



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Contribución de la vía de metilación de RNAs mensajeros durante el desarrollo de *Physcomitrella patens*

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Biol. David Garcias Morales

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. José Luis Reyes Taboada
Instituto de biotecnología, UNAM

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Svetlana Shishkova
Instituto de biotecnología, UNAM

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega
Instituto de biotecnología, UNAM

Cuernavaca Morelos., Octubre, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Reconocimientos

Al posgrado de maestría y doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México

A los apoyos recibidos por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de becario 620269. Al financiamiento recibido para el desarrollo de este trabajo dentro del proyecto CONACyT FC-2015-184 to JLR.

A los apoyos recibidos por el Programa de Apoyo para Estudios del Posgrado (PAEP) para asistencia y congresos.

A los miembros del comité tutorial por ser parte fundamental en el desarrollo del proyecto:

Al **Dr. José Luis Reyes** Taboada por darme la oportunidad de conducir junto con él en el desarrollo de este proyecto.

Al **Dr. Mario Enrique Zurita Ortega** y a la Dra. **Svetlana Shishkova**, por formar parte del comité que apoyó, asesoró y evaluó este proyecto durante su desarrollo.

Finalmente a todos los miembros del consorcio Covarrubias-Reyes por sus comentarios y apoyo para realizar este proyecto.

Dedicatorias

A mi madre **María Benedicta Morales Morales** y a mi padre **Julio César Garcias García**, por sembrar la semilla con la que comenzó mi historia, por su apoyo incondicional durante esta etapa de mi vida y por el amor que demuestran durante los pocos minutos de nuestras videollamadas semanales.

A mis diez hermanos **Francisco, Angélica, Fabiola, Candelaria, César, Mariela, Eduardo, Julio, Gustavo y Josefina**, porque cada uno representa un pilar importante en vida, porque me han enseñado cual es la forma de enfrentar nuestra vida, por nunca rendirse, por seguir sus sueños e inspirar los míos.

A mis **sobrinos** por las enseñanzas de cada día. No importa que edad tenga, ustedes siempre me han demostrado que hay que divertirse y no tener miedo a crecer.

A mis compañeros de maestría en especial a **Paulina, Irene, Yared y Lety**, por darme su amistad cuando más lo necesitaba, por los momentos inolvidables que pasamos juntos durante esta nueva etapa de nuestra vida, porque aunque en muchas ocasiones fue difícil en ustedes siempre encontraba un lugar para sentirme mejor y si tuviera que describir un sentimiento sería confianza.

A mi compañera de fines de semana **Ingrid**, que más que compañera siempre será mi amiga, gracias por todo tu apoyo, tu paciencia y por mantener mi barriga llena.

A mi tutor el **Dr. José Luis Reyes Taboada**, por motivarme a siempre creer en mí y por siempre (casi siempre) discutir conmigo todas mis ideas; gracias por ayudarme a ponerlas sobre la tierra. Porque eres y serás siempre el mejor asesor que he tenido, si algún día me convierto en solo la mitad de analítico, la mitad de asesor, la mitad de persona que eres, seguramente será uno de mis mayores logros.

Y finalmente a todas esas personas que se han tomado el tiempo de enseñarme poco a poco a mirar con diferentes ojos qué es la vida y a descubrirme siempre un poquito más. Los nombres de todas esas personas, porque son muchísimas, están escritos entre líneas, en los espacios que existen entre las letras que conforman cada una de estas palabras, porque ¿qué seríamos, si no menos, sin la experiencia de haber conocido a tantas personas fantásticas?

La materia y la energía se agotaron y con ellas el espacio y el tiempo. Hasta AC existía solamente para la última pregunta que nunca había sido respondida desde la época en que dos técnicos en computación medio alcoholizados, tres trillones de años antes, formularon la pregunta en la computadora que era para AC mucho menos de lo que para un hombre el Hombre.

Todas las preguntas habían sido contestadas, y hasta que esa última pregunta fuera respondida también, AC no podría liberar su conciencia.

Todos los datos recogidos habían llegado al fin. No quedaba nada para recoger.

Pero toda la información reunida todavía tenía que ser completamente correlacionada y unida con todas sus posibles relaciones.

Se dedicó un intervalo sin tiempo a hacer esto.

Y sucedió que AC aprendió como revertir la dirección de la entropía.

Pero no había ningún Hombre a quien AC pudiera dar una respuesta a la última pregunta. No había materia. La respuesta –por demostración– se ocuparía de eso también.

Durante otro intervalo sin tiempo, AC pensó en la mejor forma de hacerlo.

Cuidadosamente, AC organizó el programa.

La conciencia de AC abarcó todo lo que alguna vez había sido un Universo y pensó en lo que en ese momento era el caos.

Paso a paso, había que hacerlo.

Y AC dijo:

<< ¡HAGASE LA LUZ! >>

Y la luz se hizo...

La última palabra
Isaac Asimov

Abreviaturas

3'UTR Región 3' no traducida

5'UTR Región 5' no traducida

5mC 5-metilcitosina

ADN Ácido desoxirribonucleico

ADNg Acido desoxirribonucleico genómico

ALKBH5 Del inglés: *α-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 5*

ARN Ácido ribonucleico

ARNm Ácido ribonucleico mensajero

ARNr Ácido ribonucleico ribosomal

ARNt Ácido ribonucleico de transferencia

cDNA Acido desoxirribonucleico complementario

FIG Figura

iCLIP Del inglés: *Individual-nucleotide resolution UV crosslinking and immunoprecipitation*

kDa Kilodaltons

m⁶A N6-metiladenosina

MeRIP-Seq Inmunoprecipitación de ARN metilado seguido de secuenciación masiva

nt Nucleótido

pb Pares de bases

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RT-PCR Transcriptasa reversa seguido de reacción en cadena de la polimerasa

SAM Del inglés: *shoot apical meristem*

WTAP Del inglés: *Wilm's tumor-associated protein*

RESUMEN

El desarrollo de las planta es producto de las interacciones entre la expresión génica y las señales ambientales. A la fecha, hay evidencia de que todos los ARN celulares presentan una serie de modificaciones post-transcripcionales, que son mecanismos importantes para aumentar su diversidad estructural y funcional. Descubierta en la década de 1970, la N6-metiladenosina (m⁶A) es la modificación interna más abundante en los ARNm poliadenilados y los ARN largos no codificantes. Esta modificación participa en múltiples aspectos de la regulación del desarrollo, el ciclo celular y la determinación del destino celular al afectar varios aspectos del metabolismo del ARN, como el splicing, la traducción, la estabilidad del transcrito y su transporte. El paisaje de sitios de m⁶A sobre el transcriptoma es dinámicamente regulado por una compleja interacción entre varias familias de proteínas ‘writers’, ‘readers’ y ‘erasers’, las cuales adicionan, interpretan y remueven respectivamente la marca m⁶A. La inactivación de la metiltransferasa METTL3 en *Arabidopsis thaliana* impide que la progresión del embrión en desarrollo para pasar de la etapa globular, observándose un fenotipo de letalidad embrionaria con arresto en la semilla. Para observar más claramente el papel de esta modificación en el desarrollo *in planta* y para evitar un posible fenotipo de letalidad, decidimos con el musgo *Physcomitrella patens*. Con este fin, generamos líneas mutantes mediante la tecnología de edición génica CRISPR / Cas9 para obtener líneas mutantes sencillas y múltiples de los genes correspondientes al complejo de metilación. En este trabajo, reportamos la presencia de METTL3, METTL14 y WTAP en el musgo *P. patens* y además comprobamos la participación de PpMETTL3 y PpWTAP en la formación de m⁶A. También encontramos que de manera relevante las mutaciones en diferentes proteínas del complejo de metiltransferasa afectan la transición de las plantas de pasar de una forma de división bidimensional a una tridimensional, observándose un retraso en el desarrollo de los brotes axiales. De igual manera también se observaron afectaciones en el desarrollo del esporofito y en la forma de las esporas. En conjunto nuestros resultados indican que la modificación m⁶A es importante para facilitar transiciones de desarrollo que implican un recambio masivo del transcriptoma.

SUMMARY

Plant development occurs in the context of perception and response to changes in the environment and is a product of interactions between gene expression and external cues. To date, there is evidence that all cellular RNAs present a series of post-transcriptional modifications, which are important mechanisms to increase their structural and functional diversity. Discovered in the 1970s, N6-methyladenosine (m⁶A) is the most prevalent internal modification in poly-adenylated mRNAs and long non-coding RNAs in higher eukaryotes. This modification participates in multiple aspects of developmental regulation, cell cycle and fate determination by affecting aspects of RNA metabolism such as pre-mRNA processing, translation efficiency, transcript stability and miRNA biogenesis. Three distinct classes of protein factors are involved in the function of this modification: 'writers' (adenosine methyl-transferases), 'erasers' (m⁶A-demethylating enzymes) and 'readers' (m⁶A-binding proteins). Inactivation of the METTL3 methyltransferase in *Arabidopsis thaliana* prevents the progression of the developing embryo from passing the globular stage, an embryo-lethal phenotype with seed arrestment. To observe more clearly the role of this modification in the development of the plant, and to avoid a potential phenotype of lethality, we are working with a different plant model, the moss *Physcomitrella patens*. To this end, we generated mutant lines by CRISPR/Cas9 gene editing to obtain single and multiple mutant lines of the genes corresponding to the methylation complex. In this work, we report the presence of METTL3, METTL14 and WTAP in the moss *P. patens* and we verified the participation of PpMETTL3 and PpWTAP in the formation of m⁶A, since in the null mutants Ppmettl3 and Ppwatap had reduced signal of m⁶A in mRNA. We also found that Ppmettl3 and Ppwatap two different proteins of the methyltransferase complex affect the transition of the plants from a two-dimensional division to a three-dimensional division, observing a delay in the development of axial shoots. Similarly, we observed defects in the development of the sporophyte and in the shape of the spores. Overall, our results indicate that the m⁶A modification is important to facilitate developmental transitions that involve a massive transcriptome turnover.

INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
1.2 COMPONENTES PRINCIPALES DE LA VÍA DE METILACIÓN m⁶A	4
1.2.1 El complejo multiprotéico que cataliza la formación de N6-metiladenosina	6
1.2.2 Efecto de la transcripción en la catálisis de la metilación.....	13
1.2.3 Enzimas responsables del proceso de desmetilación	14
1.2.4 Las proteínas de unión a m ⁶ A y el efecto de la modificación m ⁶ A en el metabolismo del ARNm.....	16
1.3 EFECTOS FENOTÍPICOS ASOCIADOS CON LA ALTERACIÓN DE N6-METILADENOSINA (m⁶A) EN ARNm Y SUS FACTORES DE REGULACIÓN EN EUKARIOTAS MULTICELULARES.	22
1.3.1 Insectos	22
1.3.2 Peces.....	23
1.3.3 Ratones.....	23
1.3.4 Humanos	24
1.3.5 Plantas	24
1.4 ORIGEN DE LAS PLANTAS TERRESTRES Y <i>PHYSCOMITRELLA PATENS</i> COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO DE LAS PLANTAS.	28
1.4.1 <i>Physcomitrella patens</i> como un organismo modelo para el estudio del desarrollo de plantas.....	29
HIPOTESIS	32
OBJETIVOS	32
General.....	32
Particulares.....	32
MATERIALES Y METODOS	33
Material vegetal y condiciones de crecimiento	33
Aislamiento de protoplastos	33
Análisis del crecimiento del protonema y formación de los brotes de gametóforos.....	34
Inducción de estructuras reproductivas, producción de esporangios y análisis de las esporas.....	35
Extracción de ADN genómico.....	36
PCR a partir de ADN genómico para la confirmación de las mutantes.....	36
Búsqueda en bases de datos y servidores de análisis.....	36
Extracción de RNA.	37
Síntesis de ADN complementario (ADNc)	37

Análisis de <i>dot blot</i> de N6-metiladenosinas.....	39
RESULTADOS	41
Expresión diferencial de los genes que codifican a las proteínas principales del complejo de metiltransferasa	41
Análisis de las mutantes.....	42
Análisis del desarrollo y crecimiento del protonema en los diferentes genotipos.....	47
Análisis del crecimiento y desarrollo de los brotes y filidios	49
Análisis del desarrollo del esporofito y esporas.....	55
DISCUSIÓN	60
Sobre la conservación de la función del complejo de metilación.....	60
La importancia del patrón de expresión de genes que codifican el complejo de metilación.....	61
La importancia de un crecimiento en tres dimensiones y la participación de la metilación de ARNm en este proceso.	62
La importancia de la alternancia de generaciones y la participación de la metilación de ARN en este proceso.....	63
La importancia de la metilación m ⁶ A en las transiciones de desarrollo de los organismos multicelulares.....	65
CONCLUSIONES	67
PERSPECTIVAS	68
REFERENCIAS	69

1. INTRODUCCION

Los estudios a nivel genético, genómico y bioquímico en una variedad de organismos proponen que se emplean estrategias similares basadas en la regulación de la actividad de la cromatina tanto en plantas como en animales para controlar de manera oportuna y precisa la expresión génica durante el desarrollo. En las plantas, el desarrollo y el crecimiento son procesos continuos que ocurren no solamente durante embriogénesis, sino también después de la formación del embrión. Dos poblaciones primarias de células pluripotenciales con alta tasa de división que se establecen durante la embriogénesis, el meristemo apical de la raíz y el meristemo apical del brote, generan los diferentes órganos a lo largo de la vida de una planta. Debido a la ausencia de migración celular, por la presencia de una pared celular rígida, la formación de los órganos resulta principalmente de la precisa coordinación y orientación de los planos de la división celular, expansión y diferenciación (Grimanelli y Roudier 2013).

Las plantas se caracterizan por una notable plasticidad fenotípica que satisface las limitaciones de un estilo de vida sésil. Éstas han desarrollado estrategias para percibir los cambios ambientales, integrarlos con señales endógenas y en consecuencia ajustar los procesos del desarrollo. De hecho, durante su ciclo de vida, las plantas experimentan transiciones de desarrollo importantes, muchas de las cuales están determinadas por el medio ambiente. Dichos estímulos ambientales impactan en el control de la expresión génica, orquestando patrones de expresión específicos para la condición ambiental dada (Pikaard y Mittelsten Scheid 2014).

De acuerdo al dogma central de la biología molecular la información génica fluye de ADN a ARN y de éste a proteínas. Está bien establecido que el ADN y las proteínas experimentan modificaciones químicas dinámicas que influyen ampliamente en la regulación de la expresión génica. Por ejemplo, la metilación en la posición 5 de residuos de citosina en el ADN para formar 5-metilcitosina (5mC) puede tener efectos negativos sobre la expresión génica mediante el reclutamiento de proteínas específicas de unión al ADN metilado (Lewis *et al.* 1992). Del mismo modo, la fosforilación de las proteínas - un evento químico reversible que inicialmente se pensaba que estaba restringido a sólo unas pocas proteínas - está involucrado

en casi todos los aspectos de la fisiología celular (Pawson y Scott 2005). Sin embargo, hasta hace algunos años, no se había demostrado que las modificaciones presentes en el ARNm pudieran alterar su metabolismo.

