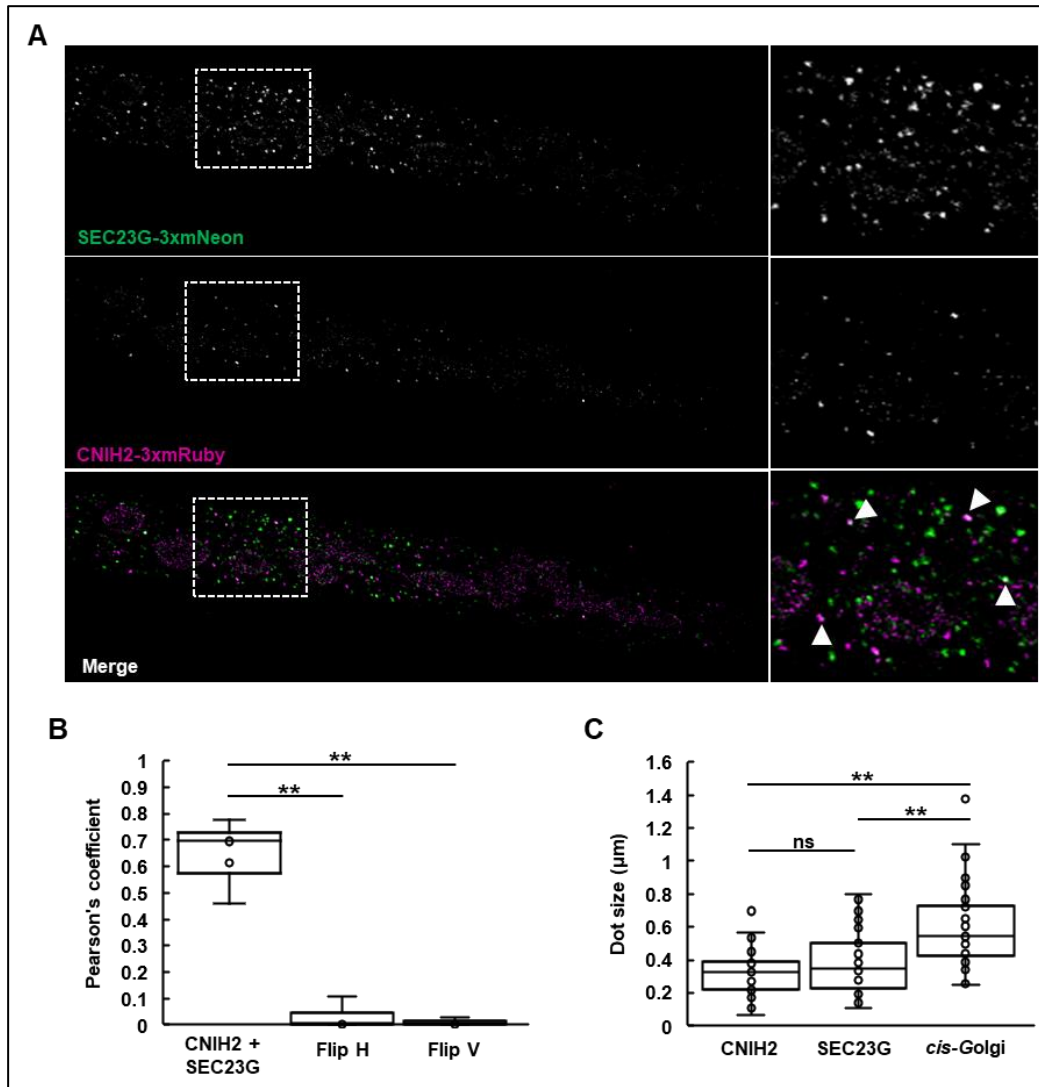


Figura 23. CNIH2 se localiza en ERES asociados a SEC23G. A) (izquierda) localización de CNIH2 (arriba) y SEC23G (media) endógenas en una célula apical del protonema; co-localización de las dos proteínas (abajo); (derecha) ampliación de la región delimitada (cuadrado discontinuo), las flechas muestran la co-localización de ambas proteínas. Proyección Z representativa con imagen confocal de máxima intensidad; escala 10 μm . **B)** Coeficiente de correlación de Pearson calculado a partir de proteínas marcadas con CNIH2 y SEC23G endógenas en comparación con imágenes invertidas de SEC23G horizontales y verticales, se realizó la prueba t para estadística ($p \leq 0.001$); $n = 6$. **C)** Tamaño de vesícula para CNIH2 ($0,38 \pm 0,18 \mu\text{m}$), SEC23G ($0,32 \pm 0,13 \mu\text{m}$) y cis-Golgi ($0,59 \pm 0,24 \mu\text{m}$) de células protonemales; $n = 35$. Los datos son la media \pm DE; se realizó la prueba t para las estadísticas (ns, $p \geq 0,05$; *, $p \leq 0,05$).

6.4 Obtención de mutantes cornichon

Los fondos genéticos que se utilizaron para obtener mutantes fue la línea silvestre WT y la línea reportera PpPINApr::PpPINA-EGFP (PINA-EGFP) que se describió en la sección 5.2 de Materiales y métodos. Para evaluar la función de *CNIH* en el musgo, se generaron las mutantes sencillas *cnih1* en estos fondos. En este trabajo no fue posible obtener una mutante nula del gen *CNIH1* mediante la técnica de recombinación homóloga, sino que fue necesario utilizar el sistema CRISPR-Cas9.

Para identificar mutantes CRISPR de *CNIH1* en los fondos genéticos WT, PINA-EGFP y doble mutante, se diseñó un par de oligonucleótidos que amplificaran regiones iguales o menores a 1Kb correspondientes a cada uno de los cuatro exones que conforman el gen. Las regiones correspondientes al primer exón y cuarto exón del gen *CNIH1* no mostraron cambio en el peso molecular. En las regiones correspondientes al segundo y tercer exón, se obtuvo un producto de PCR de 1,000 pb, indicando que los sgRNA guías del segundo y tercer exón ocasionaron una interrupción de 300 pb, en contraste con el producto de PCR esperado de 1,300 pb proveniente del ADN genómico silvestre (Figura 24A y B), por lo que se escogieron algunas clonas que tuvieran este tipo de mutación. En cada fondo genético se genotipificaron al menos 24 clonas diferentes de dos transformaciones independientes, de las cuales se identificaron seis posibles mutantes sencillas *cnih1* (clonas 2, 6, 9, 11, 13 y 23), cuatro de ellas (clonas 2, 6, 13 y 23) se secuenciaron para comprobar que se había generado una mutación. Las dos mutantes sencillas en el fondo PINA-EGFP (clonas A2 y B5), las cuales también se secuenciaron para confirmar la mutación. Este gen mutante ocasionó la fusión de dos exones, generando un nuevo marco de lectura, el cual podría codificar para un transcrito de 295 pb que incluye el primer exón, seguido de 57 pb correspondientes al primer intrón y finalmente la región del cuarto exón (Figura 24 A).

Para corroborar si se expresaba el transcrito de esta versión mutante de *CNIH1* en los dos fondos mutantes se eligieron las mutantes sencillas 6, 23, A2, y para la

doble mutante se eligieron las colonias 12 y 19. Se extrajo el ARN total, seguido de la síntesis del ADNc, y finalmente se realizó una PCR para amplificar el transcrito mutante *CNIH1* (Figura 24C).

Debido que todas las líneas mutantes contenían la misma mutación, solo se consideró tomar el transcrito mutante de la línea *cnih1-6* para clonarse en el plásmido pDONR221 y su identidad se confirmó por secuenciación. De acuerdo con estos resultados, se generó un codón de terminación prematuro en el marco de lectura abierto en la posición 132 de los nucleótidos, que predice la codificación para un péptido de 43 aminoácidos (5 kDa).

Las líneas mutantes sencillas *cnih1-6* y 23 se utilizaron para caracterizar defectos en el fenotipo, mientras que las líneas mutantes sencillas *cnih1* A2 y B5 PINA-EGFP se utilizaron para observar cambios en la localización del transportador PINA.

Para el gen *CNIH2*, se generó la mutante nula por recombinación homóloga, en los fondos silvestre y PINA-EGFP para obtener las mutantes sencillas. En el caso de la doble mutante se utilizó la línea mutante sencilla *cnih1-23* y se reemplazó el gen *CNIH2* por un casete de resistencia a higromicina, mediante recombinación homóloga, tal como se describió en la sección de materiales y métodos.

Para confirmar la generación de la mutante $\Delta cnih2$ se realizó una PCR para amplificar los fragmentos esperados de 6,035 pb para el ADN genómico mutante y de 5,331 pb para el ADN genómico silvestre utilizando los oligonucleótidos 327-Fw y 328-Rv (Figura 25 A, B, 1+2). Asimismo, en otra reacción de PCR, utilizando los oligonucleótidos 327-Fw y 319-Rv, se obtuvo la amplificación de un fragmento de 3,059 pb correspondiente a la región genómica homóloga 5' y la secuencia codificante 5' del casete de higromicina, como se esperaba (Figura 25 A, B, 1+F). Mediante el uso de los oligonucleótidos 320-Fw y 328-Rv, también se obtuvo un segundo fragmento de PCR de 4,120 pb correspondiente a la región genómica homóloga 3' y la secuencia del casete de higromicina, como se anticipó (Figura 25 A, B 2+R).

De 55 posibles transformantes, sólo las mutantes sencillas $\Delta cnih2$ -3, 26, 38 y 55 fueron positivas, de las cuales se escogieron dos. Para las dobles mutantes se obtuvieron ~60 posibles transformantes de las cuales solo se genotipificaron 48, solo las mutantes $cnih1-23 \Delta cnih2$ -12, 19 y 37 resultaron positivas. Para la generación de la mutante sencilla $\Delta cnih2$ en el fondo PINA-EGFP se obtuvieron 48 posibles transformantes de las cuales las líneas 3, 5 y 22 resultaron positivas.

Para corroborar que no hubiera expresión de *CNIH2*, se escogieron aleatoriamente dos mutantes de cada fondo genético, las cuales fueron las mutantes sencillas 3 y 38, la mutante sencilla 3 en el fondo PINA-EGFP, y las dobles mutantes 12 y 19. Para esto se extrajo ARN total de cada línea mutante, seguido de la síntesis del ADNc y finalmente se realizó una PCR para amplificar 260 pb parte del transcrito que corresponde a *CNIH2* (Figura 25 C). Las líneas mutantes sencillas $\Delta cnih2$ -3 y 38, y las mutantes dobles $cnih1-23 \Delta cnih2$ -12 y 19 se utilizaron para caracterizar defectos en el fenotipo, mientras que las líneas mutantes sencillas $\Delta cnih2$ 3 y 5 PINA-EGFP, se utilizaron para observar cambios en la localización del transportador PINA.

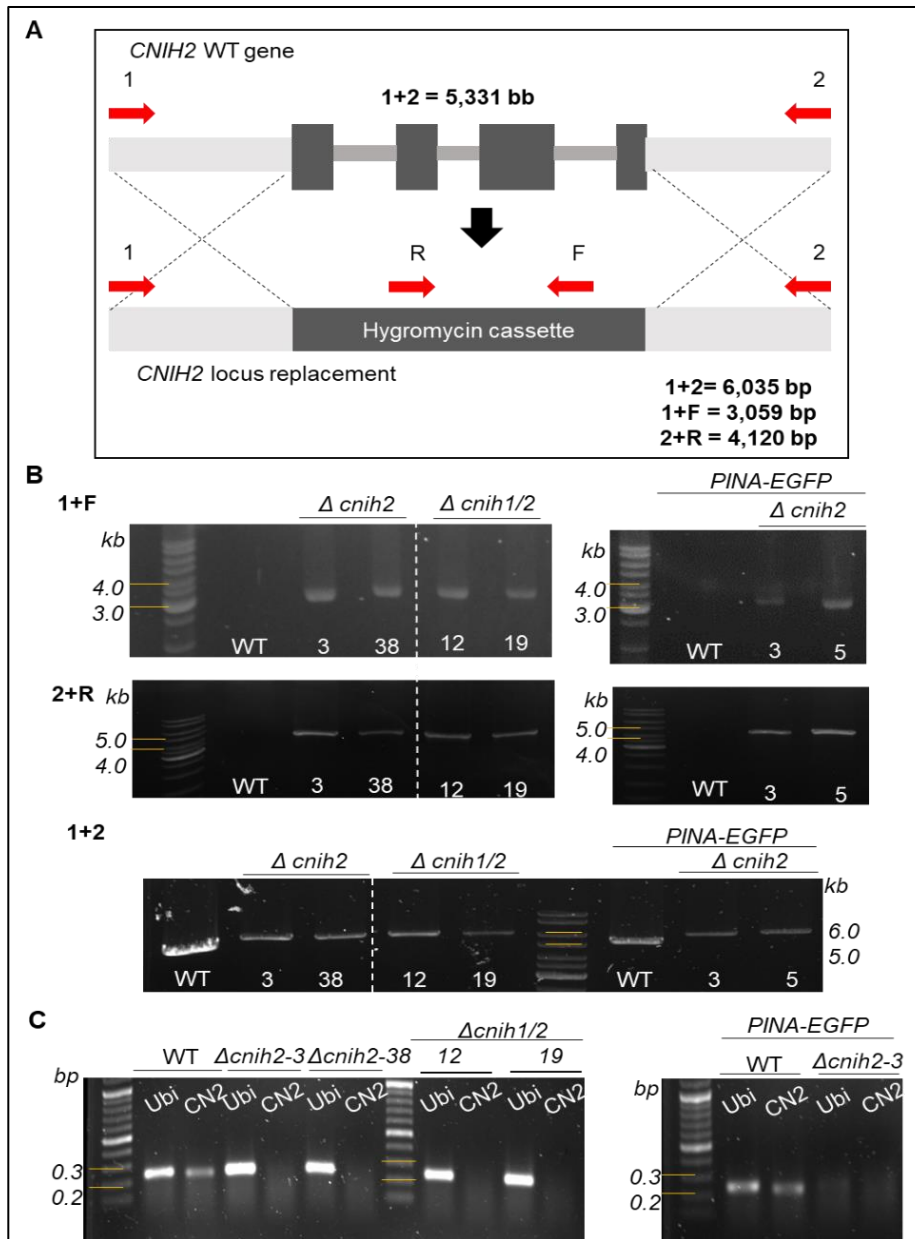


Figura 25. Generación de mutantes $\Delta cniH2$ y su genotipificación. **A)** Estrategia de interrupción de *CNIH2* y los oligonucleótidos (flechas rojas) para análisis genéticos. Las flechas 1 y 2 corresponden a los oligonucleótidos 327-Fw y 328-Rv, respectivamente; las flechas F y R corresponden a los oligonucleótidos 319-Fw y 320-Rv, respectivamente. **B)** Gel de ADN de agarosa (1 %) que muestra la presencia y el reemplazo por el casete de higromicina por productos amplificados por PCR de líneas mutantes sencillas $\Delta cniH2$ (3 y 38) y WT; mutantes dobles $\Delta cniH1/2$ (12 y 19), y mutantes sencillas $\Delta cniH2$ (3 y 5) en la línea genética PINA-EGFP. **C)** El gel de ADN de agarosa (1 %) muestra bandas de PCR amplificadas del ADNc de *CNIH2* (260 pb) en líneas WT y PINA-GFP, en comparación con la ausencia del transcrito de ARNm de *CNIH2* en las líneas mutantes simples $\Delta cniH2$ (3 y 38), líneas mutantes dobles *cniH1* $\Delta cniH2$ (12 y 19) y línea $\Delta cniH2$ /PINA-GFP (3).

6.5 Los genes *CNIH* participan en procesos de división celular y ramificación del protonema

Para evaluar los posibles cambios morfológicos generados por las mutantes sencillas y doble, analizamos el desarrollo de los musgos en tres etapas diferentes. Primero, evaluamos si el protonema mostraba defectos de crecimiento. Para esto, se hicieron protoplastos de las líneas mutantes sencillas *cnih1-6*, *cnih1-23*, Δ *cnih2-3*, Δ *cnih2-38* y de las líneas mutantes dobles *cnih1* Δ *cnih2-12* y *cnih1* Δ *cnih2-19* en conjunto con la línea silvestre (WT), se crecieron cuatro días en medio de regeneración de protoplastos y después, tres días en medio normal de crecimiento *PpNH4*. Los protonemas de siete días de edad se montaron en un portaobjetos y se visualizaron en un microscopio invertido.

De acuerdo con los resultados, todas las mutantes no presentaron un fenotipo letal, ya que observó que los protonemas pudieron regenerarse de los protoplastos y crecer, en apariencia, similar al silvestre. Sin embargo, en las mutantes observamos algunas anomalías que alteraron la forma del crecimiento del protonema. En las mutantes *cnih1* y la mutante doble *cnih1* Δ *cnih2* encontramos que el protonema presentó divisiones aberrantes que resultaron en la formación de células más pequeñas o de células que resultaron de una división incompleta (Figura 26A).

También observamos que, en las mutantes, algunas de las células iniciales laterales del protonema frecuentemente estaban en posiciones anormales. En los protonemas del tipo silvestre, las células iniciales laterales iniciaban casi exclusivamente en el extremo apical de las células subapicales, como se ha reportado anteriormente, pero en las mutantes de cornichon *cnih1* y *cnih1* Δ *cnih2*, las células iniciales laterales a menudo se forman en una posición más proximal, en el centro de las células subapicales (Figura 26A). Para corroborar estas observaciones, cuantificamos la frecuencia de células iniciales laterales con crecimiento anormal, observando que en las mutantes sencillas *cnih1* había aproximadamente 22-26% y en las mutantes Δ *cnih2* el 3-17% mostraron este fenotipo, mientras que no se observó ninguna en el WT. Sin embargo, para las

mutantes dobles *cnih1Δcnih2*, el fenotipo fue similar que la mutante sencilla de *cnih1*, con 27-39% de las células iniciales laterales anormales presentes en el medio de la célula subapical (Figura 26B). Se observaron alteraciones adicionales en la morfología de los protonemas solo para la mutante sencilla $\Delta cnih2$, incluido un aumento en el número de células iniciales laterales (Figura 26C), las cuales son importantes para la ramificación del protonema y su posterior expansión de la colonia del musgo. Estos resultados sugieren que los genes *cornichon* de manera general participan en el patrón del crecimiento lateral en el protonema el cual es necesario para la expansión del musgo.