El ARNm de todos los organismos vivos puede ser modificado después de la transcripción mediante más de 100 modificaciones químicas distintas (Machnicka *et al.* 2013). Dentro de estas modificaciones las más frecuentes son: 5-metilcitosina (m^5C), N1-metiladenosina (m^1A) Pseudouridina (Ψ), 2' O metilación ($2'OMe$) y N6-metiladenosina (m^6A). De estas modificaciones, la m^6A ha sido identificada como la modificación interna más abundante en el ARNm eucariote desde su descubrimiento en los años setenta (Desrosiers *et al.* 1974). En los primeros experimentos, el marcaje radioactivo de sitios de metilación en los ARNm reveló que además del 5' cap existen regiones internas en el ARN que corresponden principalmente a la modificación m^6A , y en menor medida m^5C . (Mer *et al.* 1976). La modificación interna m^6A en el ARNm se conserva ampliamente entre los diferentes organismos, encontrándose presente en plantas (Nichols 1979) y vertebrados (Horowitz *et al.* 1984). También se encuentra presente en el ARN de virus (Beemon y Keith 1977), así como en organismos unicelulares tales como arqueas (Kowalak *et al.* 1994), bacterias (Deng *et al.* 2015) y levaduras (Bodi *et al.* 2010).

Se estima que la cantidad de sitios de metilación m^6A en ARNm aislado de mamífero constituye del 0.1-0.4% de todos los nucleótidos de adenina, de 0.7-0.9% en *Saccharomyces cerevisiae* en estado meiótico, y de 1-15 sitios por molécula de ARN en diversos virus (Zhao *et al.* 2017a). Los estudios de mutaciones y enzimáticos *in vitro* han identificado una secuencia de modificación consenso en el ARNm con el motivo RRACH (donde R= purina, H= A, C ó U y A es la base que se metila) (Narayan y Rottman 1988, Narayan *et al.* 1994). Sin embargo, debido a la baja abundancia de m^6A en un ARNm y la falta de técnicas eficaces para su detección, las caracterizaciones funcionales de la modificación m^6A estuvieron en gran medida ausentes en las últimas décadas.

El interés en la modificación m^6A resurgió en el 2011 a través de un estudio que reportó, por primera vez, que esta modificación podía sufrir una reacción de desmetilación (Jia *et al.* 2011).

Este estudio propuso que FTO, una enzima previamente asociada con la obesidad humana, es capaz de catalizar la desmetilación de m⁶A. Este hallazgo sugiere por primera vez la posibilidad de que el metabolismo del ARN podría verse alterado por la dinámica de adición y sustracción de la metilación m⁶A.

De manera casi paralela y pero de manera independiente, dos grupos de investigación reportaron MeRIP-Seq, un método de secuenciación de la siguiente generación para identificar mediante el uso de un anticuerpo la modificación m⁶A a nivel de transcriptoma (Meyer *et al.* 2012, Dominissini *et al.* 2012). Estos enfoques de mapeo revelaron que m⁶A es inequívocamente una modificación presente en el ARNm, y sorprendentemente demostraron que esta modificación parece ser selectiva: sólo determinados ARNm y en cierta condición contienen esta modificación. Así mismo a través de esta metodología se observó el patrón topológico de m⁶A, encontrándose de manera preferencial cerca de los codones de paro y en las regiones 3' no traducidas (3'-UTRs). De manera relevante se encontró que los niveles de m⁶A parecen ser dinámicos, ya que estos variaban entre los diferentes tejidos en los que se analizó. Estos estudios sugieren fuertemente que m⁶A es capaz de afectar el metabolismo del ARNm y en consecuencia regular la actividad celular.

Los dos estudios de mapeo de m⁶A y el estudio de la desmetilación activa por FTO se publicaron con sólo unos meses de diferencia. Hasta ese momento, m⁶A había sido casi olvidada como un componente más del ARNm, sin embargo, la aparición de estos estudios destacó la idea de que el metabolismo del ARNm podría ser regulado por las modificaciones que en él ocurren. A partir de ese momento se acuñó el término *epitranscriptoma* (Meyer *et al.* 2012) para referirse a estas modificaciones postranscripcionales previamente identificadas en el ARN, como m⁶A, y para distinguirlas de nucleótidos como la inosina que se forman a través de la edición del ARN. Desde estos estudios, se ha avanzado rápidamente en la caracterización de otras modificaciones presentes en el ARN, y ahora está claro que, además de la información codificada por la secuencia de nucleótidos en ARNm, también hay información reguladora contenida en el código epitranscriptómico.

1.2 COMPONENTES PRINCIPALES DE LA VÍA DE METILACIÓN m⁶A

Los efectos que m⁶A tiene sobre el metabolismo del ARN son determinados por una compleja interacción entre las actividades de varias familias de proteínas ('writers', 'readers' y 'erasers'), las cuales adicionan, interpretan y remueven, respectivamente, esta modificación (Fig. 1). El complejo multiprotéico que cataliza la adición del grupo metilo se describió antes del reciente resurgimiento de m⁶A, en gran medida debido a las aportaciones de Bokar, Rottman y colaboradores, quienes clonaron el gen que codifica a la metiltransferasa-3 (METTL3) de humanos en 1994 (Bokar *et al.* 1994), y el trabajo de dos grupos de investigación quienes identificaron la proteína WTAP (del inglés: *Wilm's tumor-associated protein*) la cual se demostró que interactúa con METTL3 formando un complejo que es indispensable para catalizar la adición de m⁶A (Zhong *et al.* 2008, Agarwala *et al.* 2012).

Publicaciones más recientes han añadido un nivel de complejidad mayor a nuestra comprensión del proceso de metilación de ARNm. Un estudio propuso una segunda metiltransferasa de m⁶A, METTL14 (Liu *et al.* 2014). En otro estudio más se identificó a la proteína ALKBH5 (del inglés: *α-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 5*) como una proteína que cataliza la eliminación del grupo metilo de m⁶A en el ARNm, lo que indica la presencia de dos proteínas *erasers* de m⁶A, es decir, FTO y ALKBH5, en humanos (Zheng *et al.* 2013).

La identificación de metiltransferasas y desmetilasas remarca, como ya se mencionó, que la modificación m⁶A es dinámica, lo cual asemeja a la metilación epigenética en el ADN y las modificaciones en las histonas, hecho que sugiere que al igual que el reconocimiento de m⁵C en el ADN por proteínas de unión específicas, la modificación m⁶A también podría ser específicamente reconocida por proteínas de unión a m⁶A y ejercer diversos efectos en el metabolismo del ARN. Bajo esta línea de pensamiento se realizó una cromatografía de afinidad utilizando una fase estacionaria unida covalentemente a ARN metilado en la posición

N6, seguida por espectrometría de masas, de esta forma se identificaron varias proteínas con el potencial de unirse a m⁶A en células de mamíferos (Dominissini *et al.* 2012).

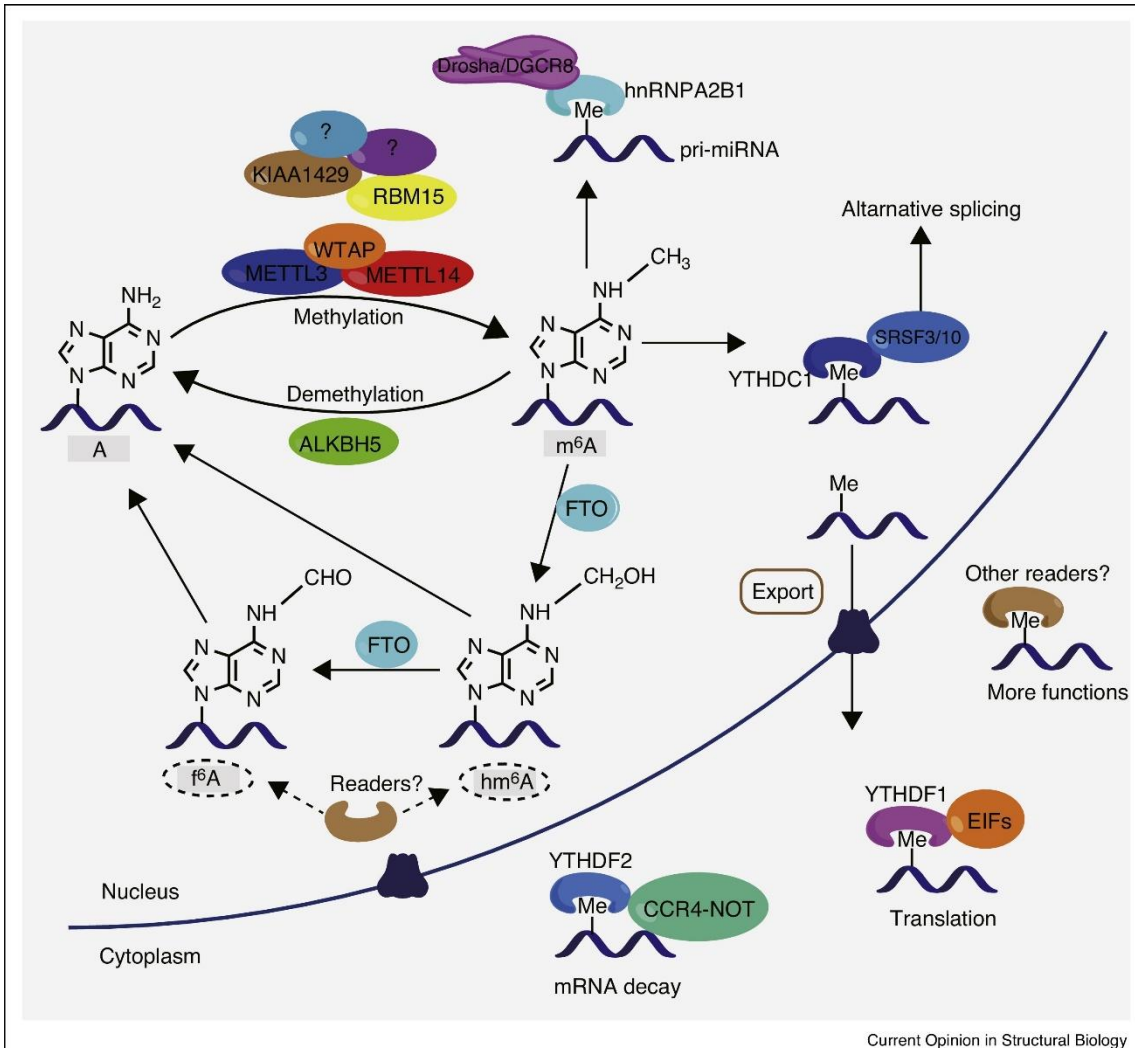


Figura 1. Readers, writers y erasers de la modificación N6-metiladenosina en ARN nucleares. Las metiltransferasas de m⁶A y las desmetilasas controlan dinámicamente el paisaje de metilación de m⁶A dentro del núcleo. Las proteínas de unión a m⁶A se unen preferentemente al ARN metilado y median funciones específicas. En el núcleo, m⁶A puede afectar el *splicing* alternativo del pre-ARNm y el almacenamiento y exportación del ARNm maduro. Después de que los ARN maduros se exportan al citoplasma, la proteína citoplasmática de unión a m⁶A YTHDF2 se puede unir a los ARNm que contienen m⁶A para mediar la degradación de estos ARNm. Otras proteínas de unión citoplasmáticas modulan la traducción y la localización del ARNm. Tomado y modificado de Wu *et al.*, 2017.

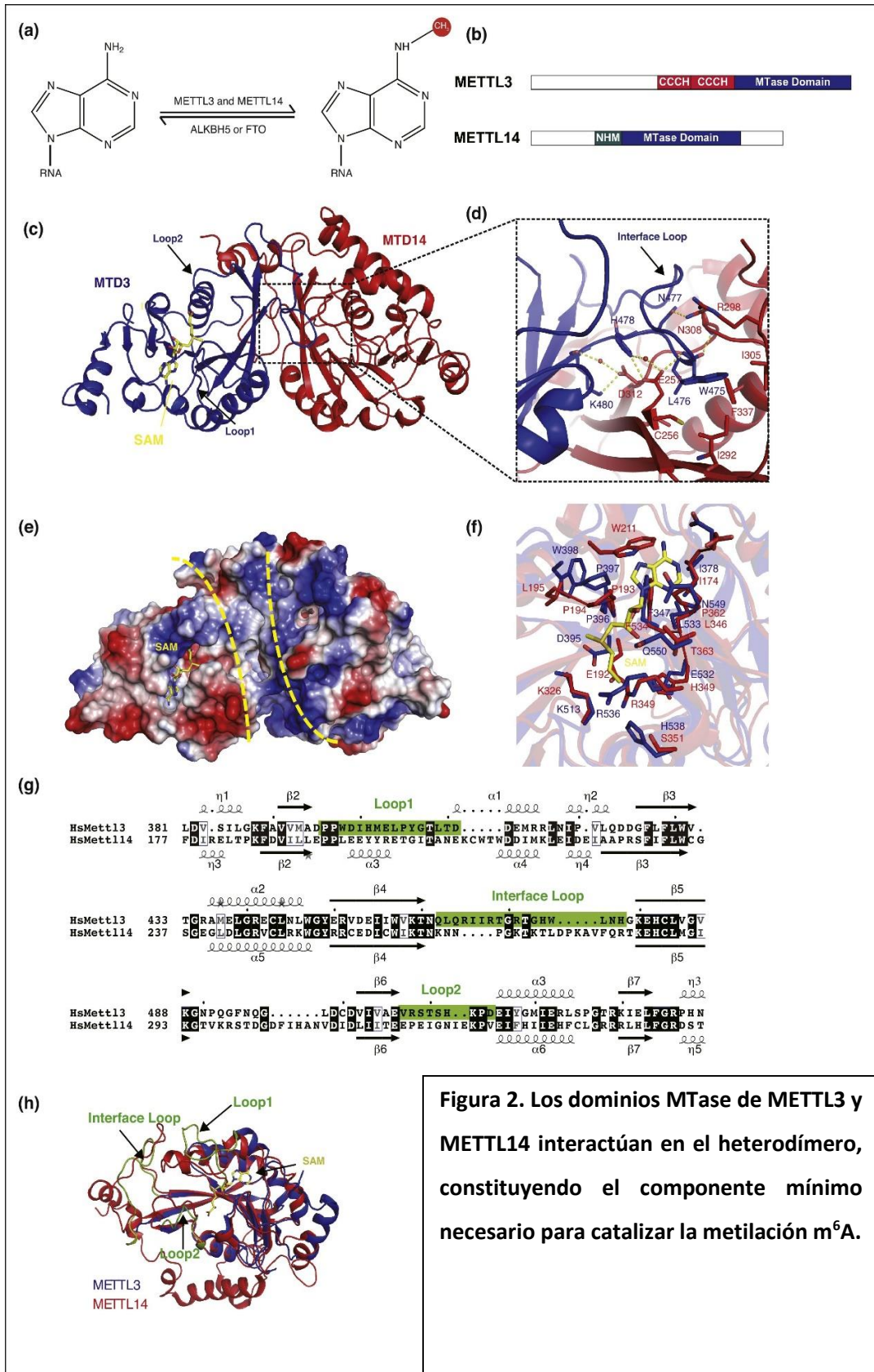
Derivado de este experimento de *pull-down*, dos proteínas citoplasmáticas YTHDF2 y YTHDF3 de humano pertenecientes a la familia con dominio YTH (*YTH521-B Homology*) fueron validadas en extractos de células de mamíferos como proteínas de unión a m⁶A (Dominissini *et al.* 2012, Wang *et al.* 2014). Las proteínas de la familia del dominio YTH están ampliamente expresadas en eucariotas y se ha demostrado que son capaces de unirse a ARN de cadena sencilla por medio del dominio YTH, el cual está altamente conservado (Zhang *et al.* 2010). El descubrimiento de estas proteínas abre la posibilidad de interpretar la modificación m⁶A como un nuevo nivel de regulación post-transcripcional proponiendo que el reconocimiento de m⁶A mediado por estas proteínas pudiera aumentar la diversidad funcional de los ARNm. A continuación se describirán con más detalle cada uno de los principales componentes protéicos involucrados con la formación, función y dinámica de N6-metiladenosina.