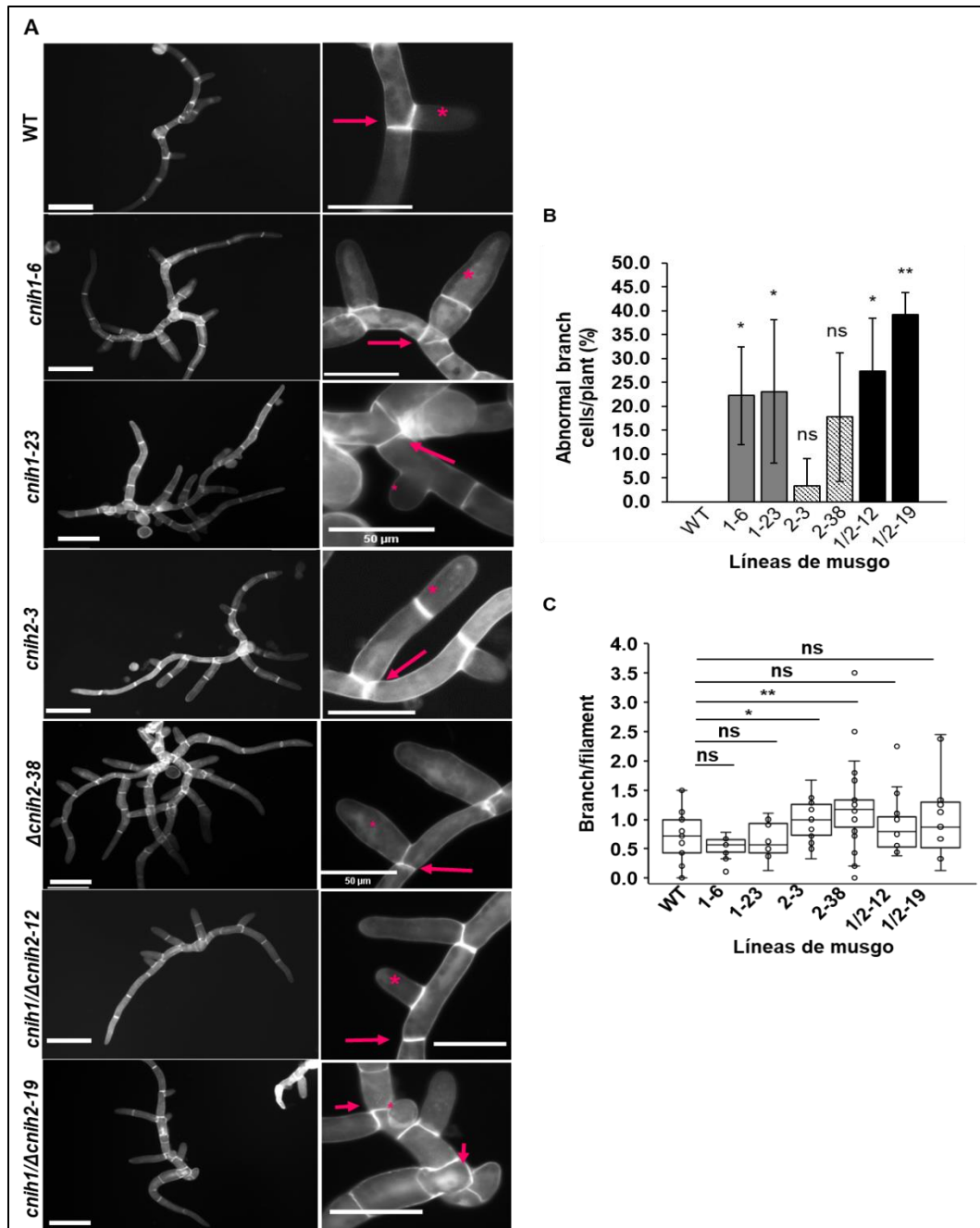


Figura 26. Las mutantes de Cornichon tienen defectos en el crecimiento lateral del protonema. A) Protonema de la línea WT y líneas mutantes teñidas con Calcofluor White después de un crecimiento de siete días, visualizado en un microscopio de epifluorescencia; escala 100 μm . Las ampliaciones muestran la división celular (flecha) y la célula inicial lateral (*). Escala 50 μm . **B)** Promedio de la frecuencia de células iniciales laterales normales/anormales por planta a los 7 días, $n \geq 10$; **C)** Cuantificación del número total de células laterales del protonema dividido por el número total de células por filamento principal del protonema a los 7 días, $n \geq 11$. se realizó la prueba t Student (ns $p \geq 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

6.6 *CNIH2* está involucrado en la diferenciación temprana del caulonema

Continuando con el análisis del protonema de las líneas mutantes, se observó que las células apicales del protonema de las mutantes *cnih1* y *cnih1Δcnih2* estaban cortas, anchas y las paredes transversales que se formaron eran perpendiculares al eje largo del filamento. También observamos que estas células apicales estaban llenas de cloroplastos, lo que lo que las identifica como células del cloronema (Figura 27A). Por el contrario, las células apicales del protonema de las mutantes *Δcnih2* eran alargadas, delgadas y las paredes transversales que se formaban eran oblicuas al eje largo del filamento, características que corresponden a las células del caulonema (Figura 27). La diferenciación del caulonema se llega a observar a partir de los 10-12 días de crecimiento del protonema (Thelander et al., 2005). Para conocer si existía un desarrollo prematuro del caulonema en las mutantes *cornichon*, se calculó la proporción de caulonema/cloronema del protonema de una semana de edad y se comparó con la línea silvestre (Figura 27B). Valores cercanos a 0 indican un desarrollo silvestre de crecimiento en el protonema, mientras que valores cercanos a 1 indican un desarrollo prematuro del caulonema en el protonema. De acuerdo con los resultados la línea WT tuvo un valor de 0.152 ± 0.05 (n=14), lo cual indicó que los protonemas tienen más células del cloronema; en tanto que, para las mutantes *cnih1-6* y *cnih1-23*, los valores fueron 0.115 ± 0.07 (n=14) y 0.122 ± 0.09 (n=12), respectivamente, mientras que los valores para las dobles mutantes *cnih1Δcnih2-12* y *cnih1Δcnih2-19* fueron de 0.199 ± 0.068 (n=15) y 0.144 ± 0.03 (n=12), respectivamente, lo que indicó que estas líneas mutantes tuvieron un desarrollo silvestre del crecimiento del protonema. Solo en las mutantes *Δcnih2-3* y *Δcnih2-38* se llegaron a obtener valores de 0.304 ± 0.17 (n=14) y 0.255 ± 0.06 (n=12), respectivamente, lo que indicó un desarrollo temprano del caulonema en el protonema (Figura 27B).

Debido de que solo las mutantes sencillas de *Δcnih2* mostraron una transición prematura del caulonema en el protonema, se cuantificó el contenido total de clorofila de una de las mutantes *Δcnih2* y el resultado mostró que el contenido de

clorofila total fue menor en comparación con la línea silvestre del musgo (Figura 28A-B), sin embargo, los cloroplastos de estas mutantes no mostraron defectos estructurales (Figura 28C), por lo que podemos sugerir que el bajo contenido de clorofila se debe a que el protonema de las mutantes $\Delta cnih2$ tienen más células del caulonema las cuales se caracterizan por poseer un menor número de cloroplastos.

Por último, para corroborar si las mutantes $\Delta cnih2$ presentan un desarrollo prematuro del caulonema, se realizó un ensayo en colonia y después de 15 días se tomaron fotografías del borde de las colonias de las mutantes sencillas y dobles de cornichon. De acuerdo con los resultados que se muestran en la Figura 29, se observó que las mutantes $\Delta cnih2$ poseen filamentos caulonemales, y en algunos casos, el desarrollo temprano de brotes/nodos, lo cual es indicativo de un cambio a la siguiente fase adulta, mientras que las colonias de los musgos silvestres, las mutantes $cnih1$ y $cnih1\Delta cnih2$ todavía se observan filamentos cloronemales. En conjunto, estos resultados sugieren que *CNIH2* está involucrado en regular negativamente la transición de cloronema a caulonema en el protonema. Existen tres factores principales que promueven este proceso, la intensidad de luz, los niveles de glucosa y la concentración de auxinas. El transporte de esta hormona a través de las proteínas PIN juega un papel importante en mediar la diferenciación del protonema.

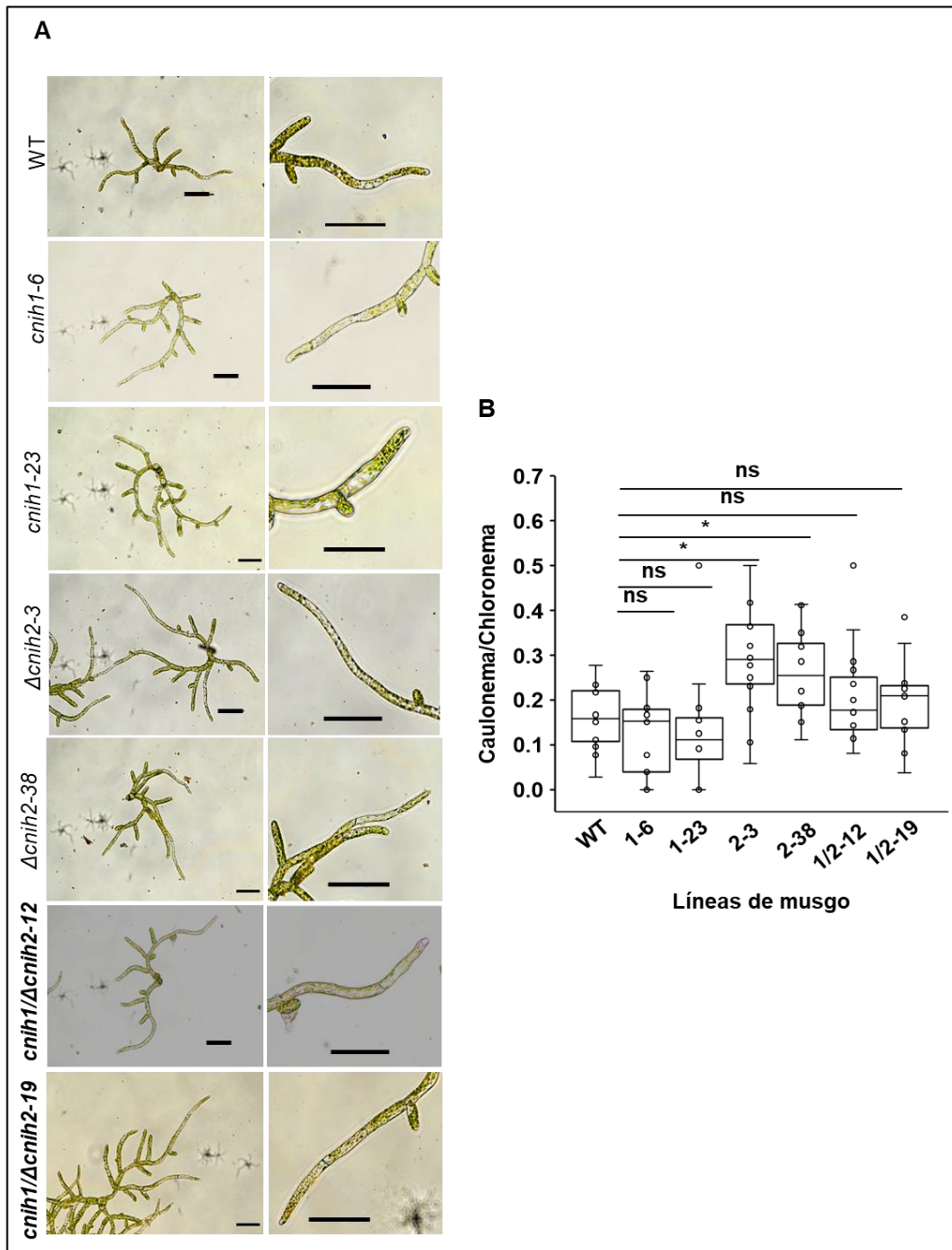


Figura 27. Las mutantes de Δ *cnih2* muestran un desarrollo temprano del caulonema en el protonema. A) Imágenes de campo claro (20X) de protonemas silvestres y mutantes de cornichon de siete días de crecimiento (izquierda) con sus respectivas zonas de la punta de protonema (derecha). Escala =50. **B)** Relación calculada de caulonema/cloronema, $n \geq 12$; se realizó la prueba t Student (ns $p \geq 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,001$).

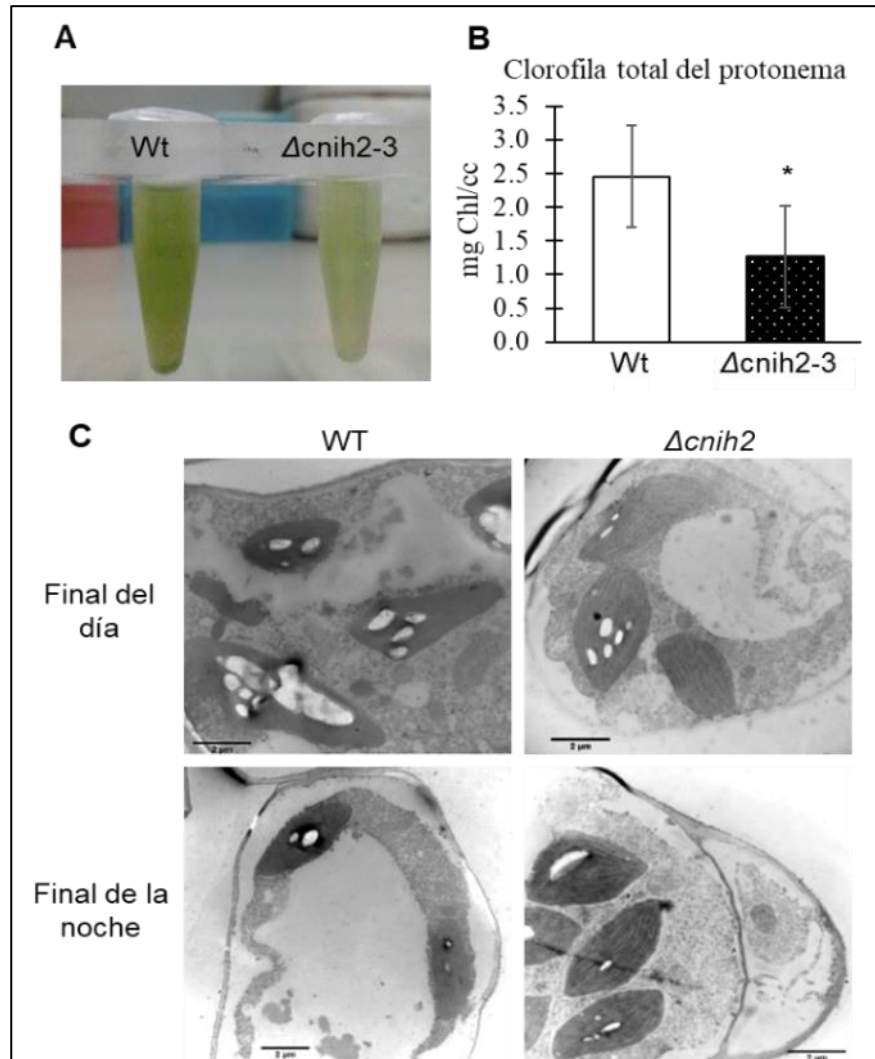


Figura 28. Disminución del contenido de clorofila y observación de cloroplastos del protonema en las líneas mutantes sencillas $\Delta cniH2$. **A)** Fotografía que muestra la comparación del extracto crudo de clorofila total proveniente de la línea silvestre y mutante sencilla $\Delta cniH2-3$. **B)** cuantificación de la clorofila total (mgChl/cc) en el protonema de siete días en las líneas silvestre (n=9) y $\Delta cniH2-3$ (n=11). Prueba de t Student (* p < 0,05;). **C)** Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión, de los cloroplastos del protonema en las líneas silvestre y $\Delta cniH2-38$, colectados y fijados al final del fotoperiodo de luz y oscuridad, respectivamente. Escala 2 μ m.

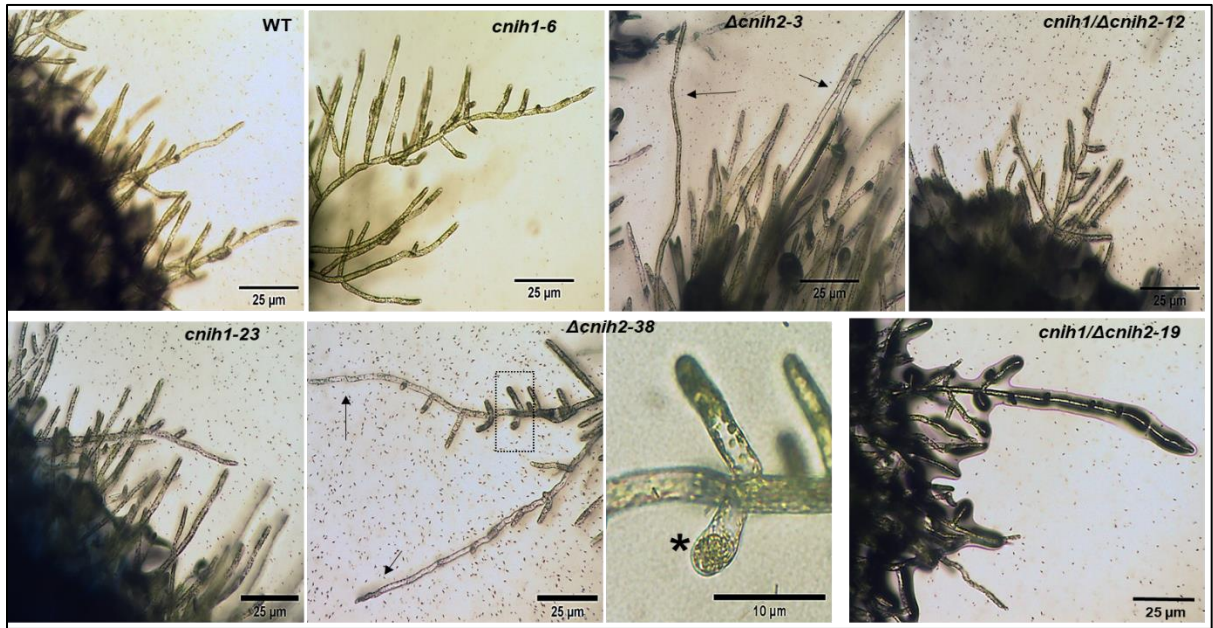


Figura 29. La mutación de *CNIH2* promueve un desarrollo prematuro en las colonias del musgo. Imágenes tomadas de los bordes de las colonias de musgo silvestre y mutantes *cnih1*, $\Delta cniH2$ y *cnih1\Delta cniH2* a los 15 días de crecimiento. Las flechas indican filamentos del tipo caulonema. El recuadro indica un acercamiento al protonema donde se observa la formación del nodo del gametóforo (*).

6.7 Los genes *CNIH* son reguladores antagónicos del crecimiento del gametóforo

Siguiendo con la caracterización del fenotipo de los musgos mutantes, se realizó un ensayo en colonia para analizar cambios en el número y el tamaño de los gametóforos. Las colonias de los musgos se crecieron en medio *PpNH4* por cuatro semanas y se registró el fenotipo con una cámara digital. Inicialmente, las colonias mutantes de cornichon no presentaron un defecto en el crecimiento en 3D del musgo, ya que se observó la formación normal de gametóforos. Por otro lado, se midió el tamaño del gametóforo para determinar si los musgos mutantes de cornichon tenían un defecto en el desarrollo. Se analizaron más de 56 gametóforos crecidos por cuatro semanas en medio *PpNH4*. Los resultados indicaron que el tamaño de los gametóforos silvestres en promedio fue de 3.3 ± 1.2 mm (n=156), en comparación, en las mutantes *cnih1-6* y *cnih1-23* el tamaño fue menor, de 3.1 ± 2.3 mm (n=60) y 2.6 ± 2.2 mm (n=92), respectivamente; mientras que, en las mutantes $\Delta cnih2-3$ y $\Delta cnih2-38$ el tamaño del gametóforo fue mayor, 4.0 ± 0.7 mm (n=60) y 4.0 ± 0.7 mm (n=59), respectivamente; algunos gametóforos de esta mutante llegaron a crecer hasta 8-10 mm. En las dobles mutantes *cnih1* Δ *cnih2-12* y *cnih1* Δ *cnih2-19* la longitud del gametóforo fue de 2.5 ± 0.5 mm (n=60) y 2.5 ± 0.5 mm (n=59), respectivamente. El análisis fenotípico del gametóforo de las mutantes en los genes *CNIH*, sugiere que los genes cornichon tienen un papel antagónico en regular su crecimiento, *CNIH1* como regulador positivo y *CNIH2* ejerciendo un control negativo sobre el crecimiento del gametóforo. El fenotipo en la doble mutante es similar al fenotipo causado por la mutación de *CNIH1*, por lo que podemos sugerir que *CNIH1* tiene un papel pleiotrópico sobre *CNIH2*.

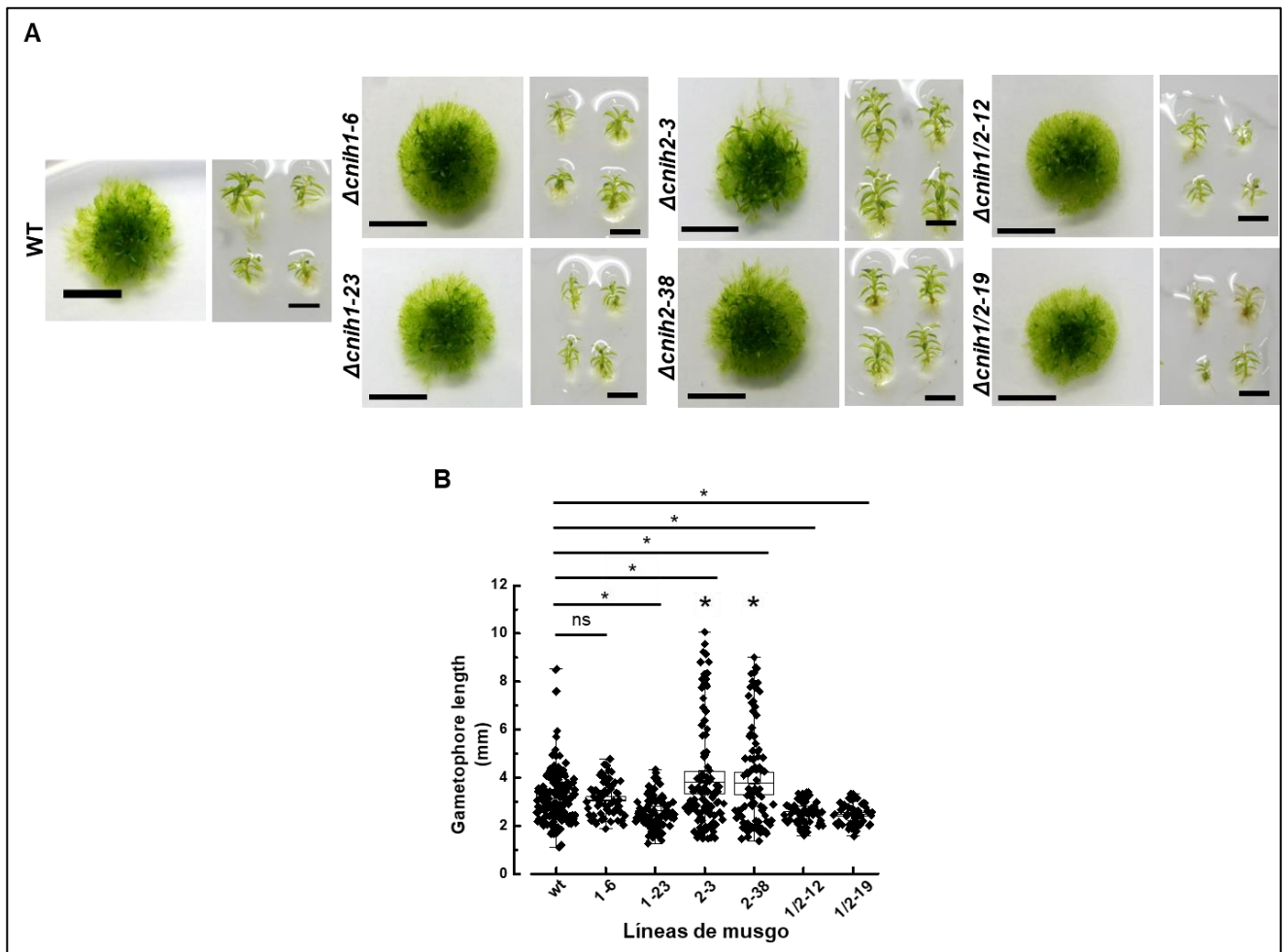


Figura 30. Los genes *CNIH1* y *CNIH2* participan en el crecimiento del gametóforo. A) Colonia (izquierda, escala= 5 mm) y gametóforos individuales (derecha, escala= 2 mm) de líneas WT y mutantes a las cuatro semanas de crecimiento. **B)** Tamaño de gametóforo de las diferentes líneas, $n \geq 56$. Se realizó ANOVA y prueba post hoc de Tukey-Kramer para estadística (ns $p \geq 0.05$; * $p < 0.05$).

6.8 El transportador de salida de auxinas PINA es una proteína cargo de las proteínas CNIH1 y CNIH2 en plantas

Una característica importante de las proteínas cornichon es la interacción física que establecen con las proteínas cargo que, en general, son proteínas de la membrana plasmática, y controlando de esta manera su tráfico desde el RE hasta su sitio de residencia. En vista de que el protonema de la mutante $\Delta cnih2$ mostró un fenotipo similar al reportado para las mutantes afectadas en los transportadores de salida de auxina PINA y PINB, investigamos la posibilidad de que estas proteínas pudieran ser proteínas cargo de CNIH2.

Como primera aproximación para evaluar la posible interacción entre CNIH1 y/o CNIH2 con PINA *in planta*, e identificar el sitio de interacción, se empleó el sistema bimolecular de complementación de la fluorescencia o BiFC. Para esto se fusionó la mitad N-terminal de EYFP al N-terminal de CNIH1 o CNIH2 (nYFP-CNIH1 o nYFP-CNIH2) y la mitad C-terminal de EYFP al N-terminal de PINA (cYFP-PINA). Los resultados mostraron que al coexpresar cada construcción de cornichon con cYFP-PINA en hojas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) se reconstituyó la fluorescencia de la proteína EYFP, lo que indica una asociación entre CNIH1 y CNIH2 con PINA. Cabe mencionar que la recuperación de la fluorescencia se observó en estructuras del retículo endoplásmico y en estructuras punteadas, lo cual nos indica que la interacción se está llevando a cabo en compartimentos de la vía secretoria temprana.

La bien conocida tetramerización de la acuaporina AtPIP2A se utilizó como control positivo. Para esto, la mitad N-terminal de EYFP se fusionó con el N-terminal de AtPIP2A (nYFP-AtPIP2A), y la mitad C-terminal de EYFP se fusionó con el N-terminal de AtPIP2A (cYFP-AtPIP2A), como se esperaba, la oligomerización de las acuaporinas condujo a la recuperación de la fluorescencia en la membrana plasmática. Ensayos adicionales demostraron la interacción entre CNIH1 y CNIH2 con AtPIP2A; sin embargo, no se observó interacción entre AtPIP2A y PINA. Estos resultados demuestran que el transportador de salida de auxinas PINA es una proteína cargo de los receptores CNIH1 y CNIH2.

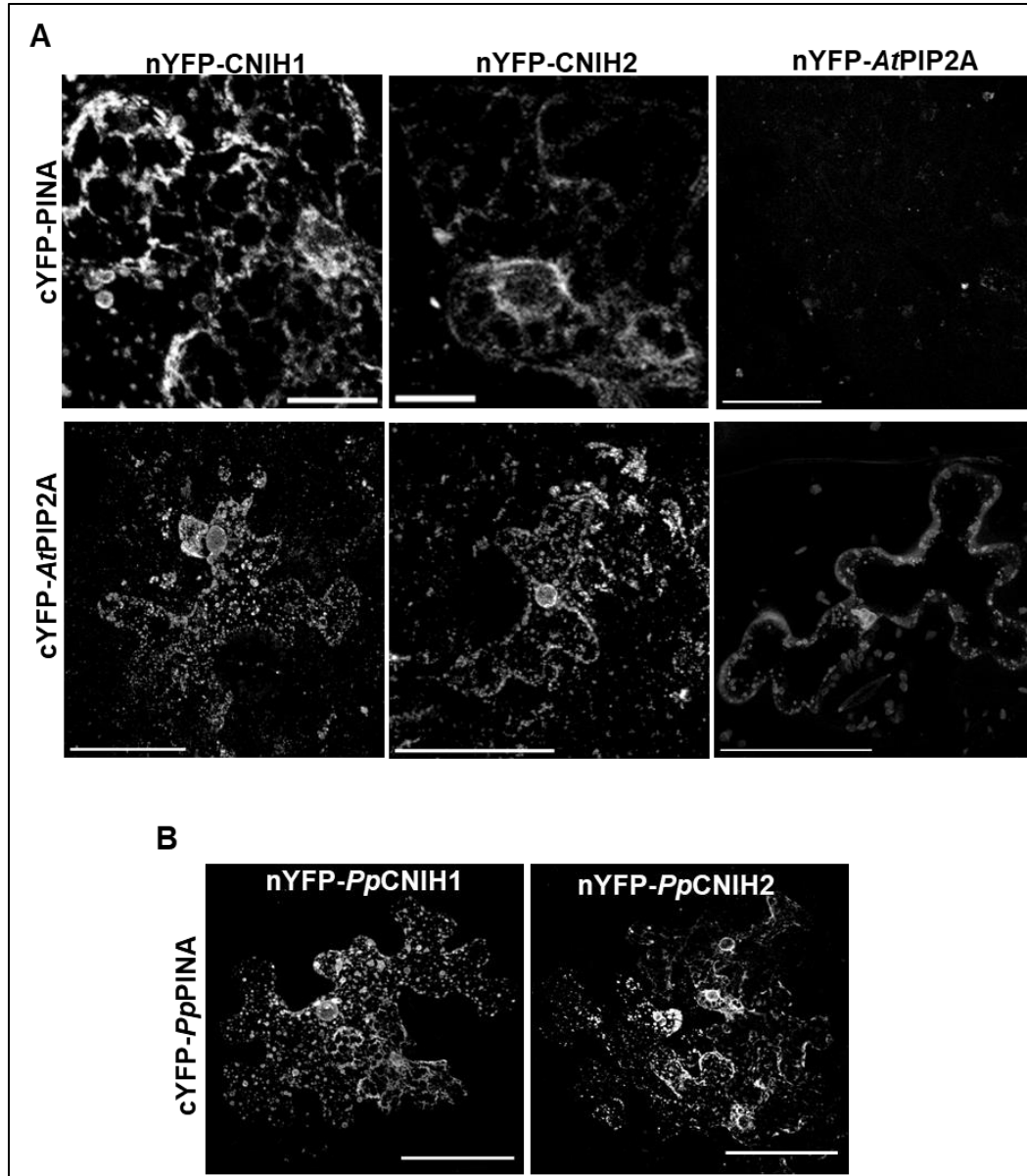


Figura 31. Interacción proteína-proteína del transportador de salida de auxinas y los receptores cornichon en planta. A) La interacción entre PINA y CNIH1 o CNIH2 se confirmó mediante la observación de la fluorescencia debido a la reconstitución de los dos fragmentos de la YFP mediante la co-expresión de nYFP-CNIH con la proteína cYFP-PINA en el RE. Las imágenes muestran una sección (ROI) de las imágenes originales en B). La falta de interacción entre cYFP-PINA y la acuaporina nYFP-AtPIP2A se indicó por la ausencia de fluorescencia (control negativo). La oligomerización de la acuaporina (nYFP-AtPIP2A y cYFP-AtPIP2A) se utilizó como control positivo. La interacción entre la acuaporina cYFP-AtPIP2A y nYFP-CNIH se puso de manifiesto mediante la reconstitución de la fluorescencia YFP. **B)** Imágenes originales que muestran la interacción entre PINA y CNIH1 o CNIH2. Escala = 50 μ m.

6.9 El transportador de salida de auxinas PINA interactúa preferencialmente con CNIH2

Para corroborar la interacción entre los homólogos de cornichon y el transportador de auxina, y para evaluar la fuerza de estas interacciones, empleamos el sistema de ubiquitina dividida, basado en el apareamiento (mbSUS). Este sistema, similar al sistema de dos híbridos, permite conocer la interacción entre dos proteínas de membrana o una proteína citosólica y una de membrana, a través del secuestro de un factor de transcripción en la membrana y su liberación por la acción de una proteasa, como resultado de la reconstitución de la ubiquitina.

En este caso se usó a PINA como cebo, fusionado a la mitad C-terminal de la ubiquitina (fusión Cub) y a CNIH1 o CNIH2 como presa, fusionadas a la mitad N-terminal de la ubiquitina (fusión Nub); las respectivas células de levadura se transformaron con estas construcciones, luego se aparearon y, posteriormente, las levaduras se crecieron en medio selectivo (Ura-, Trp-, Leu-, Ade-, His-) para probar la interacción proteína-proteína. La confirmación de que los vectores mbSUS funcionaban adecuadamente se indicó mediante el crecimiento de células de levadura diploides que co-expresaban PINA-Cub y NubWT, utilizadas como control de falsos negativos; pero no se observó crecimiento al co-expresar PINA-Cub con NubG, utilizado como control para falsos positivos.

El apareamiento de la cepa de levadura que expresa PINA-Cub con aquellas que expresan CNIH1-Nub o CNIH2-Nub permitió un crecimiento de células de levadura diploide en el medio de selección en ausencia de metionina (Met-0), sin embargo, observamos un menor crecimiento al co-expresar PINA-Cub con CNIH1-Nub, en comparación con CNIH2-Nub (Figura 32). Esta diferencia se resaltó aún más en el medio de selección en presencia de metionina (Met-500), al co-expresar PINA-Cub y CNIH1-Nub no se observó crecimiento de las levaduras diploides, en comparación con la co-expresión PINA-Cub y CNIH2-Nub, donde sí se llegó a observar crecimiento de las levaduras diploides. Para confirmar la interacción entre CNIH1-Nub o CNIH2-Nub con PINA-Cub, evaluamos la actividad de β galactosidasa, ya que el gen lacZ se activa por el factor de transcripción liberado

por la reconstitución de la ubiquitina. Estos análisis nos permitieron observar una coloración azulada con la interacción entre PINA-Cub y NubWT pero no con PINA-Cub y NubG, lo cual corroboró el correcto funcionamiento de las construcciones. Por otra parte, de acuerdo con la coloración azulada provocada por la oxidación de X-gal por acción de la β -galactosidasa, se confirmó que hay una fuerte interacción entre CNIH2-Nub con PINA-Cub, pero que la interacción entre CNIH1-Nub con PINA-Cub fue débil (Figura 32B) en este sistema.

La fuerza de las interacciones se evaluó ensayando el crecimiento de las células diploides en concentraciones crecientes de Met (5, 50, 250 y 500 μ M). La metionina actúa como represor del promotor MET25 contenido en el vector pMETYC donde se expresa la fusión Cub. Al agregar concentraciones crecientes de metionina en el medio de selección, se obtiene una disminución gradual en los niveles de expresión de la fusión de Cub y, por lo tanto, no se producirá de manera eficiente, y se observará un menor crecimiento. De acuerdo con esta premisa, las levaduras diploides que co-expresaban CNIH2 y PINA crecieron en presencia de 500 μ M de Met, mientras que las levaduras diploides que co-expresaron CNIH1 y PINA dejaron de crecer en 250 μ M de Met. Estos resultados indican que PINA estableció una interacción más fuerte con CNIH2.

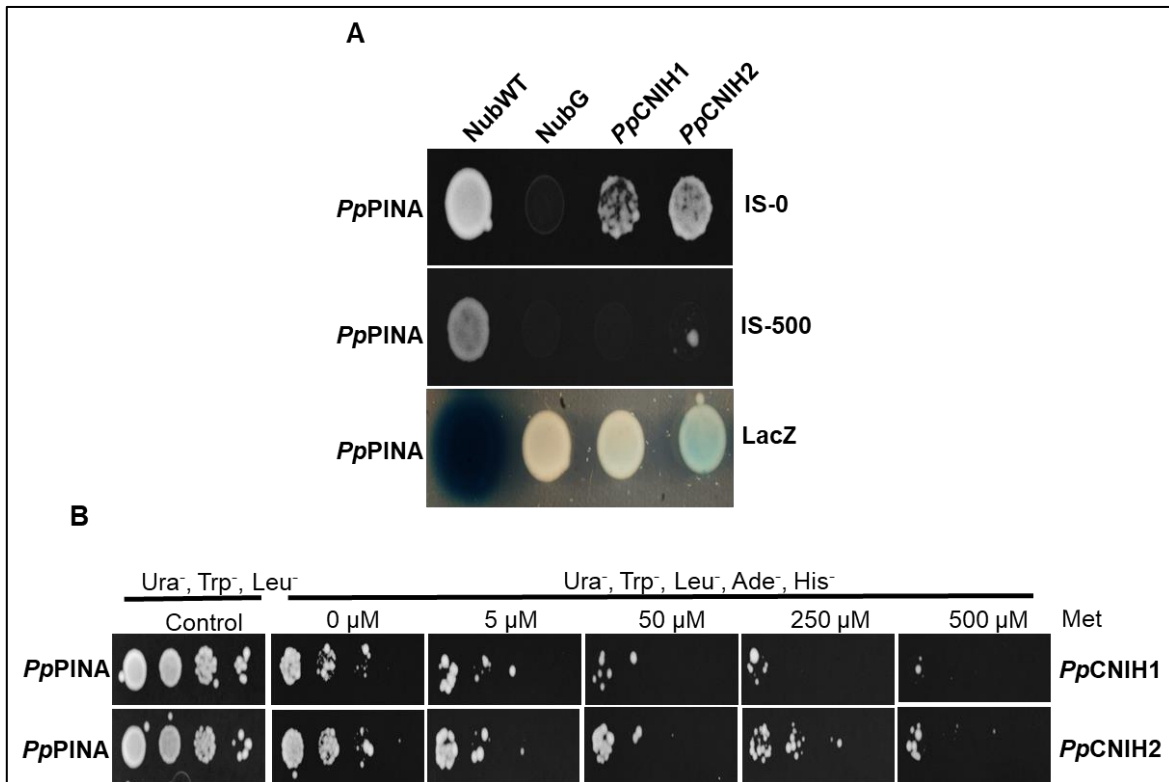


Figura 32. La proteína CNIH2 interactúa con mayor afinidad con el transportador PINA. A) Ensayo mbSUS con las proteínas de cornichon del musgo (fusiones Nub) y el transportador de auxina PINA (fusión Cub). Crecimiento de células de levadura en medio de selección (IS-0; Ura⁻, Trp⁻, Leu⁻, Ade⁻, His⁻, Met⁻); la interacción diferencial se confirmó por la inhibición del crecimiento celular en condiciones de selección represiva (IS-500; Ura⁻, Trp⁻, Leu⁻, Ade⁻, His⁻, Met⁺ 500 μM) y por la menor actividad de LacZ (intensidad del color azulado). NubWT y NubG se utilizaron como controles de falsos negativos y falsos positivos, respectivamente. **B)** El ensayo mbSUS con las proteínas de cornichon del musgo (fusiones Nub) y el transportador de auxina PINA (fusión Cub) mostró una interacción más fuerte entre las proteínas CNIH2 y PINA bajo condiciones de crecimiento en medio de selección represiva como consecuencia del aumento de las concentraciones de Met. (Ura⁻, Trp⁻, Leu⁻, Ade⁻, His⁻). El crecimiento en presencia de Ade e His (Ura⁻, Trp⁻, Leu⁻) corresponde a las condiciones de crecimiento control. Aquí se muestran imágenes representativas de tres repeticiones experimentales.

6.10 Localización subcelular del transportador de salida de auxinas PINA en el musgo

Con base a la interacción que se observó entre las proteínas CNIH y PINA, lo siguiente fue determinar si en el musgo la localización de PINA se alteraba por la falta de cornichon. Para esto se utilizó la línea de musgo *PpPINA_{pro}::PpPINA-GFP*. Esta línea la donó la Dra. Eva Sundberg (Department of Plant Biology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden). Esta línea expresa PINA fusionado a la proteína fluorescente mEGFP en la región del asa localizada hacia el citosol y se encuentra bajo el control del promotor endógeno de PINA. Esta construcción se insertó en una región genómica conocida como locus 108, en la línea silvestre del musgo (Viaene et al., 2014).

Para determinar si existían cambios en la localización de la proteína PINA-EGFP en los fondos mutantes *cnih1* o Δ *cnih2*, generada por CRISPR-Cas9 la primera y por recombinación homóloga la segunda. Una vez que se seleccionaron las colonias transformantes, se eligieron dos mutantes *cnih1* y dos Δ *cnih2* para su extracción de ADN genómico, y genotipificación por PCR, tal como se muestra en las Figuras 24 y 25.

Una vez identificadas las mutantes sencillas *cnih1* y Δ *cnih2* en el fondo *PpProPINA::PINA-EGFP*, se propagaron junto con la línea *PpProPINA::PINA-EGFP*. Después de siete días se obtuvieron protoplastos y se sembraron en medio de regeneración PRMB. Después de cuatro días, se creció el tejido en medio *PpNH4* por tres días más. Finalmente, en un portaobjetos se montaron las muestras de cada línea transgénica y se observó la fluorescencia de distintas células apicales del protonema en un microscopio confocal invertido. En la línea *PpProPINA::PINA-EGFP* en el fondo silvestre, la localización subcelular de la proteína PINA se observó en la membrana plasmática de la cara apical de las células del protonema, indicando una localización polarizada, es decir, en la punta y entre las uniones celulares. En fondo de la mutante *cnih1*, la localización polarizada de PINA fue similar a lo que se observó en la línea silvestre. Sin embargo, en la mutante Δ *cnih2*, la localización subcelular en la parte apical de la

célula de la proteína PINA disminuyó drásticamente y no se observó la fluorescencia entre las uniones celulares del protonema, como se muestra en la Figura 33.