1.2.1 El complejo multiprotéico que cataliza la formación de N6-metiladenosina

A la fecha se sabe que la adición del grupo metilo es catalizada por un complejo multiprotéico constituido por METTL3, METTL14 y WTAP. El factor catalítico de este complejo está formado por METTL3 y METTL14 las cuales forman un heterodímero donde METTL3 cataliza la transferencia del grupo metilo desde la S-adenosil metionina a la posición N6 de la adenina. Recientemente se describió como un primer ejemplo la participación de tres proteínas adicionales RBM15 y RBM15B (Patil *et al.* 2016) y KIAA1429 (Schwartz *et al.* 2014). RBM15 reconoce secuencias consenso en el ARN no-codificante *Xist* (responsable del silenciamiento del cromosoma X en mamíferos) con el motivo RRACH donde posteriormente interactúa con WTAP que sirve de andamiaje entre el ARN y el centro catalítico. Por otro lado KIAA1429 se encarga de reconocer este mismo motivo, sin embargo, presenta una preferencia por las regiones 3'UTR de los ARNm donde posteriormente interactúa con WTAP para llevar a cabo la metilación en estos sitios (Yue *et al.* 2018).

1.2.1.1 La formación de m⁶A es catalizada por un heterodímero formado por METTL3-METTL14. El factor catalítico con actividad metiltransferasa es el heterodímero METTL3 / METTL14 (Fig. 2), que contiene dos proteínas principales METTL3 y METTL14. Este heterodímero fue originalmente aislado de un sub-complejo de ~800 kDa de extractos nucleares de células HeLa (Narayan y Rottman 1988). En este ensayo, los ARNm sintéticos se

mezclaron con extractos nucleares de células HeLa, y la incorporación de grupos [3H] -metilo en el ARN fue medida para monitorear la formación de m⁶A. Utilizando esta estrategia, se demostró que la metilación *in vitro* de ARNm sintéticos es semejante al patrón de m⁶A observado *in vivo*, además se confirmó que la secuencia consenso previamente reportada (RRACH) también se metila utilizando este sistema (Harper *et al.* 1990). También mediante este ensayo de metilación *in vitro*, Rottman y colaboradores probaron la actividad de metilación de diversas fracciones nucleares separadas por cromatografía en columna y se aisló una fracción de 70 kDa que era capaz de unirse a S-adenosilmetionina (SAM) (Bokar *et al.* 1994). La purificación y posterior clonación permitieron identificar la secuencia para esta metiltransferasa (Bokar *et al.* 1997), la cual fue originalmente denominada MT-A70, y posteriormente como METTL3. La inactivación genética de METTL3 en plantas, levaduras y células de mamíferos conduce a una pérdida completa o casi completa de m⁶A en ARN poliadenilado (Agarwala *et al.* 2012, Zhong *et al.* 2008, Geula *et al.* 2015). Así, METTL3 parece ser la principal enzima formadora de m⁶A en ARNm poliadenilado. No obstante, es importante destacar que METTL3 no cataliza la formación de m⁶A en ARNt, ARNr o en ARNs pequeños nucleares (Shimba *et al.* 1995). Los análisis de proteómica de los interactores de METTL3 revelaron la presencia de la metiltransferasa METTL14 (Liu *et al.*, 2014). La propuesta de que hay dos diferentes metiltransferasas que determinan la dinámica de formación de m⁶A en el transcriptoma fue un concepto importante en el campo de estudio de esta modificación. Este descubrimiento planteó la posibilidad de que la regulación diferencial de METTL3 y METTL14 podría dar lugar a patrones únicos de formación de m⁶A en el transcriptoma. Sin embargo, estudios recientes en los que se resolvió la estructura del cristal del complejo binario METTL3-METTL14 presentaron resultados que anulan este concepto. Estos estudios demostraron que METTL14 no es enzimáticamente activa y por lo tanto no es capaz de realizar la transferencia del grupo metilo, más bien actúa como un adaptador para unir el sustrato de ARN y para promover la actividad de METTL3, la única con actividad metiltransferasa (Śledź y Jinek 2016, Wang, Doxtader y Nam 2016a, Wang *et al.* 2016b). Por lo tanto, la ubicación específica y la dinámica de m⁶A en el transcriptoma no pueden atribuirse a la actividad diferencial de METTL3 o METTL14.



La estructura del cristal de METTL3-METTL14 demostró que el sitio activo de cada subunidad de metiltransferasa es un dominio de plegamiento Rossmann que comprende ocho laminas- β flanqueadas por cuatro α -hélices (Śledź y Jinek 2016, Wang, Doxtader y Nam 2016a, Wang *et al.* 2016b) (Figura 2c). Los dominios MTase de METTL3 y METTL14 se dimerizan a través de una red de interacciones de puentes de hidrógeno, así como interacciones hidrofóbicas (Figura 2d), formando una extensa interfaz de interacción (Figura 2e).

La estructura del cristal del complejo METTL3-METTL14 también reveló que SAH o SAM se une específicamente a METTL3, pero no a METTL14 (Śledź y Jinek 2016, Wang, Doxtader y Nam 2016a, Wang *et al.* 2016b) (Figura 2c). El sitio de unión a SAM en METTL3 está formado por una hélice parcialmente desordenada llamada Loop1 (residuos Asp395-Thr408) y una hélice completamente plegada llamada Loop2 (residuos Arg508-Lys513) opuestos entre sí (Figura 2c, f). Un motivo conservado DPPW en el Loop1 es característico de N6-adenosina metiltransferasas, y está comúnmente involucrado en la coordinación de la adenina en el ARN aceptor. El grupo metilo de SAM es posicionado directamente hacia el motivo DPPW, mientras que el residuo de adenina se posiciona en una cavidad hidrofóbica (Figura 2f).

La superposición estructural de METTL3 y METTL14 revela que METTL14 no puede unir SAM debido a que las cadenas laterales de Trp211 y Pro362 en METTL14 chocarían con el residuo de adenina de SAM (Figura 2f, g). Además, el sitio de unión a SAM en METTL14 está ocluido por las cadenas laterales de Tyr198, Tyr199 e Ile324 que se proyectan desde las hélices correspondientes a Loop1 y Loop2 en METTL3 (Figura 2f, h).

Figura 2. Continuación. (a) La modificación dinámica m^6A está regulada por las metiltransferasas METTL3 y METTL14, y las desmetilasas FTO y ALKBH5. (b) Organización del dominio de METTL3 y METTL14. (c) Estructura global del heterodímero del complejo metiltransferasa con los dominios metiltransferasa de METTL3 y METTL14 (MTD3 y MTD14). (d) Interacciones detalladas entre los dominios MTD de METTL3 y METTL14. (e) Representación de la superficie del complejo METTL3 / METTL14. (f) Superposición de los MTD de METTL3 y METTL14. (g) Alineamiento de secuencia de los dominios MTD de METTL3 y METTL14. (h) La diferencia en las secuencias de las hélices entre MTD3 y MTD14 muestra porque solo METTL3 puede unir SAM. Tomado y modificado de Wu *et al.*, 2017.

Por consiguiente, la parte equivalente del motivo DPPW de METTL3, el motivo EPPL en METTL14 no es accesible y carece de una cavidad hidrofóbica necesaria para coordinar la adenina aceptora. Colectivamente, estas observaciones demuestran que METTL14 contiene un sitio activo degenerado que es incapaz de unir los sustratos, lo que explica que METTL14 sea catalíticamente inactiva.

Aunque METTL3 es la subunidad catalíticamente activa, su actividad es ínfima si no se forman complejos estequiométricos con METTL14 (Śledź y Jinek 2016, Wang, Doxtader y Nam 2016a). La compleja estructura de METTL3-METTL14 revela que el sitio catalítico de METTL3 está formado por tres hélices principales: dos hélices Loop1/Loop2 que contribuyen principalmente a formar el sitio de unión a SAM y una tercera hélice mayor que hace extensos contactos con el dominio MTasa de METTL14 (Figura 2d, h).

1.2.1.2 WTAP: el adaptador clave del complejo METTL3-METTL14

El tercer componente importante del complejo de metiltransferasa de m⁶A es la proteína WTAP, que fue inicialmente identificada por Fray y colaboradores (Zhong *et al.* 2008). Como parte de su análisis, realizaron un ensayo de dos híbridos de levadura para identificar proteínas de unión al homólogo de METTL3 en plantas, lo que dio como resultado la identificación de FIP37, el homólogo de WTAP en plantas. La caracterización detallada de esta interacción confirmó que WTAP se une a METTL3 y que estas dos proteínas colocalizan en el núcleo (Zhong *et al.* 2008).

La importancia funcional de WTAP fue revelada por el grupo de Fink y colaboradores (Agarwala *et al.* 2012), quienes de forma similar, encontraron que METTL3 se une a WTAP, en levaduras. Cabe destacar que estos autores demostraron que WTAP es necesaria para la adición de m⁶A en ARNm de levaduras. Sus datos mostraron que la proteína WTAP interactúa con el complejo METTL3-METTL14 y que esta interacción es necesaria para catalizar la reacción de metilación.

Una de las funciones de WTAP es dirigir al heterodímero METTL3-METTL14, hacia dominios nucleares específicos (Ping *et al.* 2014). Una inactivación de WTAP causa la pérdida de la localización de METTL3-METTL14 de estos dominios nucleares y de manera relevante la

pérdida dramática de m⁶A en el ARNm. Por lo tanto, WTAP mantiene localizado al complejo METTL3-METTL14 en estos dominios nucleares y esta localización es necesaria para llevar a cabo la metilación m⁶A en los ARNm.

1.2.1.3 KIAA1429/VIRMA: una proteína accesoria del complejo principal de metilación

KIAA1429 (también conocida como vir-like metiltransferasa asociada m⁶A, o VIRMA), el homólogo en mamífero de la proteína Virilizer de *Drosophila*, también se asocia con el complejo de metilación. Un análisis proteómico de WTAP reveló a la proteína KIAA1429 como una de las principales proteínas con las que interactúa WTAP (Horiuchi *et al.* 2013). Los estudios subsecuentes observaron de manera similar esta interacción (Schwartz *et al.* 2014). Una falta de KIAA1429 conduce a una pérdida sustancial de m⁶A, lo que indica que es necesaria la función de KIAA1429 para la actividad del complejo de metiltransferasa.

En un trabajo realizado por Yue y colaboradores se reportó que esta proteína está involucrada en adicionar la metilación m⁶A en el 3'UTR y cerca del codón de terminación en los ARNm. En las líneas celulares humanas donde se inactivó KIAA1429, se observa una pérdida de m⁶A en la región 3'UTR y alrededor del codón de terminación. En este estudio se propuso un modelo en el que KIAA1429 sirve como una proteína de andamiaje que funciona para mantener juntos a WTAP con las proteínas accesorias, formando así un sitio adecuado para acomodar METTL3 / METTL14 (principalmente a través de WTAP) con la finalidad de guiar la adición de m⁶A en el 3'UTR y alrededor del codón de terminación (Yue *et al.* 2018).

En este mismo estudio se demostró la interacción de KIAA1429 con el factor de corte I (CFIm, un componente del complejo proteico de poliadenilación y procesamiento del pre-ARNm), y que esta interacción es dependiente de ARN. Cabe destacar que las líneas celulares en las que se inactivó ya sea KIAA1429 o METTL3 se presentaban transcritos cuyo 3'UTR era más largo de lo normal, lo cual sugiere que el complejo multiprotéico de metiltransferasa promueve el reclutamiento de la maquinaria de poliadenilación a través de la interacción de KIAA1429 con CFIm (Yue *et al.* 2018).

1.2.1.4 RBM15/RBM15B: Mediadores de la especificidad de la metilación

Un misterio importante en la biología de m⁶A ha sido el mecanismo por el cual ciertas adenosinas son específicamente seleccionadas para ser metiladas. La secuencia de consenso preferida para la metilación es RRACH, que se observa con una frecuencia de cada 64 nucleótidos en promedio y esta secuencia consenso presenta una distribución uniforme a lo largo de la longitud de un ARNm dado (Linder *et al.* 2015). Sin embargo, los sitios RRACH metilados sólo se enriquecen en ciertos ARNm y dentro de ciertas regiones del transcrito (Meyer y Jaffrey 2014). Por lo tanto, sólo algunos sitios RRACH se seleccionan para ser metilados, sin embargo, el mecanismo que dirige esta selectividad es desconocido.

Recientes estudios han comenzado a generar información sobre como sitios consenso RRACH específicos pueden ser metilados. Recientemente se demostró que las proteínas RBM15 y su parólogo RBM15B son componentes adicionales del complejo de metiltransferasa (Patil *et al.* 2016). Estas proteínas se identificaron inicialmente como interactores de WTAP a través de estudios de proteómica (Horiuchi *et al.* 2013), lo que llevó a especular que también podrían contribuir al complejo de metiltransferasa. De hecho, los análisis de coimmunoprecipitación revelaron que RBM15 y RBM15B interactúan con METTL3 de una manera dependiente de WTAP (Patil *et al.*, 2016). Es importante destacar que mutantes nulas de RBM15 y RBM15B causan reducciones significativas en los niveles de m⁶A en ARNm (Patil *et al.*, 2016), lo que indica que estas proteínas son componentes funcionales del complejo metiltransferasa. Estos hallazgos fueron apoyados por estudios en *Drosophila*, que demostraron que el homólogo de RBM15 en este organismo, también es necesario para la formación de m⁶A en moscas (Lence *et al.* 2016).

Curiosamente, los estudios iCLIP (del inglés: *Individual-nucleotide resolution UV crosslinking and immunoprecipitation*), una técnica utilizada para analizar interacción proteína-ARN con una resolución a nivel de nucleótido, demostró que RBM15 y RBM15B se unen a las regiones ricas en U en ARNm inmediatamente adyacentes a los sitios m⁶A (Patil *et al.* 2016). Este hallazgo sugiere que, en lugar de unirse directamente a los motivos RRACH, RBM15 y RBM15B se unen a las regiones enriquecidas en uracilo y luego reclutan al complejo METTL3-METTL14 a través de una interacción con WTAP para metilar motivos RRACH cercanos.

Un ARN que es sustrato de este complejo es el ARN largo no-codificante Xist, que media la inactivación del cromosoma X y el silenciamiento de genes durante el desarrollo. La metilación m⁶A en Xist asistida por RBM15 y RBM15B es necesaria para el silenciamiento mediado por este ARN, revelando así la primera actividad funcional para la metilación específica del transcrito dirigida por RBM15 y RBM15B (Patil *et al.* 2016).

Por último, cabe mencionar que pueden existir adaptadores adicionales. No todos los sitios RRACH metilados se encuentran cerca de regiones ricas en U; por lo tanto, la metilación mediada por RBM15 y RBM15B es probablemente un mecanismo para la adición de m⁶A en sólo un subconjunto de ARNs (Meyer y Jaffrey 2016).

1.2.1.5 METTL16: Una metiltransferasa que cataliza la adición de m⁶A en transcritos específicos

Estudios recientes han revelado que en al menos en algunos ARNs de humano la modificación m⁶A puede añadirse por medio de una metiltransferasa adicional, la metiltransferasa 16 (METTL16) (Pendleton *et al.* 2017). Conrad y colaboradores demostraron que METTL16 de humano cataliza la síntesis de m⁶A tanto en el ARNsU U6 como en el ARNm de MAT2A (SAM sintetasa) (Pendleton *et al.* 2017). En particular, el m⁶A se encuentra en un contexto C-m⁶A-G en el ARNm de MAT2A, lo que indica que no todos los residuos m⁶A en ARNm están en un contexto de secuencia RRACH. Hasta la fecha, MAT2A es el único ARNm que se conoce como sustrato de METTL16, sin embargo, una investigación más extensa podría revelar otros ARNm que sean metilados por esta enzima, especialmente los implicados en el metabolismo de SAM.

1.2.2 Efecto de la transcripción en la catálisis de la metilación

Hasta hace relativamente poco tiempo solo se sabía que el complejo de metiltransferasa se localiza en el núcleo, pero no se sabía con exactitud en que momento durante la formación del ARNm se realiza la reacción metilación. Bajo esta premisa el grupo de investigación de Agami y colaboradores (Slobodin *et al.* 2017) realizaron un experimento en el que emplearon camptotecina (CPT), un compuesto químico que inhibe a la topoisomerasa I y, en concentraciones bajas, ralentiza la progresión de la transcripción de la ARN polimerasa II (ARNPII). Bajo estas condiciones se observó una disminución en los niveles de los ARNm en

paralelo con un aumento relativo de m⁶A, sugiriendo una correlación negativa entre la elongación de la transcripción y la adición de m⁶A.

Esta sugerencia originó la posibilidad en la que la formación de m⁶A pudiera ocurrir co-transcripcionalmente, por lo que este grupo de investigación anticipó una interacción física entre la RNAPII y el complejo de metiltransferasa. Para probar esta hipótesis se inmunoprecipitó RNAPII de células crecidas bajo condiciones normales o bajo tratamiento con CPT y se probó eluir METTL3. De manera relevante, mientras que bajo condiciones normales no se observó una interacción visible, bajo tratamiento con CPT, METTL3 fue eficientemente co-inmunoprecipitada, sugiriendo fuertemente la formación cotranscripcional de m⁶A. Estos resultados también indican que la afinidad entre el complejo de metiltransferasa y la RNAPII depende de la dinámica de esta última. Aunque no está claro cómo se induce exactamente esta interacción, se propone que la progresión lenta o pausada que sucede a menudo en la RNAPII aumenta la probabilidad de unión del complejo de metiltransferasa (Slobodin *et al.* 2017).

1.2.3 Enzimas responsables del proceso de desmetilación

FTO y ALKBH5 son hasta ahora las únicas dos enzimas conocidas que catalizan la desmetilación de m⁶A (Fig. 1), pertenecen a la familia AlkB de dioxigenasas dependientes de α -cetoglutarato/Fe (II) (Jia *et al.* 2011, Zheng *et al.* 2013). La familia de desmetilasas AlkB dependientes de α -cetoglutarato, catalizan principalmente la desmetilación oxidativa de bases N-alquiladas, en humanos se han reportado nueve miembros, denominados ALKBH1-8 y FTO. Aunque estos miembros poseen un sitio catalítico similar, exhiben diferencias en la preferencia de sustratos (Alemu *et al.* 2016). Tanto FTO como ALKBH5 desmetilan específicamente m⁶A en ARN de cadena sencilla, pero FTO presenta una preferencia por un contexto particular y además desmetila a través de tres rondas de reacciones oxidativas generando dos intermediarios hm⁶A y fm⁶A (Fu *et al.* 2013), mientras ALKBH5 convierte directamente m⁶A a adenosina sin intermediarios (Zheng *et al.* 2013).

1.2.3.1 FTO (fat mass and obesity associated)

Aunque FTO fue la primera enzima descrita como desmetilasa de m^6A , esta visión de FTO ha cambiado notablemente con el reciente hallazgo de que *in vivo* FTO presenta una baja afinidad por m^6A (Mauer *et al.* 2017). El vínculo inicial entre FTO y el ARN fue descrito por He y colaboradores, quienes demostraron que FTO es capaz de desmetilar 3-metiluridina en el ARN, un nucleótido modificado que no se encuentra de manera abundante en el ARNm. Posteriormente este grupo demostró que FTO podría desmetilar m^6A en el ARNm en reacciones *in vitro* (Jia *et al.* 2011). También se observaron cambios sutiles en los niveles de m^6A en el ARNm en células en las que se sobreexpresó o se inhibió la expresión de *FTO* (Jia *et al.* 2011). Estos estudios proporcionaron el apoyo inicial a la idea de que m^6A podría ser desmetilada por FTO y sugirió la idea de que m^6A podría formarse y eliminarse de una manera dinámica, dependiente de alguna señal.

La alteración selectiva en los niveles de m^6A en sólo unos pocos residuos de adeninas en ratones en los que se inactivó FTO fue intrigante porque todos los residuos m^6A están posicionados en el mismo motivo consenso. Por lo cual, en teoría cada residuo m^6A debe ser igualmente susceptible a FTO. Sin embargo, un análisis más detallado de estos resultados mostró que los sitios de enriquecimiento de m^6A que se observan elevados en los mutantes *fto* se encuentran en el 5'UTR (Mauer *et al.* 2017). El 5'-UTR es el sitio de m^6A_m , que es una modificación muy similar a m^6A excepto que presenta una modificación 2'-O-metil en la ribosa del nucleótido.

Con los estudios previos era claro que FTO podía desmetilar la posición N6 de la adenina (Jia *et al.* 2011), pero no probaron este efecto en otro nucleótido celular altamente abundante que contiene N6-metiladenosina, es decir, m^6A_m . Se demostró que FTO muestra casi 100 veces mayor actividad catalítica hacia m^6A_m cuando se presenta en su contexto natural, es decir adyacente a la N7-metilguanosa (m7G) (Mauer *et al.* 2017). Notablemente, las mediciones cuantitativas de m^6A_m en células mutantes nulas de *fto* mostraron un aumento significativo en los niveles de m^6A_m , y sin un aumento detectable en m^6A . Por el contrario, un aumento en la localización citoplasmática de FTO causa una reducción en m^6A_m , sin un efecto aparente

sobre los niveles de m⁶A. Estos experimentos revelaron que m⁶A_m es una marca epitranscriptómica reversible asociada al CAP (Mauer *et al.* 2017). Estudios adicionales mostraron que m⁶A_m hace a los ARNm menos susceptibles a la eliminación del CAP, contribuyendo así a una mayor estabilidad del ARNm que contienen esta modificación. Por lo tanto, FTO cataliza principalmente la desmetilación de m⁶A_m, y este papel tiene consecuencias funcionales para la estabilidad del ARNm.

1.2.3.2 ALKBH5

ALKBH5 fue inicialmente descubierta mediante análisis bioquímicos en los que se probaron ciertas enzimas de humano que *in silico* se predijeron como desmetilasas de m⁶A (Zheng *et al.* 2013). En este estudio como parte de la caracterización de ALKBH5 se generaron líneas mutantes nulas de ALKBH5, las cuales mostraban un aumento en los niveles de m⁶A, y líneas sobreexpresoras en las que disminuían los niveles globales de m⁶A. Dichos resultados apoyan la idea de que ALKBH5 pueda regular los niveles de m⁶A en el ARNm (Zheng *et al.* 2013). Mientras FTO cataliza la desmetilación preferencial de m⁶A_m, ALKBH5 no muestra afinidad hacia m⁶A_m y parece ser una desmetilasa selectiva para m⁶A (Mauer *et al.* 2017).

La localización de ALKBH5 en el núcleo (Zheng *et al.* 2013) sugiere que es poco probable que catalice la desmetilación de m⁶A en ARNm maduro en el citoplasma. Si ALKBH5 desmetila ARNm, esta desmetilación puede ocurrir solamente durante la biogénesis del ARNm en el núcleo. ALKBH5 también puede catalizar la desmetilación de m⁶A en ARN largos no codificantes enriquecidos en núcleo, que presenten esta modificación, tales como MALAT1 y Neat1 (Linder *et al.* 2015).

1.2.4 Las proteínas de unión a m⁶A y el efecto de la modificación m⁶A en el metabolismo del ARNm

Dominissini y colaboradores como ya se mencionó identificaron YTHDF2 y YTHDF3 (a partir de aquí DF2 y DF3, respectivamente) como proteínas de unión a m⁶A en un experimento de *pull-down* de ARN-m⁶A (Dominissini *et al.* 2012). Estas proteínas fueron los interactores más sólidos de entre varias proteínas recuperadas. Estas proteínas se caracterizan por su dominio YTH, que es el único dominio reconocible en su secuencia de aminoácidos. El dominio YTH fue

identificado inicialmente por Stamm y colaboradores realizando búsquedas por homología computacional para identificar dominios similares a los del factor de splicing YT521B (ahora conocido como YTHDC1 (DC1)) (Stoilov, Rafalska y Stamm 2002). Este dominio se denominó YTH por *YT521-B homology*. Tras la identificación inicial de DF2 y DF3 como proteínas de unión a m⁶A, múltiples grupos verificaron estos resultados realizando ensayos tipo EMSA y por cristalografía (Luo y Tong 2014, Zhang *et al.* 2010, Xu *et al.* 2014). Los resultados de estos experimentos demostraron que el dominio YTH se une selectivamente a m⁶A en el ARN, lo que condujo a numerosos esfuerzos para descubrir la función de estas proteínas.

Los genomas de mamíferos contienen cinco genes que codifican para proteínas que presentan el dominio YTH: DC1, DC2, DF1, DF2 y DF3. Mediante análisis de la secuencia, estas proteínas se pueden dividir en tres clases principales: DC1, DC2 y la familia DF, que comprende tres parálogos casi idénticos (DF1, DF2 y DF3) (Fig. 3). Se mapearon con rapidez los sitios de unión de cada una de las proteínas en el transcriptoma usando la metodología iCLIP y expresándolas endógenamente (Konig *et al.* 2010, Patil *et al.* 2016).

Este enfoque demostró que las tres proteínas DF se unen principalmente a los sitios de m⁶A en el ARNm, mientras que DC1 se une sólo a algunos sitios de m⁶A en el ARNm y en ARNs no codificantes. Los sitios de unión de DC1 observados en el ARNm reflejan que la unión de DC1 con m⁶A ocurre antes de que el ARNm se exporte al citosol. DC2 se une en una menor proporción a un número selecto de sitios de m⁶A, especialmente en ARNs no codificantes. En particular, esta distribución demuestra que las cinco proteínas YTH son proteínas capaces de reconocer y unirse a m⁶A (Patil *et al.* 2016).

Los miembros de la familia DF (DF1, DF2 y DF3) son muy similares entre sí, son predominantemente citoplásmicos, y contienen principalmente dos regiones: un dominio YTH situado en el extremo C-terminal, y el resto de la proteína, que es la mayor parte, forma un gran dominio de baja complejidad enriquecido en gran medida por los residuos: Q, N y P (Meyer y Jaffrey 2016) (Fig. 3). La presencia de un dominio tan grande y de baja complejidad plantea la posibilidad de que la función de las proteínas DF esté ligada a separaciones de fase de tipo líquido-líquido y a *droplets* de proteína, como se observa comúnmente en proteínas

que tienen dominios de unión a ARN (Aguzzi y Altmeyer 2016). De hecho, las proteínas DF pueden ser encontradas en estructuras de *droplet* de proteínas, incluyendo gránulos de estrés (Jain *et al.* 2016) y gránulos de ARN generados artificialmente (Kato *et al.* 2012).

En contraste con las proteínas DFs, DC1 es predominantemente nuclear y contiene un dominio YTH, múltiples dominios funcionales, incluyendo algunos elementos de localización nuclear, y un dominio SH2 (Fig. 1 y Fig. 3) DC2 es una proteína nucleoplásmica con función poco conocida. Esta proteína contiene un dominio DEAD-box de ARN helicasa, planteando la posibilidad de que este dominio helicasa esté dirigido a ARNs específicos a través de la unión de DC2 con m⁶A. DC2 se une predominantemente a ARNs no codificantes provenientes de regiones intrónicas e intergénicas, por lo tanto, algunas funciones de esta proteína pueden no ser mediadas por su unión directa a ARNm maduros. A diferencia de las otras proteínas YTH de mamíferos, la manera en que DC2 se une a m⁶A en el transcriptoma no es tan clara (Patil *et al.* 2016).

La estructura del dominio YTH unido en complejo con RNA-m⁶A fue resuelta por varios grupos (Luo y Tong 2014, Theler *et al.* 2014, Xu *et al.* 2014). El dominio YTH se pliega en una estructura que comprende aproximadamente ~145 aminoácidos, la cual presenta una cavidad con forma de pirámide alrededor del grupo metilo de m⁶A que comprende dos o tres residuos de triptófano. El dominio YTH también interacciona con los nucleótidos anteriores y posteriores

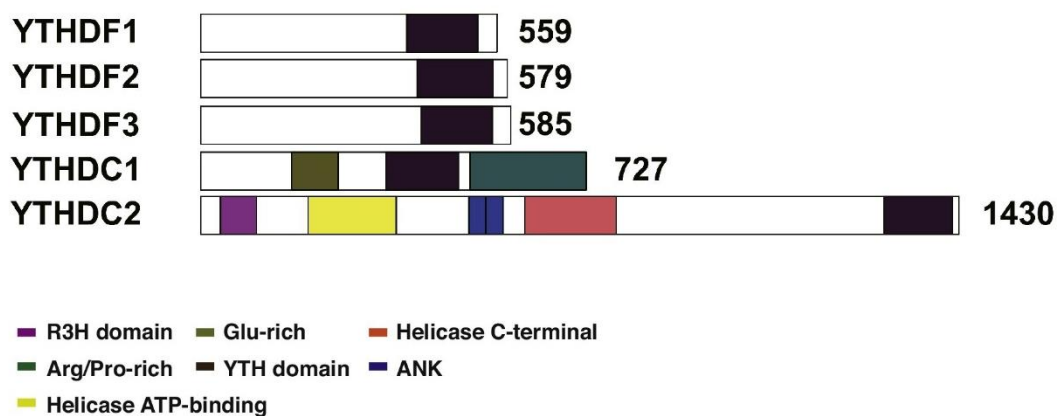


Figura 3. Organización de los dominios de las proteínas YTH humano. El dominio YTH se localiza hacia el Carboxilo terminal en todas estas proteínas.

a m⁶A, incluyendo interacciones con el motivo RRACH (Luo y Tong 2014, Theler *et al.* 2014, Xu *et al.* 2014). Notablemente, en estos estudios se observó que la afinidad de unión del dominio YTH con m⁶A es inusualmente débil, y se reportan constantes de afinidad de ~1-2 μM y de ~20-50 veces menos para ARN no metilado. Esta baja constante de afinidad sugiere que el dominio YTH probablemente no forma un complejo estable con m⁶A y necesita la participación de proteínas adaptadoras para que ocurra la interacción.

La modificación m⁶A se encuentra en un contexto degenerado en el ARN: RRACH. A la fecha, no hay evidencia de que una secuencia específica de RRACH sea preferida por alguno de los dominios YTH o por diferentes proteínas YTH. Un estudio sugirió que el dominio YTH de DC1, a diferencia de otros dominios YTH, prefiere un residuo de G precediendo a m⁶A (Xu *et al.* 2015); sin embargo, el análisis iCLIP de todas las proteínas YTH endógenas mostró que todos los dominios YTH se unen a m⁶A, sin importar si m⁶A se encuentra precedido por un residuo de G o A (Patil *et al.* 2016). Por lo tanto, la secuencia primaria por sí sola no parece dictar una función diferencial en la unión de las proteínas YTH a ARNm específicos.