Con el propósito de comprobar que CNIH2 es el receptor cargo de PINA se realizó un ensayo de complementación en el protonema del musgo. Se clonó la región codificante de CNIH2 en un vector de expresión para el musgo y se transformó transitoriamente en protoplastos de la línea mutante sencilla $\Delta cnih2$ /PINA-GFP. Después de regenerar los protonemas, se mantuvo en selección hasta por 15 días y los protonemas resistentes a la selección se observaron al microscopio confocal de fluorescencia. De acuerdo con los resultados que se muestran en la Figura 33, la localización de PINA se observó y se mantuvo en la parte apical y basal en las células del protonema, lo que nos indicó que se restableció la localización polarizada del transportador de auxinas en la membrana plasmática. A pesar de que ambas proteínas CNIH interactúan con PINA, sólo CNIH2 es capaz de influir en el tráfico adecuado de esta proteína cargo, por lo que podemos sugerir que CNIH2 es el receptor cargo preferencial de PINA.

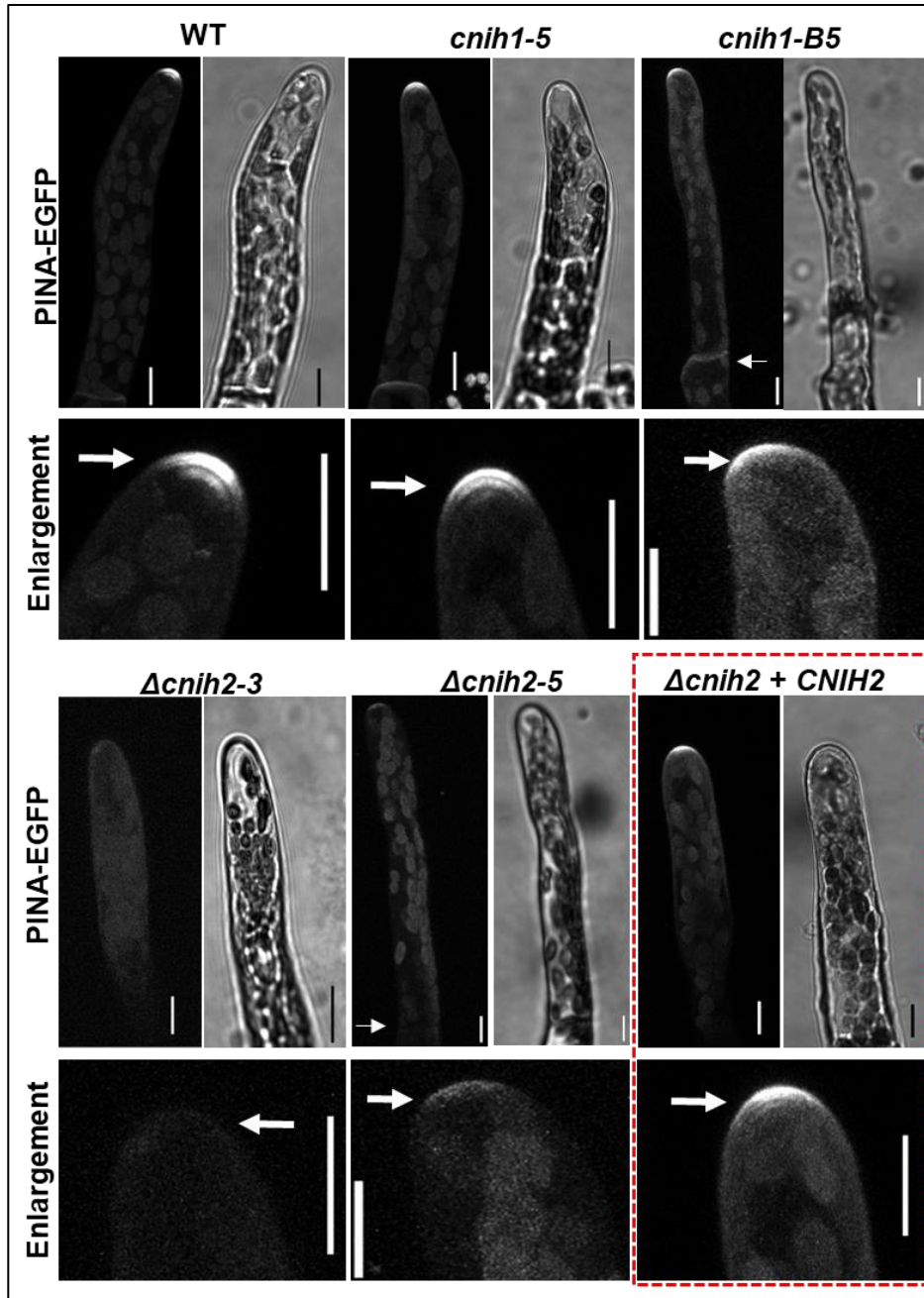


Figura 33. La proteína CNIH2 es el receptor cargo para el transportador de salida de auxina PINA. La localización apical de PINA-GFP no se vio afectada en la mutante *cnih1*, pero se deslocalizó en la mutante $\Delta cni2$, un fenotipo recuperado por complementación con CNIH2 (cuadro marcado con líneas discontinuas). Los paneles inferiores son ampliaciones de ROI de células de protonema apicales de las imágenes correspondientes (Enlargement); las flechas indican la localización de PINA-GFP. Las imágenes son proyecciones z con la máxima intensidad. Imágenes representativas de un total > 5 células apicales por cada línea de musgo. Escala 10 μ m

6.11 Función del carboxilo-terminal de CNIH2 en el musgo

Como se mencionó anteriormente (Sección 6.1), la región C-terminal se compone de dos dominios, uno ácido y un posible dominio de fosforilación (T/S), lo cual abre la posibilidad que estos dominios pudieran modificar la función de la proteína. Con base en esto, inicialmente se generaron dos versiones truncadas de CNIH2, una versión removiendo solo el dominio T/S (CNIH2 Δ 141), y una versión truncada sin ambos dominios (CNIH2 Δ 137) (Figura 34A). Inicialmente se analizó si estas mutaciones afectaban la interacción con el cargo PINA, por lo que se realizó el ensayo mbSUS y se tituló la interacción con diferentes concentraciones de Met. A la proteína PINA, se le fusionó la mitad C-terminal de la ubiquitina (fusión Cub) y a cada versión truncada de CNIH2, se fusionó con la mitad N-terminal de la ubiquitina (fusión Nub).

Al co-expresar la fusión PINA-Cub con CNIH2-Nub se detectó un crecimiento de la levadura en el medio IS-0, lo que confirmó la interacción positiva entre PINA y CNIH2, demostrada anteriormente (Figura 32). Al co-expresar la fusión CNIH2-141 con PINA-Cub, hubo un crecimiento mayor de la levadura en el medio Met-0 en comparación con la versión silvestre de CNIH2. En el caso de la versión CNIH2-137, al co-expresar con PINA-Cub el crecimiento de la levadura fue menor en comparación con la versión silvestre de CNIH2 (Figura 34B).

En vista del grado de interacción que se observó en el medio de selección IS-0, se analizó la fuerza de interacción entre las proteínas CNIH2, CNIH2-141 y CNIH2-137 con PINA, realizando el ensayo con diferentes concentraciones de Met en el medio (5, 50, 250 y 500 μ M). Cuando se co-expresó PCNIH2 y PINA, las levaduras crecieron en 250 y 500 μ M de Met, indicativo de una interacción fuerte. En contraste, en la interacción CNIH2-141 y PINA, las células diploides de la levadura crecieron mejor en 500 μ M de Met, lo cual nos indicaba que la presencia del dominio T/S participa en regular negativamente la interacción con PINA. Cuando se co-expresó CNIH2-137 y PINA el crecimiento de las levaduras se afectó seriamente, ya que sólo ocurrió en presencia de 5 μ M de Met (Figura 34B). Estos resultados indican que el dominio ácido tiene una participación importante

terminal. Las construcciones se transformaron y su localización se observó en protoplastos de *P. patens*. Los resultados en la Figura 35 muestran que la localización de CNIH2 ocurre en el RE, tal como se observó en el protonema, indicando que la eliminación de la C-terminal de PpCNIH2 no afecta su localización celular.

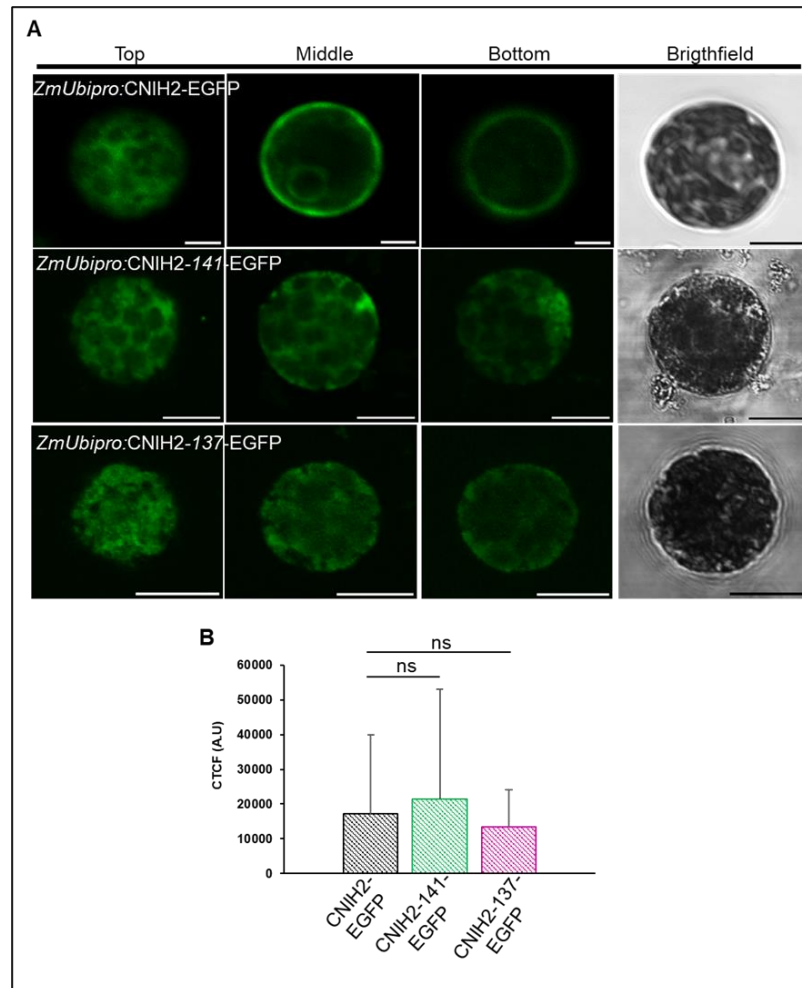


Figura 35. Localización subcelular de la proteína CNIH2 y sus mutantes C-terminal en protoplastos de *P. patens*. **A)** Imágenes confocales que muestran la localización de la sobre-expresión transitoria de WT *ZmUbi*pro:CNIH2-EGFP (primera fila) y versiones truncadas *ZmUbi*pro:CNIH2-141-EGFP (segunda fila) y *ZmUbi*pro:CNIH2-137-EGFP (tercera fila) en protoplastos del musgo a las 48 h después de la transformación, sin mostrar cambios en la localización subcelular. Imágenes de tres secciones ópticas individuales (Superior, Media e Inferior) de los protoplastos. Escala 10 μ m. **B)** Intensidad de la fluorescencia de protoplastos transformados con las construcciones en **A)**. CTCF = fluorescencia celular total corregida. n = 4; los datos son la media \pm DE de la prueba t que se realizó para las estadísticas de protonema (ns p \geq 0,05).

Con base en estos resultados, y para determinar la importancia fisiológica del extremo C-terminal de CNIH2, se investigó su influencia en la localización de PINA, por lo que se transformó y se expresaron transitoriamente la secuencia codificante de WT CNIH2 o las secuencias codificantes truncadas de CNIH2 en la línea mutante $\Delta cnih2$ /PINA-EGFP. Después de mantener las plantas durante doce días bajo selección, se analizaron los protonemas de las plantas supervivientes.

La localización polarizada característica de PINA-EGFP restringida a la punta de la célula apical se reconstituyó mediante transformación con CNIH2 (Figura 36A, panel izquierdo); sin embargo, la transformación con CNIH2-141 dio como resultado una fluorescencia difusa de PINA-EGFP, cubriendo un área más grande de la punta y menos restringida al ápice de la célula apical (Figura 36A, panel medio). La transformación con CNIH2-137 dio como resultado una fluorescencia de PINA-EGFP aún más difusa, que se distribuyó por toda la célula apical, marcando una estructura parecida al RE y que además rodeaba el núcleo, lo que sugiere que PINA se retuvo en el RE (Figura 36A panel derecho).

Para cuantificar y confirmar la distribución intracelular de PINA-EGFP, se seleccionó una región de interés (ROI) en la punta de la célula apical para obtener un histograma de intensidad de fluorescencia (Figura 36B). En la célula apical que expresó CNIH2, la fluorescencia de PINA alcanzó su punto máximo en valores más bajos de intensidad (fluorescencia baja o nula), lo que indica una localización limitada de PINA, correspondiente al ápice de la célula; en contraste, CNIH2-141 y CNIH2-137 exhibieron picos más amplios de fluorescencia de PINA-EGFP, lo que indica una distribución intracelular más amplia de PINA (Figura 36B). En conjunto, estos resultados sugieren que la fosforilación putativa y los dominios ácidos de CNIH2 son importantes para la interacción con el cargo y el tráfico correcto del transportador de auxina a la membrana plasmática.

Curiosamente, el crecimiento del protonema se alteró en las plantas que expresaron las versiones truncadas en la C-terminal. En contraste con los protonemas rectos observados cuando se expresó la versión silvestre de CNIH2, la expresión de CNIH2-141 y CNIH2-137 produjo protonemas progresivamente

más curvos, con CNIH2-141 produciendo filamentos ondulados (Figura 36C, flecha) y CNIH2-137 produciendo filamentos en zigzag (Figura 36C, flecha). Es probable que la deslocalización del transportador de auxinas PINA resulte en cambios en la dirección del flujo de salida de la hormona, lo que induce un crecimiento ondulatorio en los protonemas. Este efecto es similar a los cambios rápidos en la localización polar de las proteínas PIN de Arabidopsis en respuesta a señales ambientales o de desarrollo, como el desarrollo embrionario o el gravitropismo de la raíz (Kleine-Vehn et al., 2010).

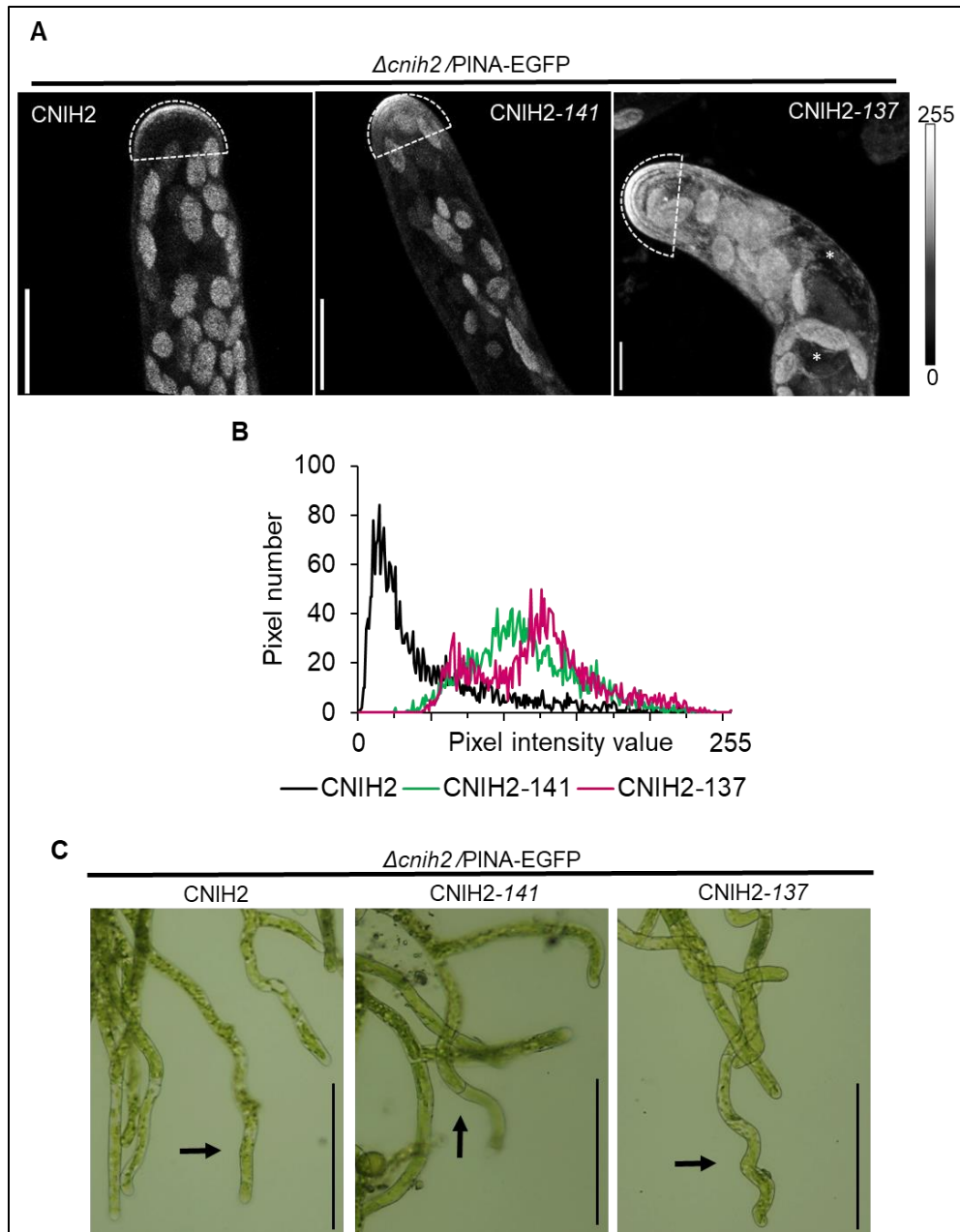


Figura 36. El C-terminal de CNIH2 regula el tráfico de PINA en células de protonema. A) Cambios en la localización de PINA-GFP mediante la complementación con CNIH2 de longitud completa y truncados CNIH2-141 y CNIH2-137, utilizando la línea mutante $\Delta cniH2$ -3/PINA-EGFP como fondo genético. Las imágenes confocales de las células apicales del protonema muestran cambios en la localización polar de PINA. Las imágenes son proyecciones Z con máxima intensidad. Los asteriscos muestran PINA-GFP en la localización de ER; Escala 10 μ m. **B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia a partir de una ROI que delimita el ápice de las células. Valores de píxel de 0 a 255 en una escala de grises de 8 bits. **C)** La complementación de plantas mutantes $\Delta cniH2$ -3/PINA-EGFP con el CNIH2 de longitud completa mostró un crecimiento normal; sin embargo, cuando se complementó con secuencias codificantes truncadas de CNIH2-141 o CNIH2-137 generó un protonema ondulante (flechas). Escala 100 μ m.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se caracterizó la función de las dos proteínas cornichon en el musgo *P. patens*, dentro de las cuales encontramos que su región carboxilo terminal es más larga en comparación con la de las demás proteínas homólogas en plantas. De manera similar, las proteínas MpCNIH, OsCNIH2, ZmCNIH2, AcoCNIH, ZmaCNIH2 también tienen una región C-terminal larga con el dominio ácido seguido de aminoácidos de serina y treonina, lo que nos sugiere que quizás en estos organismos también la región C-terminal juegue un papel en la regulación de las proteínas cargo, como es el caso de PpCNIH2.