1.2.4.1 Función de las proteínas YTHDFs

DF2 media la inestabilidad del ARNm. Existen estudios contradictorios relacionados con la función de las proteínas DF. Varios grupos han realizado ensayos muy similares, pero han obtenido resultados diferentes, lo que hace difícil comprender completamente la función de estas proteínas. El primer estudio en explorar la función de una proteína DF fue realizado con DF2 (Wang *et al.* 2014), el miembro de la familia DF que es el más abundante en casi todos los tipos celulares. Este estudio propuso que DF2 es capaz de mediar la inestabilidad de los ARNm que contienen m⁶A (Fig. 1). Estudios más recientes demostraron de manera similar que los ARNm que contienen m⁶A tienen una vida media reducida en comparación con los ARNm que carecen de m⁶A. Un análisis en células con una mutación en DF2 demostró que los ARNm reconocidos por DF2, mostraron un incremento en la tasa de vida media (Wang *et al.* 2014), y se propuso que este efecto se debía a una interacción de DF2 con los *P-bodies* (sitios en el citoplasma donde se acumulan ARNm que no se traducen) (Fig. 1). Sin embargo, esta interacción fue momentánea, lo que sugiere que DF2 puede interactuar sólo transitoriamente

con los *P-bodies* y liberar los ARNm para su degradación. En particular, el análisis del perfil ribosómico mostró un efecto mínimo de DF2 sobre la eficiencia traduccional (Wang *et al.* 2014).

DF1 y su participación en la traducción. En contraste con DF2, se ha demostrado que DF1 es capaz de promover la traducción (Fig. 1) (Wang *et al.* 2015). A diferencia de DF2, DF1 no mostró un efecto sustancial sobre la estabilidad del ARNm con base en el análisis de vida media del ARNm de células HeLa en cultivo de una mutante nula de DF1. Wang y colaboradores encontraron que DF1 es capaz de interactuar con eIF3 y otros factores de inicio de la traducción, lo cual sugiere que DF1 influye directamente en esta. Los autores también propusieron un modelo en el que los ARNm que fueron primeramente traducidos debido a la unión de DF1, eran después degradados al ser transferidos a DF2. Este modelo se generó sobre la base de un análisis de marcaje metabólico para monitorear el destino de los ARNm (Wang *et al.* 2015).

1.2.4.2 Función de las proteínas YTHDCs

DC1 se caracterizó originalmente como un regulador de *splicing* enriquecido en núcleo, antes de que se reconociera su capacidad de unión a m⁶A (Fig. 1). Estudios en los que se sobreexpresó DC1 demostraron que esta proteína regula diversos tipos de *splicing* alternativo en transcritos endógenos (Zhang *et al.* 2010). Después de demostrar que el dominio YTH es capaz de unirse a m⁶A, se examinó si el *splicing* regulado por DC1 es dependiente de la interacción DC1- m⁶A (Xiao *et al.* 2016). Una mutante nula de DC1 causa anomalías en el procesamiento de los pre-ARNm, este defecto puede ser restablecido complementando a las células con una proteína DC1 que contiene solo su dominio YTH, por lo tanto, estos datos indican que DC1 regula, al menos parcialmente, los eventos de *splicing* en una manera dependiente de la interacción con m⁶A.

Un reporte recientemente publicado por He y colaboradores (Roundtree *et al.* 2017) demostró que la unión de DC1 con m⁶A, facilita el transporte de los ARNm metilados desde el núcleo al citoplasma en células HeLa. La inactivación de DC1 resulta en una exportación nuclear defectuosa en los ARNm a los que se une DC1, y se demostró que esta actividad es

independiente de la actividad de *splicing*. Además de estos resultados, se observó una acumulación de ARNm metilados en el núcleo, acompañada de una disminución de estos en el citoplasma. Por otro lado, se sugirió un mecanismo para explicar este fenómeno, en el que el ARNm metilado es reconocido por DC1 y posteriormente entregado a NXF1 (receptor nuclear de exportación de ARNm) por la asociación de SRSF3 la cual sirve de adaptador entre DC1 y NXF1 (Roundtree *et al.* 2017). La interacción entre DC1 y SRSF3 permite seleccionar a los ARNm metilados para exportación nuclear, en la que la unión de DC1 con m⁶A se propaga a NXF1 mediante su interacción con SRSF3, que por sí misma no es capaz de unirse a m⁶A *in vitro*. En conjunto, estos datos presentan una vía para la exportación nuclear del ARNm que es dependiente de m⁶A y proporcionan evidencia de la capacidad reguladora de la maquinaria de exportación de ARNm nuclear.

A la fecha no se sabe exactamente que función realiza DC2. Durante los primeros estudios de iCLIP (Patil *et al.* 2016), DC2 se describió como un factor celular que era necesario para la replicación del genoma del VIH (virus de la inmunodeficiencia humana). Estudios recientes sugieren que DC2 mejora la traducción del ARNm de HIF1 α a través de su función helicasa (Tanabe *et al.* 2016). No se sabe si estos efectos requieren de su dominio YTH o implican el reconocimiento m⁶A en el ARNm de HIF1 α .

1.2.4.3 HNRNPA2B1

Una proteína adicional con la propiedad de unirse a m⁶A es HNRNPA2B1. Esta proteína fue originalmente identificada como una proteína nuclear de unión a m⁶A que afecta la biogénesis de microRNAs (Alarcón *et al.* 2015). Aunque HNRNPA2B1 carece de un dominio YTH, los autores sugieren que puede unirse a m⁶A. En este estudio se demuestra que la presencia de m⁶A puede provocar la formación de estructuras secundarias en el ARN lo que mejora la capacidad de HNRNPA2B1 de unirse a estos sitios.

Curiosamente, un reciente análisis reexaminó el papel de HNRNPA2B1 en el procesamiento de pre-microRNAs (Martinez *et al.* 2016) y no logró encontrar un efecto claro en los niveles de expresión de microRNAs maduros cuando inactivan a HNRNPA2B1, en contraste con estudios anteriores. Este nuevo estudio desafía la idea de que HNRNPA2B1 tenga una participación en

el procesamiento de microRNAs. Se necesitará más investigación para resolver esta discrepancia.

1.3 EFECTOS FENOTÍPICOS ASOCIADOS CON LA ALTERACIÓN DE N6-METILADENOSINA (m⁶A) EN ARNm Y SUS FACTORES DE REGULACIÓN EN EUCARIOTAS MULTICELULARES.

Las funciones moleculares de m⁶A se traducen finalmente en el control de complejas funciones celulares. Dichos controles parecen ser necesarios en la transición entre distintos estados celulares durante la diferenciación y el desarrollo, y se sabe que debe ocurrir un recambio en el transcriptoma con la finalidad de adquirir una nueva identidad. Dicho esto, m⁶A podría ser importante modulando los niveles de ARNm de diversos factores de transcripción y, por lo tanto, podría actuar como una barrera o facilitar estas transiciones (Zhao *et al.* 2017a). A la fecha, no se han descrito con exactitud las consecuencias biológicas de la metilación m⁶A, pero lo que sí se conoce es que una alteración en los niveles de metilación afecta claramente el desarrollo de los organismos en los que se ha estudiado. A continuación se describen algunos de los efectos observados en los organismos en los que se ha estudiado m⁶A.

1.3.1 Insectos

Drosophila melanogaster fue uno de los primeros organismos en los que se detectó la modificación m⁶A de manera interna en el ARNm. Un trabajo reciente (Hongay y Orr-Weaver 2011) reportó que una inactivación del inductor de la meiosis 4 IME4 (homólogo de METTL3 de mamíferos) (Tabla 1) afecta la fertilidad masculina y femenina. En las hembras, METTL3 mostró ser esencial para la ovogénesis, ya que las hembras que presentaban una inactivación de esta proteína mostraban cavidades ováricas fusionadas y defectos en el desarrollo y la función de las células foliculares. Estos defectos fueron asociados a la reducción de la señalización de Notch en las células foliculares. Debido a que el fenotipo de la ovogénesis en las mutantes homocigotas de METTL3 pudo ser rescatado completamente mediante la expresión de una forma activada de Notch, se comprobó que la señalización de Notch es la principal vía afectada. Tomados en conjunto, estos datos indican que m⁶A es un componente

clave en la regulación de la señalización de Notch, probablemente funcionando antes de la activación de Notch (Hongay y Orr-Weaver 2011).

También en *D. melanogaster* se sabe que KIAA1429 y WTAP están íntimamente involucradas en el procesamiento de Sxl (Sexlethal) el cual es un transcrito que se expresa en hembras para controlar la determinación sexual (Hausmann et al. 2016b) y este proceso es dependiente de m⁶A, el cual es adicionado por la actividad de estas proteínas en conjunto con METTL3-METTL14.

1.3.2 Peces

En el pez cebra, una inactivación de METTL3 o WTAP conduce a varios defectos en el desarrollo, mientras que una doble mutante conduce a niveles elevados de apoptosis (Ping *et al.* 2014). La transición zigótica materna (MZT) es uno de los procesos orquestados con mayor precisión durante la vida temprana de los embriones, sin embargo, los factores que organizan el patrón temporal de la MZT en vertebrados son en gran medida desconocidos. En un estudio publicado por He y colaboradores (Zhao *et al.* 2017b) se demostró que más de un tercio de los ARNm maternos del pez cebra pueden ser metilados y la degradación de estos ARNm maternos es facilitada por DF2. La inactivación de DF2 en embriones de pez cebra disminuye la degradación de los ARNm maternos modificados con m⁶A e impide la activación del genoma zigótico. Estos embriones que fallan en iniciar una MZT, sufren una pausa en el ciclo celular y permanecen retrasados en su desarrollo a lo largo de la vida larvaria. Este estudio revela que el decaimiento del ARN dependiente de m⁶A regula la eliminación de ARNm maternos metilados durante la MZT del pez cebra, destacando el papel crítico de la metilación m⁶A en el recambio transcriptómico y el desarrollo embrionario temprano.

1.3.3 Ratones

En ratones, una inactivación de METTL3 en células madre embrionarias resulta en defectos en la diferenciación de los linajes posteriores y conduce en última instancia a apoptosis (Geula *et al.* 2015). Además, ratones con una proteína Alkbh5 inactiva sufren de espermatogénesis deteriorada y un incremento en los niveles de apoptosis, lo cual probablemente contribuya a la reducida fertilidad observada en estos ratones (Zheng *et al.* 2013).

1.3.4 Humanos

En humanos m⁶A está ligada a numerosas enfermedades. Varios tipos de cáncer se han relacionado con m⁶A, aunque muchas de estas conexiones son indirectas. Evidencia más directa surgió de una inactivación de METTL3, la cual provoca apoptosis y una reducción en la proliferación de las células cancerosas (Lin *et al.* 2016). Por otro lado, la activación de ALKBH5 por hipoxia causa un enriquecimiento de células madre cancerosas (Zhang *et al.* 2016).

La conexión entre m⁶A y trastornos neuronales también ha sido documentada. Por ejemplo, la señalización de la dopamina es dependiente de la actividad de FTO y de la metilación m⁶A en ARNm de factores transcripcionales que son clave para la señalización (Hess *et al.* 2013). También se han asociado a FTO y ALKBH5 con el desarrollo de los trastornos depresivos (Du *et al.*). Adicción, epilepsia, déficit de atención y otros trastornos neurológicos también se han asociado a ser regulados por m⁶A (Zhao *et al.* 2017a). Los trastornos reproductivos y la infección por el VIH (Kennedy *et al.* 2016), también se encuentran entre las enfermedades influenciadas por m⁶A. Los ARNs virales presentan también esta modificación, la cual es adicionada por las enzimas del hospedero y podría ser utilizada por los virus para permitir su supervivencia en las células humanas (Tirumuru *et al.* 2016).

1.3.5 Plantas

La metilación m⁶A fue inicialmente descubierta en plantas monocotiledóneas y subsecuentemente en *Arabidopsis thaliana*, en la cual se han hecho la mayoría de las descripciones de m⁶A en plantas. Una inactivación de METTL3 en *Arabidopsis* impide la progresión del embrión en desarrollo para pasar de la etapa globular; observando un fenotipo letal embrionario, con arresto en la semilla (Zhong *et al.* 2008) (Fig. 4a). Para poder observar el efecto de una mutante *mettl3* homocigota, se fusionó la región codificante de METTL3 con el promotor de ABI3 el cual es un gen que solo se expresa durante el desarrollo embrionario, esta construcción se utilizó para transformar la mutante *mettl3*. Así, una inactivación de *mettl3* durante desarrollo postembrionario de *A. thaliana* resulta en una disminución en los niveles de m⁶A en la población de ARNm lo cual genera en la planta un crecimiento anormal

con una reducida dominancia apical, identidad anormal de órganos e incremento en la ramificación de los tricomas (Bodi *et al.* 2012) (Fig. 4b-c).

Los fenotipos se exacerban cuando se inactiva a WTAP, ya que las plantas mutantes *wtap* exhiben una excesiva proliferación de células del meristemo apical del brote (SAM, por sus siglas en inglés: *shoot apical meristem*) y un arresto en la formación de hojas, tallo y flores, lo cual acorta considerablemente el tiempo de vida de las plantas de *A. thaliana* (Shen *et al.* 2016). Estos fenotipos tan dramáticos se asocian específicamente con la pérdida de m⁶A y un aumento significativo del ARNm de *WUSCHEL (WUS)* y *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*. Estos resultados sugieren que el control de la estabilidad de los transcritos de *WUS* y *STM* en el SAM está directamente regulado por la metilación m⁶A, y que es crucial para el desarrollo post-embriionario. Aunque se sugiere que *WUS* y *STM* actúan en vías independientes, la regulación de *WUS* y *STM* mediada por m⁶A permite un control coordinado de sus respectivas funciones en la promoción de la especificación de células madre y en antagonizar la diferenciación celular, logrando un control adecuado de proliferación y diferenciación celular (Shen *et al.* 2016).

En *A. thaliana*, m⁶A se ve enriquecido en regiones 3'UTR cerca de codones de paro y, de forma única, alrededor de codones de inicio. Los genes cuyos transcritos presentan sitios únicos de m⁶A están enriquecidos en vías específicas de las plantas que implican por ejemplo componentes plastídicos (Luo *et al.* 2014). La deposición de m⁶A también se correlaciona positivamente con la abundancia de una gran fracción de transcritos en *A. thaliana*, lo que sugiere que m⁶A también podría tener actividades reguladoras de la expresión génica en las plantas. Otro estudio encontró que existen diferencias de los niveles de m⁶A entre los órganos de la planta (Wan *et al.* 2015), lo que sugiere que m⁶A afecta la organogénesis y tiene funciones específicas dependiendo del tipo celular. Numerosos homólogos de proteínas desmetilasas de m⁶A y de proteínas con dominio YTH son encontrados en los genomas de las plantas (Meyer y Jaffrey 2016) (Tabla 2).