Demostramos que la región C-terminal de CNIH2 desempeña un papel importante en su interacción proteína-proteína con su cargo PINA y esto determina que el cargo se localice correctamente. En cuanto a la función del dominio T/S en el extremo carboxilo de CNIH2, identificamos en este dominio un sitio potencial de fosforilación, T148, lo que nos llevó a plantear la hipótesis de la posible modificación postraduccional de CNIH2 en este residuo que podría afectar su funcionamiento ya que la eliminación de un sitio de fosforilación putativo (CNIH-141) conduce al establecimiento de una interacción más fuerte que en sí misma ocasiona la retención parcial de PINA intracelular. Las interacciones que se llevan a cabo durante el tráfico vesicular comúnmente son débiles ya que existe un alto dinamismo en el proceso de salida y entrega de los cargos, así como de la formación y desensamble de los complejos vesiculares (Barlowe y Helenius, 2016). Estos resultados abren la posibilidad de que el receptor CNIH2-141 imite un estado defosforilado regulando negativamente la liberación del cargo PINA hacia su compartimento blanco. De manera general, se conoce que los aminoácidos serina y treonina pueden modificarse post-traduccionalmente, y así, regular la actividad de las proteínas mediante ciclos de fosforilación-defosforilación (Lord et al., 2011). Algunas proteínas implicadas en el tráfico de las vesículas COPII están reguladas por este tipo de modificaciones post-traduccionales. Se ha reportado en *S. cerevisiae* que la cinasa de serina/treonina Hrr25 (ortólogo de CK1δ) localizada en el AG, fosforila algunos componentes de la vesícula COPII lo que permite la

liberación de los componentes COPII y la fusión de las vesículas con el AG (Lord et al., 2011). También existe una fosfatasa de serina/treonina denominada Sit4, la cual es importante para la desfosforilación de COPII, ya que la mutante ocasiona que las proteínas COPII estén hiperfosforiladas y sus localizaciones subcelulares están modificadas (Bhandari et al., 2013). Recientemente se reportó un motivo consenso (ESXDD) para la cinasa de caseína 2 (CK2) en la región C-terminal de Erv14 y se demostró que la Serina (Ser134) en la región C-terminal de Erv14p es importante para el correcto empaquetamiento del receptor en las vesículas COPII y su tráfico de RE-AG, en consecuencia, es importante para el correcto tráfico de sus proteínas cargo (Lagunas-Gomez et al., 2023).

Por otro lado, la eliminación de un dominio ácido de CNIH (CNIH-137) conduce a una falta de interacción del receptor por su cargo y, en este caso, la eliminación del dominio ácido afectó la localización polarizada de PINA en la membrana plasmática de la célula apical provocando que ahora se localizara en el RE. El dominio ácido parece ser exclusivo de proteínas CNIH de plantas y hongos, y participa en la correcta interacción con el cargo y su posterior salida del RE (Rosas-Santiago et al., 2017).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo nos sugieren que la proteína PINA interactúa con CNIH1 y CNIH2 en el retículo endoplásmico, por lo que las proteínas cornichon de musgo tienen un papel conservado en la vía temprana de secreción. A pesar de que PINA interactúa con ambos cornichones, su localización se ve severamente afectada solo por la mutación de CNIH2, lo que nos sugiere que existe una preferencia del cargo por un receptor específico. Este defecto en el tránsito podría estar causando una alteración en la eficiencia del transporte de auxina que, a su vez, lleva a su acumulación intracelular en las células apicales, como se muestra en los mutantes *Δpina pinb*, en donde se ha reportado una reducción en la salida de auxina al medio. junto con una diferenciación acelerada de células caulonemales (Viaene et al., 2014), como se observó en la mutante *Δcnih2*. Es posible que los fenotipos observados en los gametóforos *cnih1*, *Δcnih2* y *cnih1Δcnih2* se deban también a una alteración en la

concentración intracelular de auxinas. En apoyo a esta interpretación está el reporte en el que se encuentran gametóforos más grandes para la mutante *Δpinb* (Bennett et al., 2014), fenotipo similar al que observamos para la mutante *ΔcniH2*, lo que podría confirmar que CNIH2 funciona como receptor de cargo para PINA y sugiere que PINB también podría depender de una interacción similar para su incorporación a la membrana plasmática.

Las proteínas cornichon del musgo se encuentran en el RE y en los ERES. La localización de la proteína CNIH2 (endógena) en células de protonema se observó principalmente en el retículo cortical y perinuclear, así como en los ERES. Observamos que CNIH2 se concentra en la zona del ápice de la célula apical y entre dos células del protonema. Tal distribución "polar" es similar a la localización de PINA donde la fluorescencia se concentra en la membrana plasmática del lado apical de la célula, pero también entre dos células adyacentes en el protonema. Los plasmodesmos son estructuras que conectan a las células contiguas y permiten el paso de agua, azúcares, hormonas, proteínas y ARN mensajeros. Están formados por la membrana plasmática que se encuentra rodeando el hueco de la pared celular, el citosol y una extensión del RE denominada desmotúbulo (Kriechbaumer et al., 2015; Stefano et al., 2014). Los plasmodesmos regulan el paso de estas moléculas por medio de la deposición de calosa. La deposición de calosa es secretada por proteínas llamadas la calosa sintasa, las cuales son proteínas de la membrana plasmática (Jackson, 2015). La localización de las proteínas cornichon entre las células adyacentes en el protonema, nos hacen especular que posiblemente se localicen en los desmotúbulos y participen en regular el tráfico de proteínas como la calosa sintasa.

Interesantemente, la localización de CNIH2 no se afecta por el inhibidor del tráfico brefeldina A y, el tamaño de los puntos asociados con CNIH2 es diferente al del cis-Golgi, pero similares a Sec23G, una de las siete isoformas de Sec23, lo que nos lleva a proponer que CNIH2 no contacta directamente con el cis-Golgi sino que se ubica en un tipo particular, aunque quizás no exclusivo, de ERES conteniendo a Sec23G. Observaciones similares para los homólogos DmCni y

AtCNIHs muestran una localización asociada a puntos. (Bökel et al., 2006; Wudick et al., 2018), y en el caso de los homólogos de Arabidopsis AtCNIH1,-3,-4,-5, mostraron una baja co-localización con las proteínas del cis-Golgi y Golgi medio, pero una co-localización parcial con el marcador ERES AtSec24 (Wudick et al., 2018), lo que sugiere que en general las proteínas cornichon en plantas se asocian principalmente a los ERES, y quizás no contacten directamente con el cis-Golgi, lo cual es distinto para lo que se ha reportado en *S. cerevisiae*, donde el receptor de cargo Erv14p se localiza tanto en los ERES como en el Golgi, donde contacta con el cis-Golgi en conjunto con las vesículas COPII (Pagant et al., 2015; Powers y Barlowe, 1998; Powers y Barlowe, 2002).

Dada la relación entre CNIH2 y SEC23G observada en este trabajo, se puede proponer que estas proteínas comparten la misma vía para regular la salida de PINA del RE a la membrana plasmática, quizás independiente de Golgi. Para Arabidopsis se han propuesto varios procesos como endocitosis, reciclaje y/o transcitosis, o la participación del retrómero y/o el exocisto para establecer la polaridad de AtPIN1/2 (Dhonukshe et al., 2007; Drdová et al., 2013; Feraru et al., 2012; Geldner et al., 2003; Jaillais et al., 2006; Kitakura et al., 2011; Kleine-Vehn et al., 2008; Naramoto et al., 2014; Steinmann et al., 1999; Tanaka et al., 2009), que si bien, deben estar presentes en el musgo, se desconoce si los transportadores PIN de *P. patens* toman las mismas vías de tráfico para su localización polarizada en la membrana plasmática. Es importante mencionar que complementaciones funcionales con el transportador PINA en raíces de Arabidopsis no causaron la localización polarizada en la membrana plasmática de las células, en comparación con AtPIN1, lo cual indica que si bien puede haber mecanismos de tráfico conservados que dirijan a los PIN hacia la membrana plasmática, el proceso de cómo se polarizan los PIN en el musgo puede ser distinto a los mecanismos que se han caracterizado en Arabidopsis (Zhang et al., 2020).

Estos resultados nos llevan a sugerir un mecanismo en el que la distribución polarizada de PINA en las células de musgo está mediada principalmente por la

vía de secreción temprana. Nuestros resultados amplían nuestro conocimiento sobre la participación de diferentes mecanismos de tráfico de proteínas PIN en diferentes linajes de plantas.

En este trabajo observamos que los mutantes de *cornichon* causaron efectos pleiotrópicos que no afectaron severamente el crecimiento del musgo. Estos diversos defectos pueden ser el resultado de alteraciones en la entrega correcta de proteínas de membrana, ya que los receptores *cornichon* interactúan y median el tráfico de muchas proteínas de membrana que pasan a través de la ruta secretora (Herzig et al., 2012; Rosas-Santiago et al., 2015). Apoyando este punto de vista, y de acuerdo a los resultados observados en este trabajo, el desarrollo del protonema se afecta debido a la sobre-expresión de las proteínas de CNIH, probablemente debido a la interrupción del flujo de las proteínas cargo a lo largo de la vía secretora normal que inicia en el RE.

De acuerdo con lo que se observó en el protonema de la mutante *cnih1*, CNIH1 contribuye a la formación correcta de las divisiones celulares, ya que algunos protonemas de esta mutante se mostraron divisiones incompletas. El proceso de división celular implica la formación de una estructura transitoria denominada fragmoplasto, durante este proceso se ha observado la producción de vesículas que llevan material recién sintetizado para la formación de la pared celular nueva, en donde la ruta secretoria toma un papel importante (Smertenko et al., 2017). lo cual sugiere que CNIH1 participa en la secreción de proteínas y/o material necesario para la formación del fragmoplasto.

Por otra parte, también observamos la posición anormal de las células laterales del protonema en los mutantes *cornichon*, este fenotipo que causa defectos en la ramificación del protonema, solo se ha reportado en mutantes en Myosin VIII (Wu et al., 2011) y proteínas similares a Vapyrin (VPY-like) (Rathgeb et al., 2020). Se desconoce la función de Vapyrin (VPY) y proteínas similares a VPY, estas proteínas solo se encuentran en plantas y su importancia radica en que participan en la formación de las micorrizas arbusculares (AM) en *Medicago truncatula* y *Petunia hybrida* (Feddermann et al., 2010; Liu et al., 2019; Pumplin et al., 2010);

sin embargo, la localización de estas proteínas se encuentra en los llamados cuerpos de vavirina relacionados con el TGN y los endosomas, pero también asociados con el retículo endoplásmico (Bapaume et al., 2019; Feddermann et al., 2010; Liu et al., 2019; Pumplin et al., 2010). En el protonema de musgo, la proteína VPY-like se localiza en el citoplasma con un patrón punteado y alrededor del núcleo (Rathgeb et al., 2020), coincidente con lo que observamos para CNIH2. Se ha caracterizado que las proteínas VPY y VPY-like poseen un dominio de proteína asociada a vesículas (VAP) en su extremo-N y varios dominios repetidos de anquirina en el extremo-C. Se predice que ambos dominios están involucrados en interacciones proteína-proteína (Feddermann and Reinhardt, 2011), lo que abre la posibilidad de que puedan asociarse con CNIH1 y/o CNIH2.

8. CONCLUSIONES

En este proyecto se caracterizó la función de dos proteínas homólogas a cornichon en el musgo *Physcomitruim patens* denominadas CNIH1 y CNIH2. Encontramos que estas proteínas comparten motivos similares a sus homólogos en plantas y hongos; sin embargo, nuestro análisis mostró que las proteínas cornichon poseen una región C-terminal más larga, en la que se encuentran los aminoácidos Ser y Thr que están ausentes en los ortólogos. Los tres residuos de treonina (T145, T148 y T150) en CNIH1 son sitios potenciales de fosforilación; en tanto que para CNIH2 se predice solo un sitio de fosforilación potencial en T148.

Similar a otras proteínas cornichon, la localización subcelular de CNIH1 y CNIH2 se encuentra en el retículo endoplásmico y en puntos que corresponden a los sitios de salida del retículo endoplásmico. En el caso de CNIH2, se identificó que podría estar asociado a una subpoblación de ERES marcado por SEC23G. También encontramos que la localización de ambas proteínas cornichon se encuentran entre la unión de las células del protonema, lo que podría corresponder a los desmotúbulos.

También se caracterizó la función de las proteínas cornichon en el musgo a través del uso de mutantes sencillas y dobles. Se determinó que las mutaciones no causan un fenotipo letal, pero que tienen efectos pleiotrópicos durante la fase gametofítica, lo que nos sugiere que están, participando en procesos celulares diferentes y en etapas del desarrollo distintos.

Por otra parte, se identificó al transportador de salida de auxinas PINA, como una proteína cargo de los receptores cornichon, y se encontró que la proteína PINA tiene mayor afinidad por CNIH2 que por CNIH1, a pesar de que estas proteínas son un 72% idénticas en su secuencia de aminoácidos. Se determinó que la localización polarizada del cargo PINA no se ve afectada por la mutación del gen *CNIH1*, pero sí por la mutación del gen *CNIH2*, y que esta localización polarizada de PINA se reestablece al complementar con CNIH2; lo cual nos indica que existe una preferencia del cargo por el receptor.

Por último, se exploró la participación del C-terminal de CNIH2 en relación con la interacción y tráfico de su cargo PINA. El C-terminal de CNIH2 se compone de dos dominios, un dominio ácido y un probable dominio T/S. El dominio ácido conservado, caracterizado anteriormente en nuestro grupo para Erv14p en *S. cerevisiae*, es importante también para la interacción de PINA con CNIH2, ya que sin esos aminoácidos ácidos el receptor no interactúa con su cargo y como consecuencia, el cargo se retiene en el RE. Este sitio de interacción con el cargo está conservado entre hongos y plantas incluyendo el grupo de briofitas. Cabe mencionar que la interacción con el cargo, a pesar de la eliminación completa de la región C-terminal, se mantiene parcialmente, lo cual indica la posible existencia de otros dominios de interacción con el cargo aún por identificar. En el caso del dominio T/S, en este trabajo se propone que el estado fosforilado de CNIH2 juegue un papel en regular la asociación-disociación del receptor con su cargo, en este caso PINA, lo cual influye en un adecuado flujo del cargo por la vía secretoria para localizarse correctamente en la membrana plasmática. Sin embargo, queda por demostrar la fosforilación del dominio C-terminal y caracterizar a nivel molecular la influencia del mismo en el tráfico vesicular. También sería importante conocer si el C-terminal de CNIH1 tiene un papel similar en el musgo.

9. PERSPECTIVAS

La amplitud del presente proyecto abre varias perspectivas que se exponen a continuación:

- Caracterización del papel de los genes cornichon en el estadio del esporofito y el desarrollo de las esporas de *P. patens*.
- Identificación de otras proteínas cargo de CNIH2 y CNIH1 en el estadio de protonema y gametóforo.
- Caracterización funcional-molecular del motivo de fosforilación T/S y su papel en la regulación del tráfico vesicular.
- Caracterización funcional del fenotipo ocasionado por la expresión de las versiones truncadas al C-terminal de CNIH2 en el musgo.
- Caracterización de la vía CNIH2-SEC23G en el protonema y su importancia en el musgo.
- Caracterización de la contribución de las vías tardías que sean importantes para la localización polarizada de los PIN en el musgo.
- Caracterización de las proteínas cornichon en la división y posición de células laterales y su relación con la proteína Vapyrin-like.
- Caracterización de otros motivos conservados de la familia cornichon en plantas.
- Comparación evolutiva de las proteínas cornichon en plantas a través de complementación funcional con cornichones de angiospermas.

10. REFERENCIAS

- Bapaume, L., Laukamm, S., Darbon, G., Monney, C., Meyenhofer, F., Feddermann, N., Chen, M. and Reinhardt, D.** (2019). VAPYRIN marks an endosomal trafficking compartment involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Frontiers in Plant Science* **10**, 1–19.
- Barlowe, C. and Helenius, A.** (2016). Cargo Capture and Bulk Flow in the Early Secretory Pathway. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **32**, 197–222.
- Barlowe, C. K. and Miller, E. A.** (2013). Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics* **193**, 383–410.
- Bassham, D. C., Brandizzi, F., Otegui, M. S. and Sanderfoot, A. A.** (2008). The Secretory System of Arabidopsis. In *The Arabidopsis Book*, pp. 1–29. American Society of Plant Biologists.
- Bennett, T. A., Liu, M. M., Aoyama, T., Bierfreund, N. M., Braun, M., Coudert, Y., Dennis, R. J., O'Connor, D., Wang, X. Y., White, C. D., et al.** (2014). Plasma membrane-targeted PIN proteins drive shoot development in a moss. *Current Biology* **24**, 2776–2785.
- Bhandari, D., Zhang, J., Menon, S., Lord, C., Chen, S., Helm, J. R., Thorsen, K., Corbett, K. D., Hay, J. C. and Ferro-Novick, S.** (2013). Sit4p/PP6 regulates ER-to-Golgi traffic by controlling the dephosphorylation of COPII coat subunits. *Molecular Biology of the Cell* **24**, 2727–2738.
- Blakeslee, J. J., Peer, W. A. and Murphy, A. S.** (2005). Auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 494–500.
- Blom, N., Gammeltoft, S. and Brunak, S.** (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology* **294**, 1351–1362.
- Bökel, C., Dass, S., Wilsch-Bräuninger, M. and Roth, S.** (2006). Drosophila Cornichon acts as cargo receptor for ER export of the TGF α -like growth factor Gurken. *Development* **133**, 459–70.
- Bonifacino, J. S.** (2014). Vesicular transport earns a Nobel. *Trends in Cell Biology* **24**, 3–5.

- Brandizzi, F. and Barlowe, C.** (2013). Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 382–92.
- Brandizzi, F., Snapp, E. L., Roberts, A. G., Lippincott-Schwartz, J. and Hawes, C.** (2002). Membrane protein transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi in tobacco leaves is energy dependent but cytoskeleton independent: Evidence from selective photobleaching. *Plant Cell* **14**, 1293–1309.
- Brockie, P. J., Jensen, M., Mellem, J. E., Jensen, E., Yamasaki, T., Wang, R., Maxfield, D., Thacker, C., Hoerndli, F., Dunn, P. J., et al.** (2013). Cornichons Control ER Export of AMPA Receptors to Regulate Synaptic Excitability. *Neuron* **80**, 129–142.
- Castro, C. P., Piscopo, D., Nakagawa, T. and Derynck, R.** (2007). Cornichon regulates transport and secretion of TGFalpha-related proteins in metazoan cells. *Journal of cell science* **120**, 2454–66.
- Chang, M., Wu, S. Z., Ryken, S. E., OSullivan, J. E. and Bezanilla, M.** (2022). COPII Sec23 proteins form isoform-specific endoplasmic reticulum exit sites with differential effects on polarized growth. *Plant Cell* **34**, 333–350.
- Chardin, P. and McCormick, F.** (1999). Brefeldin A: The Advantage Minireview of Being Uncompetitive. *Cell* **97**, 153–155.
- Cho, M. and Cho, H.-T.** (2013). The function of ABCB transporters in auxin transport. *Plant signaling & behavior* **8:e22990**, 1–3.
- Chung, K. P., Zeng, Y. and Jiang, L.** (2016). COPII Paralogs in Plants: Functional Redundancy or Diversity? *Trends in Plant Science* **21**, 758–769.
- Cove, D., Bezanilla, M., Harries, P. and Quatrano, R.** (2006). Mosses As Model Systems for the Study of Metabolism and Development. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 497–520.
- Cove, D. J., Perroud, P. F., Charron, A. J., McDaniel, S. F., Khandelwal, A. and Quatrano, R. S.** (2009). Culturing the moss *Physcomitrella patens*. *Cold Spring Harbor Protocols* **4**, 1–7.
- Dancourt, J. and Barlowe, C.** (2010). Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annual Review of Biochemistry* **79**, 777–802.