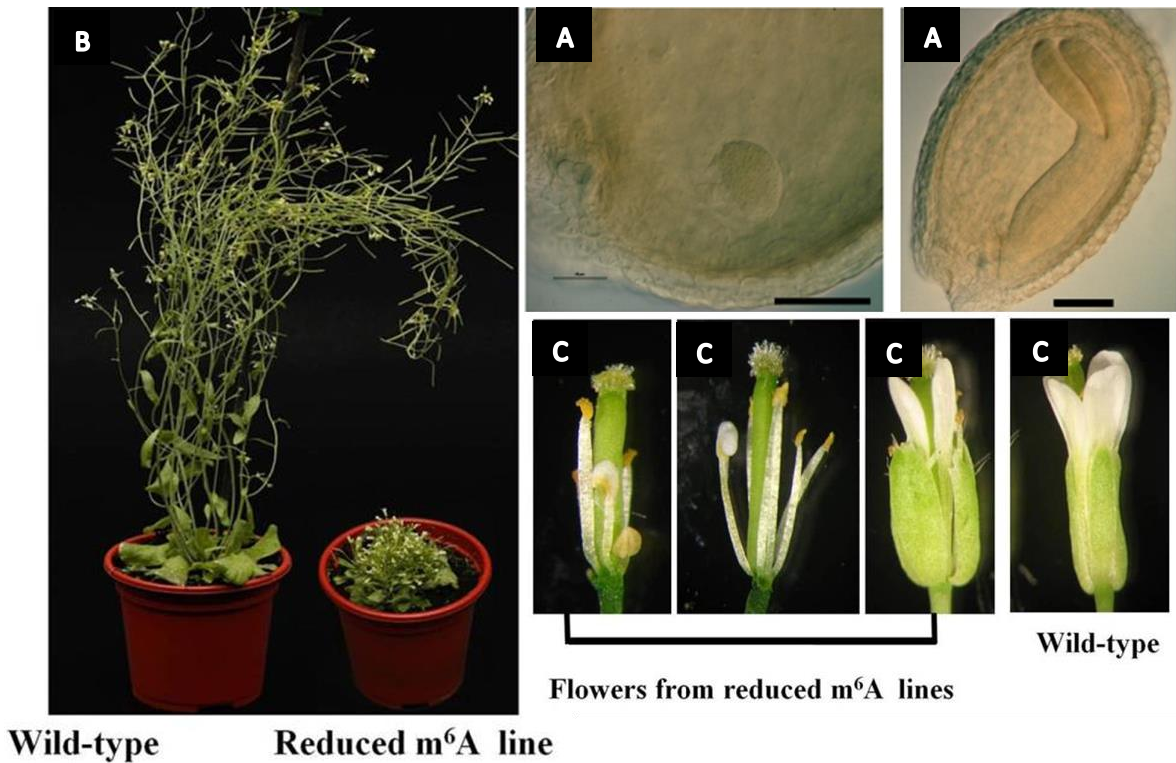


Figura 4. Una reducción en los niveles de metilación m⁶A genera defectos en el desarrollo de *A. thaliana*. (A) La mutante nula *mett13* tiene un fenotipo de letalidad embrionaria con arresto en la etapa globular (izquierdo) comparadas con el desarrollo de una planta silvestre (derecho) (B) Las plantas homocigotas *mett13* complementadas con *pABI3::METTL3* presentan una reducida dominancia apical (C) con una definición anormal de órganos. Tomado de Zhong *et al.* 2008 y Bodi *et al.* 2012.

Hasta este punto sobre la descripción de los efectos fenotípicos originados por modular los niveles de m⁶A en distintos organismos podemos notar que resaltan claramente algunas similitudes, una de ellas es la alta frecuencia a observar fenotipos letales en los que se ve comprometido el desarrollo embrionario o el estatus pluripotente de las células, independientemente de que sea un organismo animal o vegetal, lo que remarca la importancia de esta modificación durante el desarrollo de organismos multicelulares. Cabe mencionar que todos los organismos en los que se ha reportado m⁶A presentan una característica en común y es que presentan un ciclo de vida con una etapa

predominantemente diploide. Sin embargo, en el reino vegetal existen grupos de plantas como las briofitas que son relativamente poco complejas y que presentan ciclos de vida con una etapa predominante haploide y un desarrollo embrionario sencillo. Es por esta razón que sería sumamente interesante analizar los efectos de modular los niveles de m⁶A y observar con mayor claridad cómo el desarrollo se ve afectado por esta modificación en una especie con una etapa predominante haploide.

Tabla 1. Proteínas de unión, metiltransferasas y desmetilasas de m⁶A putativas y descritas en diferentes organismos. Tomada y modificada de Meyer y Jaffrey 2016.

Organism	DF like	DC1 like	DC2 like	METTTL3	WTAP	METTTL14	VIRMA (KIAA1429)	FTO	ALKBH5
<i>Homo sapiens</i>	YTHDF1	YTHDC1	YTHDC2	METTL3	WTAP	METTL14	VIRMA	FTO	ALKBH5
	YTHDF2								
	YTHDF3								
<i>Mus musculus</i>	YTHDF1	YTHDC1	YTHDC2	Mettl3	Wtap	Mettl14	Virma	Fto	Alkbh5
	YTHDF2								
	YTHDF3								
<i>Xenopus laevis</i>	YTHDF1	YTHDC1	Predicted YTHDC2 (XP_018119820)	mettl3	wtap	mettl14	virma	fto	alkbh5
	YTHDF2								
	YTHDF3								
<i>Danio rerio</i>	YTHDF1	YTHDC1	Predicted YTHDC2 (XP_017211699)	mettl3	wtap	mettl14	si:ch211-79120.4 (orthologous region)	fto	alkbh5
	YTHDF2								
	YTHDF3								
<i>Drosophila melanogaster</i>	CG6422	YTS21B	N/I	Ime4	Fl(2)D	Kar4	Virilizer	N/I	N/I
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MRE1		N/I	Ime4	mum2	Kar4	N/I	N/I	N/I
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	N/I	Mmi1*	N/I	Ime4	N/I	N/I	N/I	N/I	N/I
<i>Arabidopsis thaliana</i>	> 10 proteins that contain a YTH domain			MTA	FTP37	MTB	VIRILIZER	> 10 proteins	

1.4 ORIGEN DE LAS PLANTAS TERRESTRES Y *PHYSCOMITRELLA PATENS* COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL DESARROLLO DE LAS PLANTAS.

El origen de las plantas terrestres o embriofitas fue un evento clave en la historia de la vida en la Tierra. Las embriofitas son divididas en briofitas y plantas vasculares, y juntas comprenden un grupo monofilético cuyos orígenes se remontan al período Ordovícico hace aproximadamente 480 millones de años (Bowman, Floyd y Sakakibara 2007, Graham y Wilcox 2000). Las plantas heredaron muchas características bioquímicas, ultraestructurales y fisiológicas de sus ancestros algales, sin embargo, durante la evolución temprana de las embriofitas surgieron numerosas innovaciones que permitieron la colonización del ambiente terrestre como: la protección parental del embrión en desarrollo, el desarrollo de estructuras multicelulares para la producción de gametos, la alternancia de generaciones en donde una fase esporofítica diploide da origen a una fase gametofítica haploide multicelular, la percepción de factores ambientales como luz y gravedad, el origen de matrices extracelulares (esporopolenina, celulosa, lignina y pectina, entre otros compuestos), el establecimiento de redes de comunicación intercelular (plasmodesmos, fitohormonas, receptores y sus ligandos) y la diversificación de redes de regulación génica para promover la diferenciación celular (Bowman *et al.* 2007, Wickett *et al.* 2014).

El phylum Bryophyta *sensu lato* está conformado por los musgos, antoceros y hepáticas y es considerado como el grupo de más temprana diversificación entre las embriofitas. Las briofitas, como grupo basal, tienen características que las diferencian de las traqueofitas: carecen de un sistema vascular, no presentan lignificación en su pared celular, presentan gametos masculinos móviles y una fase gametofítica haploide dominante sobre la fase esporofítica diploide durante su ciclo de vida (Mishler 2001). Las briofitas poseen características biológicas que representan una gran oportunidad para servir como modelos de estudio para investigación en macroevolución, genética de poblaciones y ecología (Mischler 2001). Asimismo, las briofitas recientemente han sido adoptadas como modelo para estudios en genómica comparativa para responder preguntas fundamentales en la biología de plantas, como las bases genéticas de las innovaciones clave que permitieron a las plantas evolucionar a partir de un ancestro acuático y adaptarse a la vida terrestre, los cambios en el desarrollo

responsables de la multicelularidad, así como las alteraciones en el *bauplan* dentro de las plantas terrestres (Bowman *et al.* 2007, Cove *et al.* 2009).

1.4.1 *Physcomitrella patens* como un organismo modelo para el estudio del desarrollo de plantas

Physcomitrella patens es una planta que pertenece al grupo de las Bryophyta y ha sido adoptada como modelo para el estudio del desarrollo vegetal ya que presenta un patrón de desarrollo relativamente simple que culmina en la generación de una planta que posee una organización básica similar a la mayoría de las plantas terrestres, además de ser relativamente fácil de manipular y de modificar genéticamente (Landberg *et al.* 2013).

La fase haploide, gametofítica de *P. patens* comienza con la germinación de una espora haploide y consta de dos etapas de desarrollo con diferencias morfológicas muy marcadas (Fig. 5). La primera etapa, llamada protonema, está formada por filamentos que surgen a través de la división uniplanar de una célula apical y la división biplanar de las células sub-apicales, dando como resultado una red de filamentos. Inicialmente, el protonema consiste en un solo tipo celular, llamado cloronema. Las células de cloronema contienen muchos cloroplastos y parecen estar especializadas en la producción de energía. Posteriormente, después de algunos días de crecimiento, pueden dar lugar a un nuevo tipo celular, llamado caulonema. Las células del caulonema son más largas, se dividen más rápidamente y contienen menos cloroplastos (Cove *et al.* 2009).

Los tipos celulares pueden alternarse, y el equilibrio entre los dos tipos de filamentos está influenciado por la luz y por fitohormonas tales como auxina y citocinina (Schaefer y Zrýd 2001). El 5% de las ramificaciones laterales del caulonema sub-apical pueden tener otro destino y formar un tipo celular pluripotente de división multiplanar conocido como brotes de gametóforos, marcando el inicio de la segunda etapa del desarrollo gametofítico llamado gametóforo (Fig. 5). Los gametóforos producen estructuras similares a las hojas llamadas filidios (que están formados por una sola capa de células) y estructuras similares a raíces unicelulares llamadas rizoides (Cove *et al.* 2009). Como su nombre lo indica, los gametóforos son los órganos que producen los gametos. *P. patens* es una planta monoica, los gametos masculinos o anterozoides, se producen dentro de los anteridios y los gametos femeninos u

oogonios, dentro del arquegonio, ambos en el mismo gametóforo. Los gametos masculinos realizan la fertilización nadando hacia el arquegonio a través de una película de agua superficial. Después de la fecundación, se forman los cigotos, marcando el punto de partida de la próxima generación, el esporófito diploide (Fig. 5). El esporofito de *P. patens* es pequeño y depende en gran medida de la generación gametofítica. Sin embargo, muestra cierto grado de diferenciación tisular, está compuesto por un esporangio, una seta y un pie.

Después de la maduración, las células del tejido esporógeno (producto de múltiples divisiones mitóticas del cigoto), se diferencian en las células madre de la espora que posteriormente sufren meiosis y generan células haploides que posteriormente se convertirán en esporas, las cuales están contenidas en el esporangio maduro (Cove, 1992). El ciclo de vida de esta planta tarda alrededor de tres meses en completarse.

Comparadas con plantas de *Arabidopsis*, las plantas de *P. patens* son pequeñas y de crecimiento lento. Este problema de disponibilidad limitada de material vegetal se puede superar fácilmente gracias a la alta capacidad de regeneración vegetativa, ya que casi cualquier tejido de *P. patens* es capaz de regenerarse después de ser disgregado (Cove *et al.* 2006).

Durante los años recientes, *P. patens* se ha utilizado como modelo para estudiar varios procesos celulares, del desarrollo y evolución de las plantas. Como se describió anteriormente, su desarrollo es relativamente simple, y genera solo unos pocos tejidos que contienen un número limitado de tipos celulares. Además, la disponibilidad de su genoma y las diferentes metodologías de edición dirigida del genoma hacen de esta planta un modelo invaluable (Schaefer y Zrýd 2001). Por esta razón en nuestro grupo de investigación estamos interesados en conocer la participación de la metilación m⁶A de ARNm en el desarrollo y ciclo de vida de *P. patens*. Cabe mencionar que en colaboración con el Dr. Fabien Nogué del Institut Jean-Pierre Bourgin (Versailles, Francia) se generaron por edición del genoma vía CRISPR/Cas9 plantas de *P. patens* mutantes del complejo de metilación (PpMETTL3, PpMETTL14A, PpMETTL14B y PpWTAP) de las que contamos con mutantes simples, dobles, triples y cuádruple. A través de estas mutantes se reducirón los niveles globales de m⁶A y se observó

el efecto que esto tiene en el desarrollo de *P. patens*, lo que nos sirvió para sugerir la posible actividad de esta modificación durante el ciclo de vida de esta planta.

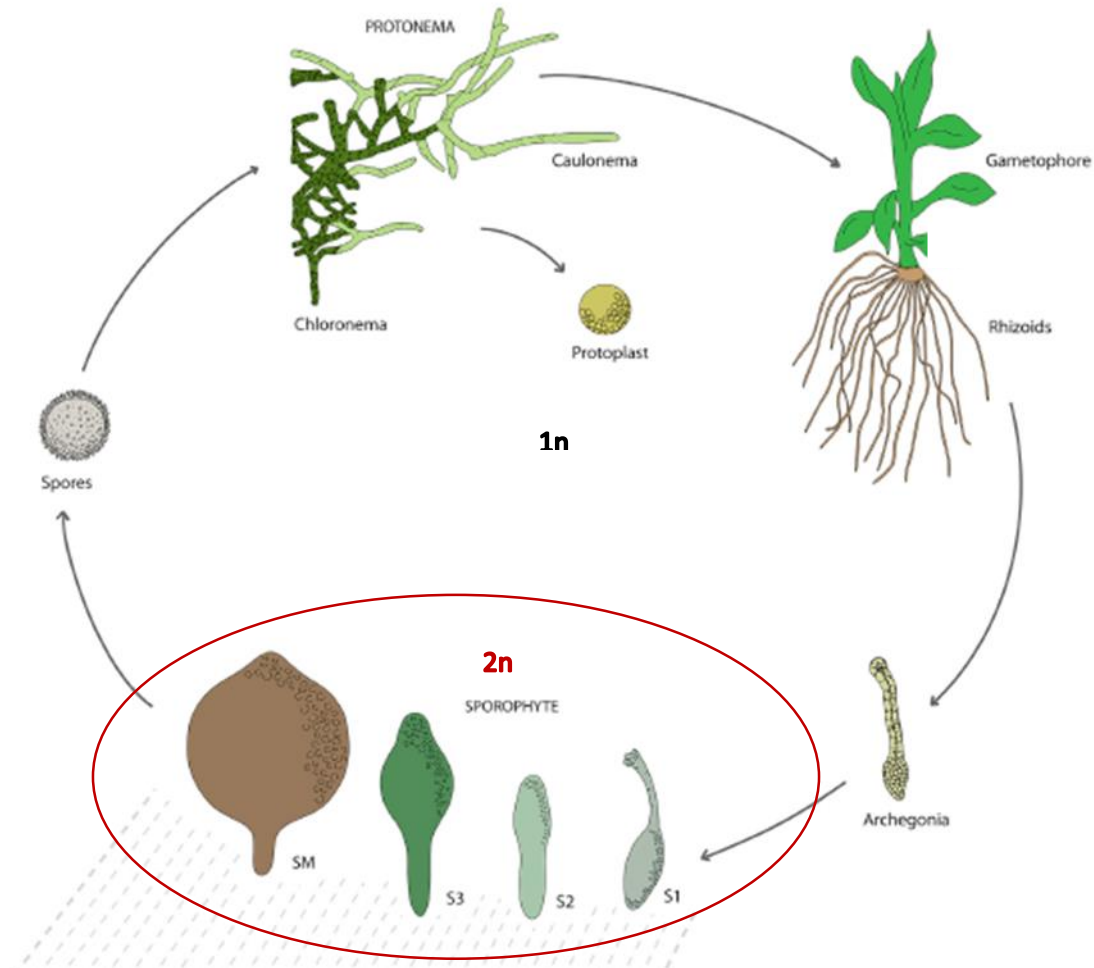


Figura 5. Ciclo de vida de *P. patens*. El ciclo empieza con la germinación de la espora haploide, para dar origen a la primera etapa gametofítica que está compuesta por una red de filamentos y es conocida en conjunto como protonema. Ésta posteriormente dará origen al gametóforo donde se generan las estructuras reproductivas: arquegonios y anteridios. Al realizarse la fecundación, se genera un cigoto diploide que dará origen al esporofito donde son producidas las esporas. Tomado de Ortiz-Ramírez *et al.* 2016.

HIPOTESIS

Una alteración en los niveles de m⁶A en ARNs mensajeros ocasiona defectos en el crecimiento y desarrollo de *Physcomitrella patens*, particularmente durante la fase esporofítica.

OBJETIVOS

General

Determinar si la inactivación de los genes que codifican a las proteínas principales del complejo de metiltransferasa de m⁶A tienen un efecto en el crecimiento y desarrollo de *P. patens*.

Particulares

- Analizar los patrones de expresión de los genes principales del complejo de metiltransferasa de m⁶A, durante el ciclo de vida de *P. patens*.
- Caracterizar las mutaciones generadas por el sistema CRISPR-Cas9 en los genes *PpMETTL3*, *PpMETTL14A*, *PpMETTL14B* y *PpWTAP*
- Analizar el fenotipo de las mutantes para estos genes durante el desarrollo de *P. patens*.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las plantas de *P. patens* cepa Gransden, fueron mantenidas asexualmente a 25 °C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas oscuridad y propagadas induciendo la formación de protonema. Para ello se utilizó tejido proveniente de 5 gametóforos que y se colocó en tubos eppendorf con 1 ml de H₂O y posteriormente fue homogenizado utilizando el equipo *FastPrep*[®]-24 a velocidad mínima por 15 s. Posteriormente este material vegetal fue plantado en un disco de celofán dulce colocado en una caja de Petri con medio PpNH₄ (su composición se muestra en Anexos), este tejido se dejó regenerando por 15 días para inducir la formación de protonema, que fue homogenizado (como se describió anteriormente) cada 7 días para mantener estimulada la formación de protonema.

Aislamiento de protoplastos

Debido a que el material vegetal con el que partimos está formado por múltiples tipos celulares, generar un análisis comparativo adecuado del crecimiento de los distintos genotipos no es posible, por ello se indujo la formación de protoplastos, a partir del cual es posible comparar el crecimiento de los distintos genotipos.

Para el aislamiento y regeneración de los protoplastos se siguió el protocolo publicado en el 2009 por Cove y colaboradores. Para aislar los protoplastos se utilizó todo el tejido proveniente de una caja de Petri que contaba protonema de 7 días de edad y se colocó en una solución de 5 ml manitol-Driselasa (Sigma-Aldrich) al 0.5%, posteriormente se incubó durante 60 min a temperatura ambiente con un movimiento lento y constante. Una vez transcurrido el tiempo, el tejido se filtró por una malla Miracloth (Calbiochem ©) estéril. Posteriormente los protoplastos fueron sedimentados centrifugándolos a 200 g por 4 min a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 ml de solución PW (Protoplast Wash, la composición se encuentra en anexos), este paso se repitió dos veces. Para la regeneración de los protoplastos el pellet del paso anterior se resuspendió en 5 ml de medio PRMT líquido (Anexos) y la suspensión de protoplastos se colocó cuidadosamente sobre un disco de celofán dulce dentro de cajas de Petri con medio PRMB (Anexos). Estos protoplastos se dejaron regenerando durante 4 días a 25 °C y 16 h luz/8 h oscuridad y

posteriormente fueron trasplantados a cajas de Petri con medio PpNH4 y cultivados bajo las mismas condiciones.

Análisis del crecimiento del protonema y formación de los brotes de gametóforos

Después de 7 días de crecimiento del protonema obtenido a partir de protoplastos se analizó utilizando un estereoscopio SZX7 Zoom (Olympus), y se tomaron fotos de 30 plantas por genotipo. Para este estudio se utilizaron las mutantes sencillas *Ppmett13*, *Ppwtap* y la cuádruple mutante (*Ppmett13/Ppwtap/Ppmett14a/Ppmett14b*). Las fotos fueron analizadas con el *plugin* MorphologyMacroPublicV2.6 de ImageJ, el cual calcula área, perímetro, solidez y circularidad, entre otros parámetros.

El gametofito de *P. patens* presenta distintos tipos de células pluripotentes, incluidas las células apicales que se dividen en planos únicos para generar el protonema filamentoso y las células del brote que se dividen en tres planos para producir brotes axiales de gametóforos. Esta transición del crecimiento filamentoso al triplanar se produce progresivamente durante el ciclo de vida del musgo, por lo cual fue seleccionada como una etapa de interés a analizar en los diferentes genotipos.

Para contar el número de brotes por plantas, se analizaron protonemas de 14 días crecidos a partir de protoplastos. Se colectaron 15 plantas, cada una de las cuales fueron analizadas individualmente utilizando el microscopio invertido (Leica DMRA2, Leica Microsystems) con el objetivo 40 x en campo claro, se contabilizó el número de brotes axiales y estos fueron clasificados en tres categorías de desarrollo: temprana, intermedia y tardía (fotos en anexos). Sin embargo, este método de análisis es poco confiable pues no es fácil distinguir el número de células que presenta el brote axial, por lo cual se procedió a contar el número de filidios (estructuras análogas a las hojas) en plantas de 18 días de edad, para ello estas plantas fueron visualizadas en un estereoscopio SZX7 Zoom (Olympus) y se documentó el número de filidios por gametóforo, así como el número de gametóforos por planta regenerada a partir de protoplasto.

Inducción de estructuras reproductivas, producción de esporangios y análisis de las esporas

Para la inducción de estructuras reproductivas se homogenizó tejido de protonema de 7 días de edad utilizando el equipo *FastPrep*[®]-24 y se plantó sobre discos estériles de turba (*Jiffy-7*, *Jiffy Products International*) que se colocaron en cajas Magenta™ con un volumen de 150 mL de agua estéril y se dejaron crecer bajo las condiciones antes mencionadas durante 6 semanas (Sakakibara *et al.* 2008). Posteriormente se restauraron los niveles de agua a 150 mL y las cajas se transfirieron a 17 °C, con un fotoperiodo de 8 h de luz y 16 h de obscuridad, para inducir el desarrollo de estructuras reproductivas (Hohe *et al.* 2002). El desarrollo del esporofito también se dio bajo estas mismas condiciones. La tasa de fertilidad (porcentaje de gametóforos con esporófito) se evaluó mediante el conteo de esporangios desarrollados con éxito en al menos 100 gametóforos colectados al azar.

Las esporas se liberaron de los esporofitos maduros en 500 µl de agua estéril. Para calcular el área bidimensional de las esporas, se tomaron fotografías con un microscopio invertido (Leica DMRA2, Leica Microsystems) utilizando un objetivo 40 × con iluminación de campo claro y se midió utilizando la función ImageJ "measuring" (<http://imagej.nih.gov/ij/>). La determinación del número de esporas por esporangio se realizó tomando 10 µl de la suspensión de esporas (preparadas como se mencionó anteriormente) y colocándolas en una cámara de hemocitómetro (NeuBauer Blaubrand, Sigma-Aldrich). Las rejillas superior e inferior se usaron para contar. Se utilizaron 8 esporangios por genotipo y cada muestra se midió tres veces para minimizar la variación.

Para los ensayos de germinación se usaron esporas provenientes de esporangios individuales, para ello se tomaron 200 µl de la suspensión de esporas y se colocaron en cajas con medio PpNH₄ suplementado con 10 mM CaCl₂. Estas esporas se colocaron a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas oscuridad. La germinación de las esporas fue monitoreada diariamente por 30 días usando un estereoscopio SZX7 Zoom (Olympus). Para este experimento se utilizaron 4 esporangios por genotipo.

Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico, se utilizó el método CTAB con algunas modificaciones. El tejido vegetal se trituró con nitrógeno líquido, posteriormente se agregaron 300 µl de *buffer* CTAB 2X (Anexos) y se incubó a 65 °C por 30 min, se agregaron 300 µl de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13,000 rpm. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregaron 300 µl de isopropanol. La muestra se centrifugó por 10 min a 12000 rpm y el pellet se lavó con 1 ml de etanol al 70%. La muestra se volvió a centrifugar por 10 min y se removió el exceso de etanol. Finalmente, el pellet se resuspendió en 50 µl de H₂O.

PCR a partir de ADN genómico para la confirmación de las mutantes

Para asegurarnos que estamos analizando las mutantes adecuadas, se siguió una estrategia en la que se diseñaron oligonucleótidos que flanquearan la secuencia de unión del sgRNA (*single guide RNA*) y que amplificaran un fragmento de ~100-120 pb, ya que es posible observar diferencias en estos tamaños si se analizan por electroforesis en un gel de agarosa 2%. Para cada reacción de PCR se empleó ADN genómico en una reacción con un volumen final de 50 µl. Cada reacción constó de 0.1 mM de cada dNTP, 0.1 µM de cada uno de los oligonucleótidos, 2 mM de MgCl₂ y 8 ng de ADN genómico. Las muestras se sometieron al siguiente programa de PCR en un termociclador (Mastercycler® Pro, Eppendorf): 5 minutos a 95 °C, y 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 30 s, finalmente se dejó a 72 °C por 3 min de extensión final. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa 2% en buffer TAE 1x. Posteriormente las bandas correspondientes a cada gen fueron purificadas utilizando el kit GeneJET Gel Extraction Kit (*Thermo scientific*), el producto purificado se envió a la unidad de secuenciación del Instituto de biotecnología de la UNAM.

Búsqueda en bases de datos y servidores de análisis

Actualmente existe una plataforma conocida como *Physcomitrella eFP Browser* para la búsqueda y análisis del perfil transcripcional (http://bar.utoronto.ca/efp_physcomitrella). La única limitante es la compatibilidad con la versión tres del genoma de *P. patens* por lo que para la búsqueda de los genes en esta base de datos se utilizó la nomenclatura acuñada

durante la versión uno del genoma, METTL3 (Pp1s249_97v6.1), METTL14-1 (Pp1s41_79v6.1), METTL14-2 (Pp1s2179_18v6.1) y WTAP (Pp1s179_1v6.1).

Extracción de RNA.

Tejido de protonema de 14 días y gametóforos maduros se usaron para la extracción de ARN total. La obtención de ARN total se realizó usando TRIZOL (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. También se utilizó de manera alternativa el kit *RNeasy plant mini kit* (QIAGEN). La concentración final e integridad del ARN obtenido se confirmó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop y por electroforesis en gel de agarosa, respectivamente. El ARN de cada muestra se utilizó para determinar la presencia del ARN mensajero de los genes mutados, así como para confirmar la presencia de los transcritos que codifican a las principales proteínas del complejo de metiltransferasa en los diferentes genotipos.

Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Un μg del ARN total se trató con DNasa I utilizando 1 μl de Buffer 10X y se llevó a un volumen final de 9 μl con agua libre de RNAsas. Después se agregó 1 μl de la enzima DNasa I (Fermentas) y se incubó a 37 °C por 30 min. La reacción se finalizó agregando 1 μl de EDTA 25 mM y calentando por 10 min a 65 °C. Este ARN se utilizó para la síntesis de ADNc que se describe a continuación.

Para la síntesis de ADNc se preparó la siguiente mezcla por cada muestra de ARN distinta: 7 μl del ARN tratado con DNasa I, 1 μl de oligo-dT (50 μM), y 4.5 μl de H₂O libre de RNAsas. Posteriormente se incubaron a 65 °C por 5 min. Se añadieron 4 μl de Buffer de reacción 5X (Thermo Scientific), 0.5 μl del inhibidor de RNAsas Ribolock 40U/ μl (Thermo Scientific), 2 μl de mix dNTPs 10 mM y 1 μl de la transcriptasa reversa RevertAid 200U/ μl (Thermo Scientific), y se incubaron a 42°C por 60 min. Para detener la reacción las reacciones se incubaron a 70°C por 10 minutos.

Cuantificación de la abundancia relativa de algunos ARNm por PCR en tiempo real (qPCR)

La técnica se realizó en un equipo Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR Systems, el paquete utilizado fue Maxima SYBR Green/Rox (Thermo Scientific). La concentración final de

los oligonucleótidos fue de 300 nM. Se utilizó 1.5 µl del cDNA, 7.5 µl de SYBR Green/Rox (Thermo Scientific) y 4.8 µl para llegar a un volumen final de reacción de 15 µl.

El programa de amplificación consta de los siguientes pasos:

Paso 1: 95°C por 10 min

Paso 2: 95°C por 15 seg
Paso 3: 62 °C por 30 seg

El paso 2-3 se repite 40 veces

Paso 4: 95°C por 30 seg

El gradiente de temperaturas utilizado para realizar las curvas de disociación fue de 60 °C a 95 °C, realizando aumentos de 0.5°C. Se debe obtener solo un pico en la curva de disociación lo cual indica la amplificación de un solo miRNA o transcrito blanco.

Para cada transcrito se obtuvo una curva de eficiencia de cinco puntos realizando diluciones seriales (1:5) del cDNA obtenido. El control de carga o gen de referencia para la normalización fue UBI10, el cual ha sido reportado como un gen cuya expresión se mantiene constante entre diferentes condiciones y tejidos.

La medición de la expresión relativa se obtuvo utilizando el método comparativo CT ($\Delta\Delta CT$). Para aquellos genes en donde los oligonucleótidos no tienen el 100% de eficiencia en su amplificación se utilizó la siguiente fórmula para la corrección de la abundancia relativa (<http://blog.mcbryan.co.uk/2013/06/qpcr-normalisation.html>).

$$RE = \frac{Ef (Gen)^{C_T (Gen,un) - C_T (Gen,tra)}}{Ef (ReGen)^{C_T (ReGen,un) - C_T (ReGen,tra)}}$$

En donde:

RE= Expresión relativa del gen **Ef**= 10⁻¹/pendiente de la curva de eficiencia

Gen= Gen o miRNA a cuantificar **ReGen**= Gen o miRNA de referencia o control interno

CT= Ciclo umbral un= muestra sin tratamiento **tra**= muestra con tratamiento

Análisis de *dot blot* de N6-metiladenosinas

Se aisló ARNm a partir de 100 µg RNA total usando el kit: MagJET mRNA Enrichment (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la concentración de ARNm purificado con un NanoDrop y se hicieron diluciones seriadas de 100 ng/µl y 40 ng/µl usando agua libre de RNAsas. Se desnaturalizó el ARNm a 95°C para deshacer las estructuras secundarias por 3 min. Inmediatamente después las muestras se colocaron en hielo y se colocaron 2 µl de ARNm de cada dilución directamente sobre una membrana Hybond-N+. Se entrecruzó el ARNm a la membrana usando un Stratalinker 2400 UV Crosslinker, usando el modo Autocrosslink (1,200 microjoules [x100]; 25-50 sec) dos veces. Posteriormente, la membrana se lavó con 10 ml de buffer de lavado (Composición de los buffers se describe en anexos), durante 5 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Se incubó la membrana en 10 ml de buffer de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Se incubó la membrana con 2 ml del buffer de incubación que contiene el anticuerpo anti-m⁶A (1:250) durante toda la noche a 4°C con agitación suave. Se lavó la membrana 3 veces durante 5 min cada una en 10 ml de buffer de lavado con agitación suave. Se incubó la membrana con 10 ml de buffer de incubación que contiene el anticuerpo IgG-HRP anti-conejo (1:10,000) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente se lavó la membrana cuatro veces durante 10 min con 10 ml de buffer de lavado con agitación suave. Posteriormente se procedió a revelar la membrana mediante una reacción cromogénica.