- Dharmasiri, S., Swarup, R., Mockaitis, K., Dharmasiri, N., Singh, S. K., Kowalchuk, M., Marchant, A., Mills, S., Sandberg, G., Bennett, M. J., et al.** (2006). AXR4 is required for localization of the auxin influx facilitator AUX1. *Science* **312**, 1218–20.
- Dhonukshe, P., Aniento, F., Hwang, I., Robinson, D. G., Mravec, J., Stierhof, Y. D. and Friml, J.** (2007). Clathrin-Mediated Constitutive Endocytosis of PIN Auxin Efflux Carriers in Arabidopsis. *Current Biology* **17**, 520–527.
- Drakakaki, G. and Dandekar, A.** (2013). Protein secretion: How many secretory routes does a plant cell have? *Plant Science* **203–204**, 74–78.
- Drdová, E. J., Synek, L., Pečenková, T., Hála, M., Kulich, I., Fowler, J. E., Murphy, A. S. and Žárský, V.** (2013). The exocyst complex contributes to PIN auxin efflux carrier recycling and polar auxin transport in Arabidopsis. *Plant Journal* **73**, 709–719.
- Feddermann, N. and Reinhardt, D.** (2011). Conserved residues in the ankyrin domain of VAPYRIN indicate potential protein-protein interaction surfaces. *Plant Signaling and Behavior* **6**, 680–684.
- Feddermann, N., Duvvuru Muni, R. R., Zeier, T., Stuurman, J., Ercolin, F., Schorderet, M. and Reinhardt, D.** (2010). The PAM1 gene of petunia, required for intracellular accommodation and morphogenesis of arbuscular mycorrhizal fungi, encodes a homologue of VAPYRIN. *Plant Journal* **64**, 470–481.
- Feraru, E., Feraru, M. I., Asaoka, R., Paciorek, T., De Rycke, R., Tanaka, H., Nakano, A. and Friml, J.** (2012). BEX5/RabA1b regulates trans-Golgi network-to-plasma membrane protein trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**, 3074–3086.
- Friml, J., Benková, E., Blilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jürgens, G., et al.** (2002). AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis. *Cell* **108**, 661–673.
- Garay-Arroyo, A., de la Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E. R. and Gutiérrez, C.** (2014). La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia

en el Desarrollo de *Arabidopsis Thaliana*. *Revista de educación bioquímica* **33**, 13–22.

- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A. and Jürgens, G.** (2003). The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* **112**, 219–230.
- Grefen, C., Petr, O. and Harter, K.** (2009). mbSUS-based determination of protein-protein interactions. In *Plant Signal Transduction*, pp. 217–233.
- Grunewald, W. and Friml, J.** (2010). The march of the PINs: Developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *EMBO Journal* **29**, 2700–2714.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S. and Minshull, J.** (2004). Codon bias and heterologous protein expression. **22**,.
- Harant, D. and Lang, I.** (2020). Stay in touch—the cortical ER of moss protonemata in osmotic stress situations. *Plants* **9**, 1–13.
- Herzig, Y., Sharpe, H. J., Elbaz, Y., Munro, S. and Schuldiner, M.** (2012). A systematic approach to pair secretory cargo receptors with their cargo suggests a mechanism for cargo selection by Erv14. *PLoS biology* **10**, e1001329.
- Hiss, M., Meyberg, R., Westermann, J., Haas, F. B., Schneider, L., Schallenberg-Rüdinger, M., Ullrich, K. K. and Rensing, S. A.** (2017). Sexual reproduction, sporophyte development and molecular variation in the model moss *Physcomitrella patens*: introducing the ecotype Reute. *Plant Journal* **90**, 606–620.
- Jackson, D.** (2015). Plasmodesmata spread their influence. *F1000PrimeReports*. 7:25
- Jaillais, Y., Fobis-Loisy, I., Miege, C., Rollin, C., Gaude, T., Miège, C., Rollin, C. and Gaude, T.** (2006). AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in *Arabidopsis*. *Nature* **443**, 106–109.
- Jang, G. and Dolan, L.** (2011). Auxin promotes the transition from chloronema to caulonema in moss protonema by positively regulating PpRSL1 and PpRSL2 in

- Physcomitrella patens*. *New Phytologist* **192**, 319–327.
- Jasin, M. and Rothstein, R.** (2013). Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **5**, 1–18.
- Jones, A. M., Xuan, Y., Xu, M., Wang, R.-S., Ho, C.-H., Lalonde, S., You, C. H., Sardi, M. I., Parsa, S. A., Smith-Valle, E., et al.** (2014). Border control--a membrane-linked interactome of Arabidopsis. *Science* **344**, 711–716.
- Jürgens, G.** (2004). Membrane trafficking in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **20**, 481–504.
- Kamisugi, Y., Schlink, K., Rensing, S. a., Schween, G., von Stackelberg, M., Cuming, A. C., Reski, R. and Cove, D. J.** (2006). The mechanism of gene targeting in *Physcomitrella patens*: Homologous recombination, concatenation and multiple integration. *Nucleic Acids Research* **34**, 6205–6214.
- Kania, U., Fendrych, M. and Friml, J.** (2014). Polar delivery in plants; Commonalities and differences to animal epithelial cells. *Open Biology* **4**,
- Kim, S.-J. and Brandizzi, F.** (2014). The plant secretory pathway: an essential factory for building the plant cell wall. *Plant & cell physiology* **55**, 687–93.
- Kitakura, S., Vanneste, S., Robert, S., Löffke, C., Teichmann, T., Tanaka, H. and Friml, J.** (2011). Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**, 1920–1931.
- Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Swarup, R., Bennett, M. and Friml, J.** (2006). Subcellular trafficking of the Arabidopsis auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *The Plant cell* **18**, 3171–3181.
- Kleine-Vehn, J., Leitner, J., Zwiewka, M., Sauer, M., Abas, L., Luschnig, C. and Friml, J.** (2008). Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromer-dependent vacuolar targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 17812–17817.
- Kleine-Vehn, J., Ding, Z., Jones, A. R., Tasaka, M., Morita, M. T. and Friml, J.** (2010). Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 22344–22349.
- Kofuji, R., Yoshimura, T., Inoue, H., Sakakibara, K., Hiwatashi, Y., Kurata, T.,**

- Aoyama, T., Ueda, K. and Hasebe, M.** (2009). Gametangia Development in The Moss *Physcomitrella Patens*. *Annual Plant Reviews* **36**, 167–181.
- Kriechbaumer, V., Botchway, S. W., Slade, S. E., Knox, K., Frigerio, L., Oparka, K. and Hawes, C.** (2015). Reticulomics: Protein-protein interaction studies with two plasmodesmata-localized reticulon family proteins identify binding partners enriched at plasmodesmata, endoplasmic reticulum, and the plasma membrane. *Plant Physiology* **169**, 1933–1945.
- Lagunas-Gomez, D., Yanez-Dominguez, C., Zavala-Padilla, G., Barlowe, C. and Pantoja, O.** (2023). The C-terminus of the cargo receptor Erv14 affects COPII vesicle formation and cargo delivery. *Journal of Cell Science* **136**,.
- Liu, C.-W., Breakspear, A., Stacey, N., Findlay, K., Nakashima, J., Ramakrishnan, K., Liu, M., Xie, F., Endre, G., de Carvalho-Niebel, F., et al.** (2019). A protein complex required for polar growth of rhizobial infection threads. *Nature Communications* **10**, 1–17.
- Lord, C., Bhandari, D., Menon, S., Ghassemian, M., Nycz, D., Hay, J., Ghosh, P. and Ferro-Novick, S.** (2011). Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic. *Nature* **473**, 181–186.
- Mallett, D. R., Chang, M., Cheng, X. and Bezanilla, M.** (2019). Efficient and modular CRISPR-Cas9 vector system for *Physcomitrella patens*. *Plant Direct* **3**, 1–15.
- Manohar Lal and N . N . Bhandari** (2012). The Development of Sex Organs and Sporophyte in *Physcomitrium cyathicarpum* Mitt. *American Bryological and Lichenological Society Stable* **71**, 11–20.
- McDaniel, S. F.** (2021). Bryophytes are not early diverging land plants. *New Phytologist* **230**, 1300–1304.
- Moody, L. A., Kelly, S., Rabbinowitsch, E. and Langdale, J. A.** (2018). Genetic Regulation of the 2D to 3D Growth Transition in the Moss *Physcomitrella patens*. *Current Biology* **28**, 473–478.
- Morita, M. T. and Shimada, T.** (2014). The plant endomembrane system--a complex network supporting plant development and physiology. *Plant & cell physiology* **55**, 667–71.

- Müller, R., Morant, M., Jarmer, H., Nilsson, L. and Nielsen, T. H.** (2007). Genome-wide analysis of the arabidopsis leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism. *Plant Physiology* **143**, 156–171.
- Munro, S.** (2004). Organelle identity and the organization of membrane traffic. *Nature cell biology* **6**, 469–72.
- Nakagawa, T.** (2019). Structures of the AMPA receptor in complex with its auxiliary subunit cornichon. *Science* **366**, 1259–1263.
- Naramoto, S., Nodzyłski, T., Dainobu, T., Takatsuka, H., Okada, T., Friml, J. and Fukuda, H.** (2014). VAN4 encodes a putative TRS120 that is required for normal cell growth and vein development in Arabidopsis. *Plant & cell physiology* **55**, 750–63.
- Naramoto, S., Hata, Y., Fujita, T. and Kyojuka, J.** (2022). The bryophytes *Physcomitrium patens* and *Marchantia polymorpha* as model systems for studying evolutionary cell and developmental biology in plants. *The Plant Cell* **34**, 228–246.
- Ortiz-Ramírez, C., Hernandez-Coronado, M., Thamm, A., Catarino, B., Wang, M., Dolan, L., Feijó, J. A. A. and Becker, J. D. D.** (2016). A Transcriptome Atlas of *Physcomitrella patens* Provides Insights into the Evolution and Development of Land Plants. *Molecular Plant* **9**, 205–220.
- Pagant, S., Wu, A., Edwards, S., Diehl, F. and Miller, E. a** (2015). Sec24 Is a Coincidence Detector that Simultaneously Binds Two Signals to Drive ER Export. *Current biology: CB* **25**, 403–412.
- Péret, B., Swarup, K., Ferguson, A., Seth, M., Yang, Y., Dhondt, S., James, N., Casimiro, I., Perry, P., Syed, A., et al.** (2012). AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during arabidopsis development. *Plant Cell* **24**, 2874–2885.
- Petrasek, J. and Friml, J.** (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development* **136**, 2675–2688.
- Powers, J. and Barlowe, C.** (1998). Transport of Axl2p Depends on Erv14p, an ER–Vesicle Protein Related to the. *Journal of Cell Biology* **142**, 1209–1222.

- Powers, J. and Barlowe, C.** (2002). Erv14p Directs a Transmembrane Secretory Protein into COPII-coated Transport Vesicles. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 880–891.
- Pumplin, N., Mondo, S. J., Topp, S., Starker, C. G., Gantt, J. S. and Harrison, M. J.** (2010). Medicago truncatula Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Journal* **61**, 482–494.
- Randy, W.** (2009). *Plant Cell Biology*. (ed. Elsevier, I.) Elsevier, Inc.
- Rathgeb, U., Chen, M., Buron, F., Feddermann, N., Schorderet, M., Raisin, A., Häberli, G.-Y., Marc-Martin, S., Keller, J., Delaux, P.-M., et al.** (2020). VAPYRIN-like is required for development of the moss *Physcomitrella patens*. *Development* **147**, 1–12.
- Rensing, S. A., Lang, D., Zimmer, A. D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.-F., Lindquist, E. A., Kamisugi, Y., et al.** (2008a). The *Physcomitrella* Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. *Science* **319**, 64–69.
- Rensing, S. A., Lang, D., Zimmer, A. D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.-F., Lindquist, E. A., Kamisugi, Y., et al.** (2008b). The *Physcomitrella* Genome Reveals Evolutionary Insights into the Conquest of Land by Plants. *Science* **319**, 64–69.
- Reski, R.** (1998). Development, Genetics and Molecular Biology of Mosses. *Botanica Acta* **111**, 1–15.
- Roberts, A. W., Lahnstein, J., Hsieh, Y. S. Y., Xing, X., Yap, K., Chaves, A. M., Scavuzzo-Duggan, T. R., Dimitroff, G., Lonsdale, A., Roberts, E., et al.** (2018). Functional characterization of a glycosyltransferase from the moss *physcomitrella patens* involved in the biosynthesis of a novel cell wall arabinoglucan. *Plant Cell* **30**, 1293–1308.
- Robinson, D. G., Herranz, M.-C. C., Bubeck, J., Pepperkok, R. and Ritzenthaler, C.** (2007). Membrane dynamics in the early secretory pathway. *Critical Reviews in Plant Sciences* **26**, 199–225.
- Robinson, D. G., Brandizzi, F., Hawes, C. and Nakano, A.** (2015). Vesicles versus Tubes: Is Endoplasmic Reticulum-Golgi Transport in Plants

- Fundamentally Different from Other Eukaryotes? *Plant Physiology* **168**, 393–406.
- Rosas-Santiago, P., Lagunas-Gómez, D., Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Lalonde, S., Jones, A., Frommer, W. B., Zimmermannova, O., Sychrová, H. and Pantoja, O.** (2015). Identification of rice cornichon as a possible cargo receptor for the Golgi-localized sodium transporter OsHKT1;3. *Journal of experimental botany* **66**, 2733–2748.
- Rosas-Santiago, P., Zimmermannova, O., Vera-Estrella, R., Sychrová, H. and Pantoja, O.** (2016). Erv14 cargo receptor participates in yeast salt tolerance via its interaction with the plasma-membrane Nha1 cation/proton antiporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1858**, 67–74.
- Rosas-Santiago, P., Lagunas-Gomez, D., Yáñez-Domínguez, C., Vera-Estrella, R., Zimmermannová, O., Sychrová, H. and Pantoja, O.** (2017). Plant and yeast cornichon possess a conserved acidic motif required for correct targeting of plasma membrane cargos. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1864**, 1809–1818.
- Rounds, C. M. and Bezanilla, M.** (2013). Growth mechanisms in tip-growing plant cells. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 243–265.
- Saint-Jore, C. M., Evins, J., Batoko, H., Brandizzi, F., Moore, I. and Hawes, C.** (2002). Redistribution of membrane proteins between the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum in plants is reversible and not dependent on cytoskeletal networks. *Plant Journal* **29**, 661–678.
- Sato, K. and Nakano, A.** (2007). Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS letters* **581**, 2076–82.
- Sauvageau, E., Rochdi, M. D., Oueslati, M., Hamdan, F. F., Percherancier, Y., Simpson, J. C., Pepperkok, R. and Bouvier, M.** (2014). CNIH4 interacts with newly synthesized GPCR and controls their export from the endoplasmic reticulum. *Traffic* **15**, 383–400.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al.** (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature*

Methods **9**, 676–682.

- Shanks, N. F., Cais, O., Maruo, T., Savas, X. J. N., Zaika, E. I., Azumaya, C. M., Yates, J. R., Greger, I. and Nakagawa, T.** (2014). Molecular dissection of the interaction between the AMPA receptor and cornichon homolog-3. *Journal of Neuroscience* **34**, 12104–12120.
- Shi, Y., Suh, Y. H., Milstein, A. D., Isozaki, K., Schmid, S. M., Roche, K. W. and Nicoll, R. A.** (2010). Functional comparison of the effects of TARPs and cornichons on AMPA receptor trafficking and gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 16315–16319.
- Smertenko, A., Assaad, F., Baluška, F., Bezanilla, M., Buschmann, H., Drakakaki, G., Hauser, M. T., Janson, M., Mineyuki, Y., Moore, I., et al.** (2017). Plant Cytokinesis: Terminology for Structures and Processes. *Trends in Cell Biology* **27**, 885–894.
- Stefano, G., Hawes, C. and Brandizzi, F.** (2014). ER - the key to the highway. *Current opinion in plant biology* **22**, 30–8.
- Steinmann, T., Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C. L., Paris, S., Gälweiler, L., Palme, K. and Jürgens, G.** (1999). Coordinated Polar Localization of Auxin Efflux Carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* **286**, 316–318.
- Tanaka, H., Kitakura, S., De Rycke, R., De Groodt, R. and Friml, J.** (2009). Fluorescence Imaging-Based Screen Identifies ARF GEF Component of Early Endosomal Trafficking. *Current Biology* **19**, 391–397.
- Teh, O. K. and Moore, I.** (2007). An ARF-GEF acting at the Golgi and in selective endocytosis in polarized plant cells. *Nature* **448**, 493–496.
- Thelander, M., Olsson, T. and Ronne, H.** (2005). Effect of the energy supply on filamentous growth and development in *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany* **56**, 653–662.
- Thelander, M., Landberg, K. and Sundberg, E.** (2017). Auxin-mediated developmental control in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany* **69**, 1–14.

- Titapiwatanakun, B., Blakeslee, J. J., Bandyopadhyay, A., Yang, H., Mravec, J., Sauer, M., Cheng, Y., Adamec, J., Nagashima, A., Geisler, M., et al.** (2009). ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in Arabidopsis. *Plant Journal* **57**, 27–44.
- Viaene, T., Landberg, K., Thelander, M., Medvecka, E., Pederson, E., Feraru, E., Cooper, E. D., Karimi, M., Delwiche, C. F., Ljung, K., et al.** (2014). Directional auxin transport mechanisms in early diverging land plants. *Current Biology* **24**, 2786–2791.
- Vidali, L. and Bezanilla, M.** (2012). Physcomitrella patens: A model for tip cell growth and differentiation. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 625–631.
- Weigel, A. V., Chang, C. L., Shtengel, G., Xu, C. S., Hoffman, D. P., Freeman, M., Iyer, N., Aaron, J., Khuon, S., Bogovic, J., et al.** (2021). ER-to-Golgi protein delivery through an interwoven, tubular network extending from ER. *Cell* **184**, 2412–2429.
- Wu, G., Otegui, M. S. and Spalding, E. P.** (2010). The ER-localized TWD1 immunophilin is necessary for localization of multidrug resistance-like proteins required for polar auxin transport in Arabidopsis roots. *The Plant cell* **22**, 3295–304.
- Wu, S. Z., Ritchie, J. a., Pan, A. H., Quatrano, R. S. and Bezanilla, M.** (2011). Myosin VIII regulates protonemal patterning and developmental timing in the moss physcomitrella patens. *Molecular Plant* **4**, 909–921.
- Wudick, M. M., Portes, M. T., Michard, E., Rosas-Santiago, P., Lizzio, M. A., Nunes, C. O., Campos, C., Santa Cruz Damineli, D., Carvalho, J. C., Lima, P. T., et al.** (2018). CORNICHON sorting and regulation of GLR channels underlie pollen tube Ca²⁺ homeostasis. *Science* **360**, 533–536.
- Yáñez Domínguez, C.** (2017). Participación de Erv14p en la detoxificación de cobre y la tolerancia a ácidos débiles en la levadura. *TESIS*.
- Yang, H. and Murphy, A. S.** (2009). Functional expression and characterization of Arabidopsis ABCB, AUX 1 and PIN auxin transporters in Schizosaccharomyces pombe. *Plant Journal* **59**, 179–191.
- Yang, Y., Hammes, U. Z., Taylor, C. G., Schachtman, D. P. and Nielsen, E.**

- (2006). High-Affinity Auxin Transport by the AUX1 Influx Carrier Protein. *Current Biology* **16**, 1123–1127.
- Yonemura, Y., Li, X., Müller, K., Krämer, A., Atigbire, P., Mentrup, T., Feuerhake, T., Kroll, T., Shomron, O., Nohl, R., et al.** (2016). Inhibition of cargo export at ER exit sites and the trans-Golgi network by the secretion inhibitor FLI-06. *Journal of Cell Science* **129**, 3868–3877.
- Young, G., Jack, D., Smith, D. and Saier, M.** (1999). The amino acid/auxin:proton symport permease family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1422**, 306–322.
- Zazimalová, E., Murphy, A. S., Yang, H., Hoyerova, K. and Hosek, P.** (2010). Auxin Transporters — Why So Many? *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, 1–14.
- Zhang, Y., Rodriguez, L., Li, L., Zhang, X. and Friml, J.** (2020). Functional innovations of PIN auxin transporters mark crucial evolutionary transitions during rise of flowering plants. *Sci. Adv* **6**, 8895–8906.
- Zhang, D., Watson, J. F., Matthews, P. M., Cais, O. and Greger, I. H.** (2021). Gating and modulation of a hetero-octameric AMPA glutamate receptor. *Nature* **594**, 454–458.

11. TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla S1 Las proteínas homologas que forman la vesícula COPII en <i>S. cerevisiae</i> , <i>A. thaliana</i> y el musgo <i>P. patens</i> .		
<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. thaliana</i> *	<i>P. patens</i> +
Sar1	Sar1a (At1g09180) Sar1b (At1g56330) Sar1c (At4g02080) Sar1d (At3g62560) Sar1e (At1g02620)	<i>Pp3c2_12620V3.1</i> <i>Pp3c2_5480V3.1</i> <i>Pp3c20_15600V3.1</i> <i>Pp3c23_6490V3.1</i>
Sec12	At5g50550 At5g50650 Sec12-like (At2g01470) Sec12-like (At3g52190)	<i>Pp3c21_8000V3.1</i> <i>Pp3c22_1410V3.1</i> Sec12-like (<i>Pp3c13_12620V3.1</i>) Sec12-like (<i>Pp3c3_15480V3.1</i>)
Sec23	Sec23a (At4g01810) Sec23b (At1g05520) Sec23c (At2g21630) Sec23d (At2g27460) Sec23e (At3g23660) Sec23f (At4g14160) Sec23g (At5g43670)	Sec23A (<i>Pp1s77_4V3.1</i>) Sec23B (<i>Pp1s176_120 V3.1</i>) Sec23C (<i>Pp1s1_345 V3.1</i>) Sec23D (<i>Pp1s55_55 V3.1</i>) Sec23E (<i>Pp1s181_124 V3.1</i>) Sec23F (<i>Pp1s62_159 V3.1</i>) Sec23G (<i>Pp1s196_14 V3.1</i>)
Sec24	At3g07100 At3g44340 At4g32640 At2g27460 Sec24a (At3g07100) Sec24b (At3g44340) Sec24c (At4g32640)	Sec24A (<i>Pp1s358_10 V3.1</i>) Sec24B (<i>Pp1s570_1 V3.1</i>) Sec24C (<i>Pp1s59_281 V3.1</i>) Sec24D (<i>Pp1s59_293 V3.1</i>) Sec24E (<i>Pp1s30_364 V3.1</i>) Sec24F (<i>Pp1s29_149 V3.1</i>) Sec24G (<i>Pp1s220_95 V3.1</i>)

Sec13	Sec13a (At2g30050)	<i>Pp3c22_17920V3.1</i>
	Sec13b (At3g01340)	<i>Pp3c19_12500V3.1</i> <i>Pp3c19_9370V3.1</i> <i>Pp3c22_20020V3.1</i>
Sec31	Sec31a (At1g18830)	<i>Pp3c2_17710V3.1</i>
	Sec31b (At3g63460)	<i>Pp3c1_29660V3.1</i>

*Números de acceso obtenidos de acuerdo con Chung, K.P. y col. Trends in Plant Science. 2016, y en la base de datos ARAMEMNON (<http://aramemnon.uni-koeln.de/index.ep>); +base de datos Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) con una identidad $\geq 50\%$, respecto a los homólogos de *A.thaliana*.

Tabla S2. Los números de copias en *A. thaliana* y *P. patens* de los genes conservados seleccionados que se sabe que codifican para los componentes centrales de la maquinaria de la auxina en las plantas con flores.*

Familia de proteínas	Genes en <i>A. thaliana</i>	Genes en <i>P. patens</i>	Referencias seleccionadas que analizan los genes de <i>P. patens</i>
Receptores de auxinas TIR1/AFB	6	4	Prigge et al., 2010; Lavy et al., 2012
Co-represores Aux/IAA	29	3	Paponov et al., 2009; Prigge et al., 2010; Lavy et al., 2016
Factores de respuesta a auxinas (ARF)	23	12-17	Paponov et al., 2009, Lavy et al., 2016, Plavskin et al., 2016
Factores de transcripción SHI/STY	10	2	Eklund et al., 2010; Landberg et al., 2013
Enzimas de biosíntesis de auxina relacionadas con TAA1 (TAR)	5	6	Thelander et al., 2017
Enzimas de biosíntesis de auxina relacionadas con YUCCA (YUC)	11	6	Rensing et al., 2008

Transportadores de salida de auxina PIN	8	4	Bennett et al., 2014b; Viaene et al., 2014
Importadores de auxina AUX1/IAA	4	8	Rensing et al., 2008
Transportadores de auxina PGP/ABCB	+3 (ABCB1, ABCB4, ABCB19)	Posiblemente	Carraro et al., 2012
Transportadores de auxina PILS	7	5	Feraru et al., 2012
Enzimas conjugadoras de auxina GH3	8	2	Ludwig-Müller et al., 2009a, b

*Tabla traducida al español y tomada de la revisión de Thelander, M. y colaboradores, *New Phytologist* 2019.

Tabla S3. Líneas de los musgos utilizados en este trabajo

Nombre	Técnica molecular	Marcador de selección	Descripción	Referencias
WT	-	-	<i>Physcomitrium (Physcomitrella) patens</i> var. <i>Gransden</i>	Este estudio
<i>cnih1-6</i>	Sistema CRISPR-Cas9	-	Eliminación de 313 pb en <i>CNIH1</i> resultando un codón de paro prematuro en la posición 132	Este estudio
<i>cnih1-23</i>	Sistema CRISPR-Cas9	-	Eliminación de 313 pb en <i>CNIH1</i> resultando un codón de paro prematuro en la posición 132	Este estudio
Δ <i>cnih2-3</i>	Recombinación homóloga	Higromicina	Mutante nula de <i>CNIH2</i>	Este estudio
Δ <i>cnih2-38</i>	Recombinación homóloga	Higromicina	Mutante nula de <i>CNIH2</i>	Este estudio
<i>cnih1-23/\Delta</i> <i>cnih2-12</i>	Sistema CRISPR-Cas9 / Recombinación homóloga	Higromicina	Eliminación de 313 pb en <i>CNIH1</i> resultando un codón de paro prematuro en la posición 132	Este estudio
<i>cnih1-23/\Delta</i> <i>cnih2-19</i>	Sistema CRISPR-Cas9/ Recombinación homóloga	Higromicina	Eliminación de 313 pb en <i>CNIH1</i> resultando un codón de paro prematuro en la posición 132/ Mutante	Este estudio

			nula de <i>CNIH2</i>	
YFP- <i>GmMan1</i>	Recombinación homóloga	Higromicina	Marcador de cis- Golgi	Bezanilla lab
<i>PpCNIH2pro::PpCNIH2-3xmRuby-22</i>	Sistema CRISPR-Cas9 & Reparación por homología directa	-	Inserción en marco de tres proteínas mRuby2 en tándem en el extremo C del gen <i>CNIH2</i> en fondo de musgo WT	Este estudio
<i>PpCNIH2pro::PpCNIH2-3xmRuby+PpSEC23Gpro::PpSEC23G-3xmNeon-7</i>	Sistema CRISPR-Cas9 & Reparación por homología directa	-	Inserción en marco de tres proteínas mNeonGreen en tándem en el extremo C del gen <i>SEC23G</i> . Fondo de <i>CNIH2-3mRuby</i>	Este estudio
<i>PpPINApro::PpPINA-GFP-1</i>	Recombinación homóloga	G-418	PINA-EGFP knock-in	Landberg lab
<i>PpPINApro::PpPINA-GFP-1ΔcniH2-3</i>	Recombinación homóloga	G-418 e Higromicina	Mutante nula de <i>CNIH2</i> en el fondo PINA-EGFP	Este estudio
<i>PpPINApro::PpPINA-GFP-1ΔcniH2-5</i>	Recombinación homóloga	G-418 e Higromicina	Mutante nula de <i>CNIH2</i> en el fondo PINA-EGFP	Este estudio
<i>PpPINApro::PpPINA-GFP-1cniH1-A2</i>	Sistema CRISPR-Cas9	G-418	Eliminación de 313 pb en <i>CNIH1</i> resultando un codón de paro prematuro en la posición 132. Fondo PINA-EGFP	Este estudio
<i>PpPINApro::PpPINA-GFP-1</i>	Sistema CRISPR-Cas9	G-418	Eliminación de 313 pb en <i>CNIH1</i> resultando un	Este estudio

<i>cnih1-B5</i>			codón de paro prematureo en la posición 132. Fondo PINA-EGFP	
-----------------	--	--	---	--

Tabla S4. Las secuencias de los sitios *att* para el sistema multisitio Gateway Pro (Invitrogen, CA, EE. UU.)

Vector y tipo de Recombinación	<i>att</i> sitios	Secuencias 5' a 3'
pDONR™ 221 P1-P5r 2-fragment, 4-fragment	attB1 attB5r	Fwd: 5' GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TNN Rev: 5'GGGG AC AAC TTT TGT ATA CAA AGT TGT
pDONR™ 221 P5-P2 2-fragment	attB5 attB2	Fwd: 5' GGGG ACA ACT TTG TAT ACA AAA GTT GNN Rev: 5' GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA
pDONR™ 221 P1-P4 3-fragment	attB1 attB4	Fwd: 5' GGGGACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TNN Rev: 5'GGGG AC AAC TTT GTA TAG AAA AGT TGG GTG
pDONR™ 221 P4r-P3r 3-fragment, 4-fragment	attB4r attB3r	Fwd: 5' GGGG ACA ACT TTT CTA TAC AAA GTT GNN Rev: 5'GGGG AC AAC TTT ATT ATA CAA AGT TGT
pDONR™ 221 P3-P2 3-fragment, 4-fragment	attB3 attB2	Fwd: 5' GGGG ACA ACT TTG TAT AAT AAA GTT GNN Rev: 5'GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA
pDONR™ 221 P5-P4 4-fragment	attB5 attB4	Fwd: 5' GGGG ACA ACT TTG TAT ACA AAA GTT GNN Rev: 5'GGGG AC AAC TTT GTA TAG AAA AGT TGG GTG

Tabla S5. La lista de los oligonucleótidos usados en este trabajo.

Nombre	Secuencia 5' – 3'	Referencias
Clonación		
attB1 (5' half sequence)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	Este estudio
attB2 (5' half sequence)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	Este estudio
<i>PpCNIH1-For</i>	GTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGATGGACTTC	Este estudio
<i>PpCNIH1-Rev</i>	GTACAAGAAAGCTGGGTCCATGTCTGCGTGGATTG	Este estudio
<i>PpCNIH2-For</i>	GTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCTTCCGATCTCC	Este estudio
<i>PpCNIH2-Rev</i>	GTACAAGAAAGCTGGGTCCATGTTTGCCTGGATC	Este estudio
<i>PpCNIH2-141-Rev</i>	GTACAAGAAAGCTGGGTCTTCCTCATGCTCAAGAAT TAAG	Este estudio
<i>PpCNIH2-137-Rev</i>	GTACAAGAAAGCTGGGTCAAGAATTAAGTAGACGG CTGC	Este estudio
Mutación de <i>CNIH1</i> por sistema CRISPR-Cas9		
sgRNACN1-1E-null-Rv	AAACAGCAGCGAGACAACAGCGAA	Este estudio
sgRNACN1-1E-null-Fwd	CCATTTTCGCTGTTGTCTCGCTGCT	Este estudio
sgRNACN1-2E-Fwd	CCATTAAGAAGGTAGGTGCAGCCC	Este estudio
sgRNACN1-2E-Rv	AAACGGGCTGCACCTACCTTCTTA	Este estudio
sgRNACN1-3E-Fwd	CCATACGGAGATCTTCAGTCACT	Este estudio
sgRNACN1-3E-Rv	AAACAGGTGACTGAAGATCTCCGT	Este estudio
sgRNACN1 4E-	CCATCCTCATGCTCCAGAAGTAGG	Este estudio

Fwd		
sgRNACN1-4E-Rv	AAACCCTAGTTCTGGAGCATGAGG	Este estudio
Genotipificación de mutantes <i>CNIH1</i> CRISPR-Cas9		
CN1-null-Fwd	CCATTTTCGCTGTTGTCTCGCTGCT	Este estudio
D-cni1-KO-Rv	GGACGTATGGACTGAATCC	Este estudio
Mutación de <i>CNIH2</i> por Recombinación homóloga		
ATTB1-CNI2-M-Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGGTTT AAACGATAGTGAGAGTGAGATGATTGAGG	Este estudio
ATTB4-CNI2-M-Rv	GGGGACAAC TTTGTATAGAAAAGTTGGGTGGCTCC CGGCTTTCGCTGCTCCTCTC	Este estudio
ATTB3-CNI2-4R-Fw	GGGGACAAC TTTGTATAATAAAGTTGTAATTCTCTTT GGTTCGTAGCCCATTGG	Este estudio
ATTB2-CNI2-4R-Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGTTTAA ACAATTCATCTTCGCTTGA ACTAC	Este estudio
Genotipificación de mutantes nulas <i>CNIH2</i>		
Higro-F	GTCTGTGCGAGAAGTTTCTGATCG	Este estudio
Higro-R	CGTCGGTTTCCACTATCGG	Este estudio
CN2-outer-up-F	GGAACGTACATGAGATGTGTCAAG	Este estudio
CN2-outer-DW-R	CTCCCTCGTGTACTCCTTCC	Este estudio
C2-F	GCTGTTCTTGCTCAACGTTCC	Este estudio
C2-R	CTGACTGGACAGATTCTCATGC	Este estudio
Ubi10-F	ACTACCCTGAAGTTGTATAGTTCCG	Este estudio
Ubi10-R	CAAGTCACATTACTTCGCTGTCTAG	Este estudio
Generación de Knock-in <i>CNIH2</i> por sistema CRISPR-Cas9&HDR		
CN2-tag-Fwd	CCATCCGAGAAAGTTCCAGCTGAC	Este estudio
CN2-tag-Rv	AAACGTCAGCTGGA ACTTTCTCGG	Este estudio
pENT-CN2-Up-mut-Fw	GAATCTGTaCAGTCAGCTGGAAC	Este estudio

pENT-CN2-Up- mut-Rv	GCTGACTGtACAGATTCCTC	Este estudio
B1-CNIH2-tag- Fwd	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGTCCTT GCGTCTATCACATCACG	Este estudio
B4-CNIH2-tag- Rv	GGGGACAAGTTTGTATAGAAAAGTTGGGTGCATGTT TGGTGGATCCCCGAGAAAG	Este estudio
B3-CNIH2-tag- Fwd	GGGGACAAGTTTGTATAATAAAGTTGCGTCCTTGTG ACTGTCACACTGAACC	Este estudio
B2-CNIH2-tag- Rv	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGCAAG ACATGAGCTAGATACCAAC	Este estudio
Genotipificación de línea CNIH2-3xmRuby		
cn2-downarm- Fwd	CATGTATCGTTTCTGTCATG	Este estudio
cn2-uparm-Rv	GATGTCATGTCAATACCAATG	Este estudio
Genotipificación de línea SEC23G-3xmNeon		
S23g-int-F	GCTACTGATCAATGTTGACTGG	Este estudio
S23g-int-R	GAAGTAGTTCACTACTCCACG	Este estudio
Expresión del transcrito PINA-EGFP		
EGFP-Fwd	TAAACGGCCACAAGTTCAGCG	Este estudio
pinA-Rv	GAGAGGTGCCACCTATTTGCAACC	Este estudio

Tabla S6. Los homólogos de cornichon en plantas, algas y hongos utilizados en el presente trabajo.

Especie	Identificador	Base de datos
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtCNIH1: At3g12180.1 AtCNIH2: At1g12340.1 AtCNIH3: At1g62880.1 AtCNIH4: At1g12390.1 AtCNIH5: At4g12090.1	* ARAMEMNON (http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/)
<i>Oryza sativa</i>	OsCNIH1: Os06g-04500.1 OsCNIH2: Os12g32180.1	* Phytozome (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/)
<i>Zea mays</i>	ZmCNIH1: GRMZM-2G073023.01 ZmCNIH2: GRMZM2G018885.01 ZmCNIH3: GRMZM2-G124658.01	* EnsemblPlants for algae Chara braunii (https://plants.ensembl.org/Chara_braunii/Info/Index)
<i>Pppulus trichocarpa</i>	PtCNIH1: Potri006g057300.3 PtCNIH2: Potri016g051000.1 PtCNIH3: Potri003g116400.1 PtCNIH4: Potri001g116-100.1	
<i>Ananas comosus</i>	AcCNIH: Aco015328.1	
<i>Zostera marina</i>	ZmaCNIH1: Zosma28g00840 ZmaCNIH2: Zosma153g00310 ZmaCNIH3: Zosma42g010-60	
<i>Selaginella moellendorfi</i>	SmCNIH: 93931(PAC:15402723)	

<i>Physcomitriu m patens</i>	PpCNIH1: Pp3c11_17020V3. 3 PpCNIH2: Pp3c7_11500V3.3	
<i>Marchantia polymorpha</i>	MpCNIH: Mapoly0124s0019	
<i>Chlamydomo nas reinhardtii</i>	CrCNIH: Cre01.g036550_45 32	
<i>Dunaliela salina</i>	DsCNIH: Dusal.0011s00016	
<i>Chara braunii</i>	CbCNIH: GBG61058.1	
<i>Saccharomyc es cerevisiaes</i>	ScErv14p: SGD:S000003022	* Yeast Genome database (www. yeastgenome.org)
<i>Schizo- saccharomyc es pombe</i>	SpCNIH: NP_594657.1	* NCBI
<i>Neurospora crassa</i>	NcCNIH: XP_011395262.1	
<i>Aspergillus nidulans</i>	AnCNIH: XP_ 662799.1	

12. ANEXOS

ANEXO 1. EL MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO RUTINARIO PARA EL MUSGO (*PpNH4*).

Receta para preparar las soluciones stock.

1. Microelementos 1000X

Medir estos reactivos en una balanza analítica.

H ₃ BO ₃	614 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	55 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	389 mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	55 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	55 mg
KI	28 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	25 mg

Aforar a 1 litro de agua, almacene en alícuotas de 200 ml.

Esterilizar y almacenar a 4°C

2. Soluciones 100X:

MgSO ₄	25.4 g/L
KH ₂ PO ₄	25 g/L
Ca(NO) ₃	100 g/L
(NH ₄) ₂ -tartrate	50g/L

Esterilizar y almacenar a 4°C.

3. Receta para preparar medio.

Agregar agua milliQ antes que las soluciones madre (100X).

	<u>0.5L</u>	<u>1L</u>	<u>2L</u>	<u>4L</u>
MgSO ₄ (ml)	5	10	20	40
KH ₂ PO ₄ (ml)	5	10	20	40
Ca(NO) ₃ (ml)	5	10	20	40
(NH ₄) ₂ -tartrate (ml)	5	10	20	40
FeSO ₄ (mg)	6.25	12	25	50
(Pesar en la balanza analítica)				
Microelementos (ml)	0.5	1	2	4

Aforar al volumen final

Medir el pH con tiras. El pH es alrededor de 5.6

Agregar 7g de agar por litro de medio. Esterilizar por Autoclave

ANEXO 2. EL MEDIO DE REGENERACIÓN DE LOS PROTOPLASTOS (PRMB)

1. **Preparar una solución stock de 0.5M CaCl₂**. Esto se puede hacer por adelantado, esterilizado en autoclave y almacenado a temperatura ambiente.
2. **Receta para preparar medio.**

Agregue agua milliQ antes de agregar las soluciones madre (100X).

	0.5L	1L	2L	4L
MgSO ₄ (ml)	5	10	20	40
KH ₂ PO ₄ (ml)	5	10	20	40
Ca(NO ₃) ₃ (ml)	5	10	20	40
(NH ₄) ₂ -tartrate (ml)	5	10	20	40
FeSO ₄ (mg) (Pesar en la balanza analítica)	6.25	12	25	50
Microelementos (ml)	0.5	1	2	4
Manitol (gr)	15	30	60	240

Aforar al volumen final

Medir el pH con tiras. El pH es alrededor de 5.6

Agregar 7g de agar por litro de medio. Esterilizar por Autoclave

Dejar enfriar ~25 minutos

Añadir CaCl₂ (stock 0.5M):

0.5L	10 ml
1L	20 ml
2L	40 ml
4l	80 ml

Mezclar bien.

ANEXO 3. LOS REACTIVOS DE LA TRANSFORMACIÓN PARA EL MUSGO.

1. Soluciones stock requeridas para los amortiguadores de transformación*:

a. 1M Ca(NO₃)₂·4H₂O

Disolver 236.1 g por 1 litro de H₂O ultrapura estéril

b. 1M MgCl₂·6H₂O (Amresco 0288-1KG)

Disolver 203.3 g por 1 litro de H₂O ultrapura estéril

c. 1% MES (Sigma M-2933) pH 5.6

1 g en 100 ml de H₂O ultrapura estéril. Llevar al pH correcto con una solución de 0.1 M KOH.

d. 1M Tris (Amresco 0497 10 kg) pH 8.0

Esterilizar todas las soluciones por autoclave y almacenar a 4°C.

e. 8.5% Manitol

Disolver 85 g en 1 litro de H₂O ultrapura estéril

Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente.

f. Driselasa 2%

Para preparar 200 ml:

- En un vaso de precipitado de vidrio, disolver 4 g Driselasa (Sigma D9515-25G) en 200 ml de 8.5% Manitol.
- Mezclar con agitador magnético por 30 minutos a temperatura ambiente. Sellar el vaso con Parafilm.
- Mantener a 4°C por 30 minutos.
- Mezclar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 2,500g por 10 minutos en tubos cónicos de 50 ml (estériles).
- Esterilizar el sobrenadante por filtración. Utilizar un filtro de 0.22 µm.
- Hacer alícuotas de 10 ml en tubos cónicos de 15 ml (estériles).
- Almacenar a -20°C.

***NOTA:** todas las soluciones stock (**a-f**) se pueden escalar hacia un volumen menor dependiendo del uso requerido.

ANEXO 4. LOS AMORTIGUADORES DE TRANSFORMACIÓN PARA EL MUSGO

¡¡Realizar su preparación en campana de flujo laminar, evitar abrir los tubos fuera de ésta para evitar contaminación!!

1. Preparación del amortiguador de transformación 3M (50 ml):

- 4.55 g Mannitol
- 750 µl 1M MgCl₂·6H₂O
- 5 ml 1% MES pH 5.6
- Aforar hasta 50 ml con H₂O ultrapura estéril.
- Mezclar bien con vórtex
- Esterilizar por filtración. Utilizar un filtro de 0.22 µm.
- Almacenar a 4°C.

2. Preparación del amortiguador de transformación PEG (10 ml):

A). En un tubo cónico estéril de 50 ml agregar lo siguiente:

9 ml	8.5% Manitol
1 ml	1M Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O
100 µl	1M Tris pH 8.0

Mezclar bien con vórtex. Esterilizar por filtración. Utilizar un filtro de 0.22 µm.

B). Pesar en un tubo cónico estéril de 50 ml agregar lo siguiente:

4 g	PEG 8000 (Sigma P-2139)
-----	-------------------------

En un vaso de precipitado de plástico con agua colocar el tubo cónico y derretir (modo baño maría) cuidadosamente el PEG en microondas. Dejar floja la tapa del tubo cónico.

C). En campana de flujo laminar filtrar la solución A en el tubo con el PEG derretido y disolver bien con vórtex hasta quedar una mezcla homogénea. Esperar 2 h para usar el amortiguador PEG o almacenar a -20°C.

ANEXO 5. LAS SOLUCIONES DE RESUSPENSION Y PLAQUEO DE LOS PROTOPLASTOS.

Liquid Plating Media (solución LPM):

PpNH4 + 8.5% Manitol

5 ml + 0.425 g

10 ml + 0.85 g

20 ml + 1.7 g

50 ml + 4.25 g

Mezclar bien con vórtex

Esterilizar por Autoclave.

Antes de resuspender los protoplastos asegurarse de haber agregado $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (stock 500 mM):

LPM 1 ml 20 μl $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (concentración final 10 mM)

5 ml 100 μl

10 ml 200 μl

25 ml 500 μl

50 ml 1 ml

Top Agar (PRMT):

Para 100 ml:

- En 80 ml de medio *PpNH4* agregar 6.0 g de Manitol
- Mezclar bien
- Aforar a 100 ml
- Agregar 600 mg de Agar
- Esterilizar por autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

Al momento de utilizar el medio PRMT dejar enfriar y luego agregar el volumen adecuado de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para una concentración final de 10 mM (ver LPM).

Resuspender los protoplastos y plaquear inmediatamente para evitar solidificación prematura del medio PRMT.

ANEXO 6. LA FORMULA PARA LA TRANSFORMACION DE LOS PROTOPLASTOS

Tomar 10 μ l de la suspensión de protoplastos y colocar el volumen en un hemocitrómetro, luego contar el número de protoplastos en cada uno de los cuatro cuadrados (3x3) de las esquinas.

Utilizar la siguiente fórmula:

protoplastos totales/4*20 = X ml de amortiguador 3M para resuspender la pastilla de protoplastos.

ANEXO 7. EL PROTOCOLO PARA LA EXTRACCION DEL PLASMIDO POR LISIS ALCALINA

Para transformar los protoplastos de musgo se requieren concentraciones altas de ADN/plásmido. A continuación, se describe el protocolo:

1. En un matraz con 50 ml de medio LB, inocular de glicerol e incubar a 37°C por 18h, a 250 r.p.m.
2. Colectar el cultivo crecido a un tubo cónico de 50 ml y centrifugar a 4,000 rpm por 10 min, descartar el sobrenadante, y con una pipeta remover el resto del mismo, de manera que la pastilla de bacterias quede lo más seca posible.
3. La pastilla de células se resuspende en 2 ml de la Solución I esterilizada (Tris-HCl, 25mM, pH 8.0; EDTA, 50 mM; estéril), luego tomar 200 µl de esta suspensión y repartir en microtubos estériles de 1.5 ml (aproximadamente 10 microtubos)
4. Agregar 200 µl de la Solución II recién preparada (NaOH, 0.2 M; SDS, 1%) y mezclar de 5 a 6 veces suavemente por inversión.
5. En seguida agregar 200 µl de la Solución III fría (acetato de potasio, 5M, pH 4.8; ácido acético, 11.5% v/v), incubar en hielo por 5 min, después centrifugar a 13,000 r.p.m por 10 min a 4°C. Transferir el sobrenadante a un microtubo de 1.5 ml nuevo.
6. Agregar 2.0 µl de RNAsa (20 mg/ml). Incubar los microtubos a 37°C, 30 min.
7. Agregar 400 µl de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) mezclar con ayuda de un vórtex, luego centrifugar a temperatura ambiente por 5 min a 13,000 r.p.m. Con ayuda de una pipeta transferir la fase acuosa a un microtubo nuevo de 1.5 ml.
8. Agregar 400 µl cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), mezclar con un vórtex, y posteriormente centrifugar los tubos a temperatura ambiente por 5 min a 13,000 r.p.m. Tomar la fase superior y transferir a un microtubo nuevo de 1.5 ml.
9. Añadir 900 µl de etanol absoluto frío y mezclar por vórtex; inmediatamente después, colocar los microtubos en hielo e incubar por 30 min.
10. Centrifugar los microtubos a 13,000 r.p.m. por 15 min, a 4°C. Una vez centrifugados, se descarta el sobrenadante y agregar 500 µl de etanol al 70% a cada tubo.

11. Por último, los microtubos se centrifugan por 1 min y el sobrenadante se remueve cuidadosamente con una pipeta. Se deja secar la pastilla de ADN plasmídico.
12. El ADN plasmídico seco se concentra en un solo microtubo de 1.5 ml estéril al resuspender en un volumen final de 100-200 μ l de agua ultrapura estéril.
13. La cantidad de ADN plasmídico concentrado se cuantifica por nanodrop para su transformación de protoplastos de musgo.

ANEXO 8. LA EXTRACCIÓN DE ARN POR TIOCIANATO DE GUANIDINA ACIDA-FENOL (TRIZOL PARA PLANTAS).

Realizar los pasos 1-11 en campana de flujo laminar.

1. Tomar $\frac{1}{4}$ de tejido de musgo subcultivado de una semana con una cucharilla de metal estéril.
2. Para quitar el exceso de agua al tejido de musgo, colocar el tejido del musgo sobre dos capas de toallas absorbentes Kimwipes y luego sobre el tejido colocar otras dos capas más de toallas para formar una especie de sándwich, con la misma cucharilla se aplasta el tejido hasta dejarlo lo más seco posible.
3. Una vez hecho esto, el tejido seco se pasa a un microtubo estéril de 1.5 ml y se congela inmediatamente en nitrógeno líquido.
4. El tejido congelado se pulveriza manualmente con la ayuda de un pistilo azul de polipropileno.
5. Para la extracción de ARN total se agrega 200 μ l de Trizol para plantas (Invitrogen) y se continúa disolviendo el tejido pulverizado hasta formar una pasta líquida.
6. Agregar un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se da vórtex por 30 s.
7. Luego se centrifuga a 10,000 rpm por 10 min a 4°C. Tomar con cuidado la fase acuosa superior incolora (aprox 100-150 μ l) y pasarla a un microtubo estéril de 1.5 ml (si se observa de color verde, es necesario repetir los pasos 6 y 7).
8. Posteriormente se precipita el ARN total con un volumen igual de isopropanol/etanol al 70% (1:1) y mezclar suavemente por inversión para luego dejar precipitando a -30 por 1 hora.
9. Centrifugar a 13,000 rpm por 15 min a 4°C, el sobrenadante se descarta y se agregan 200 μ l de etanol al 70%.
10. Centrifugar a 13,000 rpm por 2 min a temperatura ambiente y se deja secando la pastilla.
11. Resuspender la pastilla de ARN en agua ultrapura estéril.
12. Para corroborar su integridad, el RNA total se separa en un gel de agarosa al 1% (MOPS 1X, formaldehído) con un amortiguador de corrida MOPS 1X (MOPS 0.2 M (pH 7), acetato de sodio 20 mM y EDTA 10 mM (pH 8)) a 100 V, durante 25 min. Visualizar el gel de ARN en un transiluminador.

13. Para remover el ADN genómico se aplica un tratamiento con DNAsa I (thermo-fisher scientific) de acuerdo a las especificaciones del proveedor.
14. Para realizar una reacción de RT-PCR y generar el cDNA total, se utiliza la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (ThermoScientific), de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

ANEXO 9. LA PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES DE *E. coli* TOP10

1. Estriar una alícuota de células TOP10 en medio sólido LB sin antibióticos e incubar a 37° C por toda la noche.
2. Inocular una colonia sencilla del cultivo en placa en un tubo cónico de 15 ml, conteniendo 5 ml de medio SB (70 g/L Bactotryptona, 40 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl); el cultivo se crece durante el día a 37°C a 200 rpm.
3. En un matraz con 500 ml de medio SOB (20 g/L Bactotryptona, 5 g/L Extracto de levadura, 0.58 g/L NaCl, 0.19 g/L KCl, después de su esterilización se agrega 2.5 ml de 2M de MgCl₂), se inocula el cultivo a una OD₆₀₀ de 0.0002 y se incuba a 25°C a 200 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.3.
4. Alcanzada la OD deseada, el cultivo se vacía en botellas para centrífuga estériles y frías (250 ml en cada botella) y se centrifugan a 3,000 g a 4°C, durante 10 min en un rotor JA-10 en una centrifuga Avanti J30-I (Beckman Coulter).
5. Eliminar el sobrenadante rápidamente y agregar 30 ml de la solución CCMB80 (10 mM KAc, 80 mM CaCl₂, 20 mM MnCl₂, 10 mM MgCl₂, 40% glicerol con el pH ajustado a 7.0 con HCl) fría y estéril.
6. Resuspender las células por agitación suave y agregar 50 ml de solución CCMB80 a cada botella e incubar en hielo por 20 min.
7. Centrifugar las células a 3,000 g a 4°C durante 10 min empleando el mismo rotor y centrifuga.
8. Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 4 ml de medio CCMB80 para posteriormente hacer alícuotas de 50 µl en tubos estériles de 1.5 ml previamente fríos.
9. Congelar inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenar a -80°C para su posterior uso.

ANEXO 10. LA TRANSFORMACIÓN DE LAS CÉLULAS QUIMIOMPETENTES *E. coli* TOP10 POR CHOQUE TÉRMICO

1. Las células competentes almacenadas en microtubos a -80°C , se descongelan en hielo.
2. Agregar un volumen de 1-3 μl (100-300 μg) de una extracción de plásmido.
3. Dar choque térmico a 42°C por 1 min, e inmediatamente pasar el microtubo a hielo por 2 min.
4. Agregar 0.5 ml de medio LB y dejar incubando por 1 hora a 300 rpm, a una temperatura de 37°C .
5. Plaquear de 10-200 μl de células transformadas en cajas de medio LB sólido, suplementadas con antibiótico de acuerdo con el plásmido seleccionado.
6. Dejar incubando las cajas por 24 horas a 37°C . Finalmente seleccionar colonias para su posterior extracción de ADN plasmídico.

ANEXO 11. LA EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO POR LISIS ALCALINA (MINIPREP)

1. Para la extracción del DNA plasmídico, en 5 ml de medio LB líquido suplementado con el antibiótico de selección, se inoculan las colonias, y se incuban a 37°C por 18h, a 250 r.p.m.
2. Tomar 1.5 ml de los cultivos crecidos en microtubos de 1.5 ml y centrifugar a 13,000 r.p.m, a temperatura ambiente, descartar el sobrenadante; con una pipeta se remueve el resto del mismo, de manera que la pastilla de bacterias quede lo más seca posible.
3. A continuación, la pastilla de células se resuspende en 200 µl de la Solución I esterilizada (Tris-HCl, 25mM, pH 8.0; EDTA, 50 mM; estéril).
4. Luego se agregan 200 µl de la Solución II recién preparada (NaOH, 0.2 M; SDS, 1%) y se mezcla de 5 a 6 veces suavemente por inversión.
5. Agregar 200 µl de la Solución III fría (acetato de potasio, 5M, pH 4.8; ácido acético, 11.5% v/v), e incubar en hielo por 15 min, para después centrifugar a 4°C, 10 min a 13,000 r.p.m.
6. Transferir el sobrenadante a un microtubo de 1.5 ml nuevo y agregar 1 µl de RNAsa (20 mg/ml). Los tubos se incuban a 37°C de 15-20 min.
7. Después, agregar 400 µl de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y mezclar con ayuda de un vórtex. Centrifugar los microtubos a temperatura ambiente por 5 min a 13,000 r.p.m.
8. Con la ayuda de una pipeta transferir la fase superior acuosa a un microtubo de 1.5 ml nuevo y agregar 400 µl de la mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), mezclar con vórtex. Centrifugar los microtubos a temperatura ambiente por 5 min a 13,000 r.p.m.
9. Tomar la fase superior acuosa y transferir a un microtubo nuevo de 1.5 ml; añadir 900 µl de etanol absoluto frío y mezclar con un vórtex por 1-2 min; inmediatamente después, los microtubos se ponen en hielo y se incuban por 15-60 min.
10. Centrifugar los microtubos a 13,000 rpm por 15 min, a 4°C. Descartar el sobrenadante y lavar la pastilla con 500 µl de etanol al 70%.
11. Por último, los tubos se centrifugan brevemente y el sobrenadante se remueve cuidadosamente con una pipeta. Resuspender la pastilla de DNA plasmídico en 15-20 µl de agua ultrapura estéril.

ANEXO 12. EL PROTOCOLO TAQ POLIMERASA “PHUSION NEB” (Biolabs, New England, USA)

Componente	10 μl reacción	20 μl reacción	50 μl reacción	Concentración final
5X Phusion HF	2 μ l	4 μ l	10 μ l	1X
10 mM dNTPs	0.2 μ l	0.4 μ l	1 μ l	200 μ M
10 μ M Forward Primer	0.5 μ l	1 μ l	2.5 μ l	0.5 μ M
10 μ M Reverse Primer	0.5 μ l	1 μ l	2.5 μ l	0.5 μ M
Molde de ADN	variable	variable	variable	< 250 ng
DMSO (opcional)	(0.3 μ l)	(0.6 μ l)	(1.5 μ l)	3%
Polimerasa	0.1 μ l	0.2 μ l	0.5 μ l	1.0 unidades/50 μ l PCR
Agua ultrapura estéril (libre de nucleasas)	hasta 10 μ l	hasta 20 μ l	hasta 50 μ l	

ANEXO 13. LA REACCIÓN BP:

- Producto PCR (3.75- 37.5 ng/ μ l) 1 μ l
- pDONR (150 ng/ μ l) 0.25 μ l
- Amortiguador 1X TE, pH 8.0 0.25 μ l
- BP clonasa 0.5 μ l
- Incubación 24 horas a temperatura ambiente
- Proteinasa K (parar la reacción) 0.25 μ l, 10 min a 37°C

ANEXO 14. LA EXTRACCION DEL ADN GENOMICO DE MUSGO.

Solución de extracción:

- 1 M Tris-HCl, pH 8.0
- 1 M NaCl₂
- 2 % CTAB
- 20 mM EDTA-Na₂
- 2 % PVP-40
- Esterilizar por autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.
- Inmediatamente antes de usar agregar: 7 µl β-mercaptoetanol y 10 mg ácido ascórbico en 10 ml de la solución de extracción. Precalentar a 65°C.

Pasos 1 a 3 realizar en campana de flujo laminar.

1. Tomar ¼ de tejido de musgo subcultivado de una semana con una cucharilla de metal estéril.
2. Para quitar el exceso de agua al tejido de musgo, colocar el tejido del musgo sobre dos capas de toallas absorbentes Kimwipes y luego sobre el tejido colocar otras dos capas más de toallas para formar una especie de sándwich, con la misma cucharilla se aplasta el tejido hasta dejarlo lo más seco posible.
3. Una vez hecho esto, el tejido seco se pasa a un microtubo estéril de 1.5 ml y se congela inmediatamente en nitrógeno líquido.
4. El tejido congelado se pulveriza manualmente con la ayuda de un micropistilo de polipropileno.
5. Agregar 100-200 µl de la solución de extracción precalentado y homogenizar con la ayuda de un micropistilo hasta obtener una mezcla líquida homogénea. Agregar 1 µl de RNasa A (10mg/ml) e incubar a 65°C por 5 minutos.
6. Agregar un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y mezclar suavemente.
7. Separar las fases por centrifugación máxima por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Transferir el sobrenadante (incolore) a un microtubo nuevo y estéril y agregar un volumen igual de Isopropanol.
9. Mezclar por vórtex y precipitar el ADN mínimo 20 minutos a 4°C.
10. Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

11. Decantar el sobrenadante y lavar la pastilla con 70 % etanol. Dejar secar la pastilla y Disolver en 15-20 μ l de amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 Mm edta-Na₂).

ANEXO 15. LA PRECIPITACION CON ETANOL DE LOS FRAGMENTOS DEL PLASMIDO DIGERIDO

1. Añadir 30 μ l de acetate de sodio (Na-Acetate) pH 5.2
2. Agregar 800 μ l de etanol 100%
3. Incubar a -20°C por al menos 30 minutos
4. Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad a 4°C. Decantar el sobrenadante
5. Agregar 500 μ l de etanol al 70% y centrifugar 2 minutos a máxima velocidad a temperatura ambiente
6. Decantar el sobrenadante y dejar secar la pastilla de ADN en campana de flujo laminar
7. Resuspender en 50 μ l de agua ultrapura estéril
8. Incubar a 37°C por 10 minutos y resuspender de nuevo para mezclar bien la pastilla de ADN

(esto es suficiente para dos transformaciones).

ANEXO 16. EL MÉTODO PARA LA MUTAGENESIS DIRIGIDA

Se empleó esta técnica molecular para sintetizar *de novo* el plásmido pDONR-P1P4-brazo 5' con los oligonucleótidos que conllevan la mutación puntual

“Master mix 1X” para la taq polimerasa II de alta fidelidad Q5 (NEB):

- Amortiguador Q5 5 μ l
- dNTP's 10 mM 1 μ l
- Primer 1 (10 μ M) 1.25 μ l
- Primer 2 (10 μ M) 1.25 μ l
- Plásmido (1:10) 1 μ l
- Q5 enzima 0.25 μ l
- H2O hasta 25 μ l

Condiciones de PCR:

- 95°C 30s
 - 95°C 10s
 - 55°C 30s
 - 72°C 2:30 min (depende del tamaño del plásmido)
 - 72°C 1 min
 - 10°C ∞
- } 18 ciclos

Después, la reacción de PCR se digiere con la enzima *DpnI* (NEB), esta enzima reconoce y corta secuencias de ADN metiladas, por lo tanto, nos aseguramos de que en la reacción solo quede el plásmido recién sintetizado con la mutación (ADN no metilado).

- Reacción de PCR 20-25 μ l
- Amortiguador Cutsmart NEB 2 μ l
- *DpnI* 2 μ l

Mezclar y centrifugar 1 minuto. Incubar 37°C por 2 h.

El producto de la reacción de digestión se transforma en células quimio competentes de *E. coli* TOP10.

ANEXO 17. LOS MAPAS DE PLASMIDOS