Inmunoprecipitación de ARN metilado seguido de PCR punto final (MeRIP-PCR)

Con la finalidad de corroborar los fenotipos observados en la etapa de brotes axiales decidimos realizar una inmunoprecipitación de ARN metilado e identificar por PCR punto final si algunos de los transcritos involucrados en la formación de los brotes axiales se encontraban metilados. Se partió de 500 ng de ARNm obtenidos a partir del genotipo silvestre así como de la cuádruple mutante, contenidos en un volumen de 75 µl, se agregó 1 µl de inhibidor de RNAsas, 20 µl de IP buffer 5X (La composición de los buffer se describe en anexos), 5 µl de Anticuerpo anti-m⁶A, para obtener un volumen final de 100 µl. Esta mezcla se dejó incubando toda la noche a 4°C con agitación. Mientras la mezcla se incubaba se lavaron dos veces 200 µl

de Proteína recombinante A en 1 ml de buffer IP 1X, se realizó un breve spin y se desechó el sobrenadante, posteriormente se resuspendió en 1 ml de buffer IP 1X suplementado con BSA (0.5 mg/ml) y esta mezcla se incubó por dos horas con rotación. Posteriormente se realizó un breve spin, se retiró el sobrenadante y la Proteína recombinante A se lavó dos veces con 1 ml de buffer IP 1X, posteriormente se dividió la Proteína recombinante A en dos tubos en cantidades iguales. Una vez transcurrido el tiempo de incubación de la reacción de inmunoprecipitación esta se transfirió a uno de los tubos que contiene la Proteína recombinante A y esta mezcla se incubó por dos horas a 4°C con agitación. Posteriormente mediante un breve spin se recuperó el sobrenadante y se guardó como ARN no metilado. Seguidamente se lavó tres veces el pellet con 1 ml de buffer IP 1X. A continuación se realizó un spin, se desechó el sobrenadante y se agregaron 100 µl de buffer de elución al pellet. La mezcla se incubó durante 1 hora con agitación continua a 4°C. Se realizó un spin se colectó el sobrenadante (1) y se agregaron 100 µl de buffer IP 1X, se mezcló por pipeteo, se realizó un breve spin y se colectó el sobrenadante (2), se volvió a resuspender el pellet en 100 µl de buffer IP 1X, se mezcló por pipeteo, se realizó un breve spin y se recuperó el sobrenadante (3). Posteriormente se procedió a mezclar los tres sobrenadantes colectados y se agregó 1 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, se mezcló por pipeteo y se incubó a -80°C toda la noche. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugó la mezcla a 15000 g por 25 min a 4°C. Se desechó con mucho cuidado el sobrenadante. Se lavó el pellet con 1 ml de etanol 75% y se centrifugó nuevamente a 15000 g por 15 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 15 µl H₂O libre de RNAsas. Este ARN se etiquetó como ARN metilado. Posteriormente se procedió a realizar la síntesis de cDNA (usando el método descrito anteriormente) Para ello se utilizaron los 15 µl de ARN obtenidos en la fracción metilada y no metilada, también se realizó la síntesis de cDNA a partir de 500 ng de ARNm. Estos cDNA fueron empleados para realizar PCRs punto final de algunos genes de interés.

RESULTADOS

Expresión diferencial de los genes que codifican a las proteínas principales del complejo de metiltransferasa

El análisis realizado en la base de datos *Physcomitrella eFP Browser* (http://bar.utoronto.ca/efp_physcomitrella) nos muestra que los puntos máximos de expresión de PpMETTL3, PpMETTL14-1, PpMETTL14-2 y PpWTAP se presentan durante el desarrollo del esporofito y en la espora (Fig. 6). Es muy notable en esta figura que durante el desarrollo del protonema y en protoplastos estos genes no parecieran ser muy abundantes, sugiriendo que la actividad de estos genes no influye de forma determinante en el desarrollo de estas estructuras. Por el contrario, la expresión de estos genes se ve más abundante en las estructuras reproductivas, por lo que su función podría ser importante en esta etapa de desarrollo.

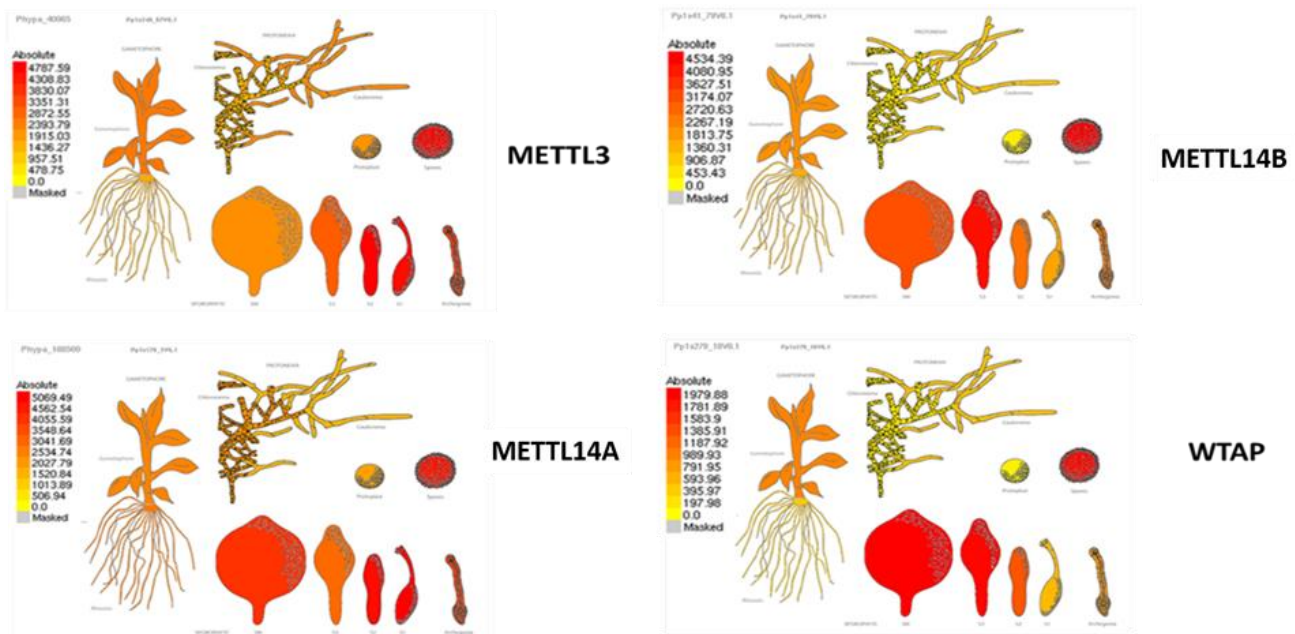


Figura 6. Atlas de expresión absoluta de los principales genes del complejo de metiltransferasa. Como se muestra en los cuatro paneles la mayor abundancia del transcrito se observa durante el desarrollo del esporofito con algunas diferencias. Particularmente todos los genes parecen expresarse predominantemente en la espora madura. La escala representa menor abundancia relativa hacia el amarillo y mayor abundancia relativa hacia el rojo (http://bar.utoronto.ca/efp_physcomitrella).

Análisis de las mutantes

Mediante una colaboración con Fabien Nogué del Institut Jean-Pierre Bourgin (Versailles, Francia) se obtuvieron líneas mutantes generadas por CRISPR-Cas9 dirigidas a los genes PpMETTL3, PpMETTL14A, PpMETTL14B y PpWTAP. Un punto importante a mencionar es que el sistema CRISPR-Cas9 empleado para la obtención de las mutantes se expresó de manera transitoria sin integrar la secuencia que codifica a la proteína Cas9 en el genoma de la planta, esto con la finalidad de reducir la probabilidad de generar *off targets*, así como de evitar artefactos por el hecho de que la secuencia que codifica a la proteína Cas9 se haya integrado en una región importante del genoma. Para determinar el estatus de cada una de las mutantes se realizaron amplificaciones por PCR a partir de ADN genómico (Tab. 2) para cada uno de los genes del complejo principal de metiltransferasa, como se observa en la Fig. 7 (ver Anexos para el análisis completo de todas las mutantes). Este experimento demostró que existen algunas de líneas mutantes en las cuales el estatus que se indicaba no es el correcto, como en el caso de la mutante sencilla *Ppmettl14b*, la doble mutante *Ppmettl3/Ppmettl14b* y la triple mutante *Ppmettl3/Ppmettl114b/Ppwtap* en las que se demostró que también presentan una mutación en PpMETTL14A. Por otro lado y de manera similar, la mutante sencilla *Ppmettl14a*, presenta una versión mutada de PpMETTL14B, por lo tanto no contamos con mutantes sencillas para estos dos genes. Un análisis de la secuencia de unión del sgRNA diseñado para dirigir la edición de estos genes ayuda a explicar estos resultados, ya que la secuencia del sgRNA es capaz de reconocer una secuencia en el gen de PpMETTL14A que también está

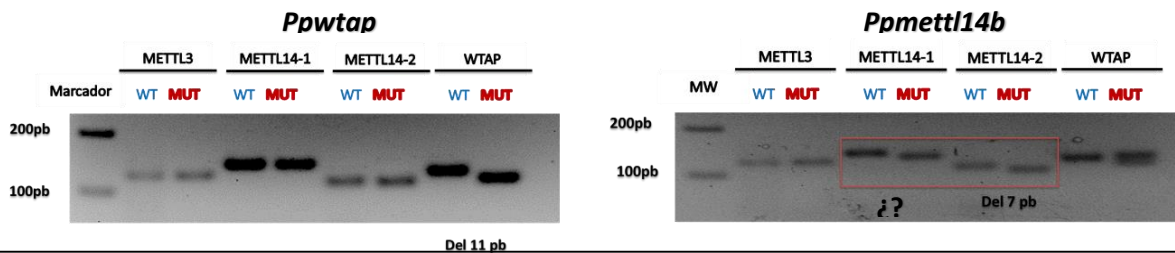


Figura 7. Análisis de las mutaciones en cada uno de los genes del complejo principal de metiltransferasa. En estos geles de agarosa 2%, las mutaciones generadas por el sistema CRISPR-Cas9 se muestran por la diferencia en el tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos. Para este experimento, el ADN genómico de las plantas WT sirvió como control y el ADN de las diferentes plantas mutantes se usó para analizar el estado mutante del gen correspondiente. El marco rojo indica el gen que contiene una deleción no esperada en METTL14A según lo revela la diferencia de tamaño. Los experimentos restantes correspondientes a cada mutante se encuentran en Anexos.

presente en el gen de PpMETTL14B. Esto ocasionó que durante la mutagénesis de cada uno de los genes, siempre se obtuviera una mutación adicional. Nuestros resultados muestran la eficiencia del sistema CRISPR-Cas9 y por otro lado el hecho de haber obtenido líneas mutantes para PpMETTL14A, donde PpMETTL14B no se vio modificada (por ejemplo, la doble mutante *Ppmettl14a/Ppmettl3* y la triple mutante *Ppmettl14a/Ppmettl3/Ppwtap*), sugiere que la probabilidad de presentar *off targets* es baja, pues incluso a pesar de que el gRNA usado para editar PpMETTL14A presenta una homología completa con una región de PpMETTL14B, solo se editó PpMETTL14A en estas plantas.

Los esquemas de los genes silvestres y mutados se ilustran en la Fig. 8. Como podemos observar en cada uno de los paneles, las mutaciones generadas por el sistema CRISPR-Cas9 resultan en transcritos que presentan un codón de paro prematuro que codificaría para una proteína trunca. Un aspecto interesante es que a pesar de que PpMETTL14A y 14B parecen ser homólogos de PpMETTL14 de Arabidopsis, entre ellas tienden a ser muy diferentes en su extremo N-terminal ya que poseen dominios completamente diferentes. Mientras que PpMETTL14A presenta un dominio de la super familia neuromodulina y un dominio de la super

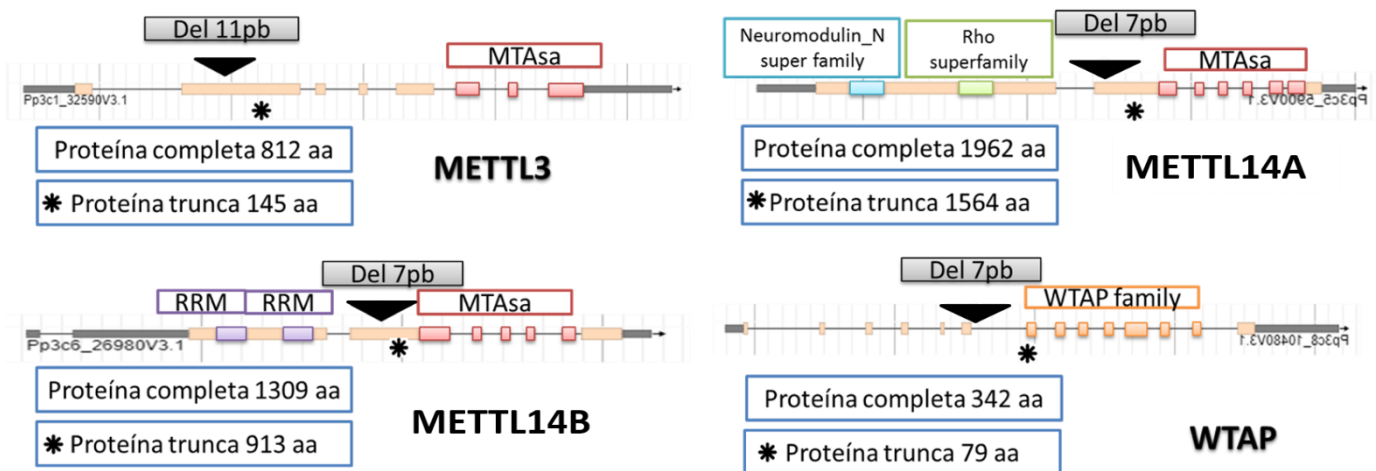


Figura 8. Estructura de los genes que codifican para los factores del complejo metiltransferasa. Los genes están indicados con casillas de color naranja (exones) y líneas negras (intrones). Las líneas grises más gruesas representan 5' y 3' UTR. Los dominios conocidos para cada proteína están indicados arriba de cada gen y los exones correspondientes están remarcados con el mismo color. El sitio donde ocurrió la mutación está señalado con la flecha negra y en el recuadro negro se describe el tipo de mutación que ocurrió. Las mutaciones generadas por CRISPR-Cas9 producen proteínas con codones de paro prematuros (indicados por asteriscos).

Tabla 2. Lista de líneas mutantes. Las letras en negrita indican la presencia de una mutación en METTL14A adicional en los genotipos donde el grupo del Dr. Fabien Nogue no había reportado.

Gen afectado	Estatus	Efecto de la mutación
PpMETTL3	Sencilla	Del 4 pb en la posición 1271
PpWTAP	Sencilla	Del 11pb en la posición 1628
PpMETTL14A	Doble	Ins 11 pb en la posición 5600
PpMETTL14B		Del 17pb en la posición 895
PpMETTL14A	Doble	Del 7 pb en la posición 5600
PpMETTL14B		Del 7pb en la posición 910
PpMETTL3	Doble	Del 11 pb en la posición 1275
PpWTAP		Del 11pb en la posición 1628
PpMETTL3	Doble	Del 4 pb en la posición 1275
PpMETTL14A		Del 7pb en la posición 5600
PpMETTL3	Triple	Del 10 pb en la posición 1268
PpMETTL14B		Del 7pb en la posición 910
PpMETTL14A		Del 7pb en la posición 5600
PpMETTL14A	Doble	Del 7pb en la posición 5600
PpMETTL14B		Del 7pb en la posición 910
PpMETTL3	Triple	Del 4 pb en la posición 1271
PpMETTL14A		Del 7pb en la posición 5600
PpMETTL14B		Del 7pb en la posición 910
PpMETTL3	Cuádruple	Del 10 pb en la posición 1268
PpMETTL14A		Del 7pb en la posición 5600
PpMETTL14B		Del 7pb en la posición 910
PpWTAP		Del 11pb en la posición 1632
PpMETTL3	Triple	Del 4 pb en la posición 1275
PpMETTL14A		Del 7pb en la posición 5600
PpWTAP		Del 11pb en la posición 1632
PpMETTL3	Cuádruple	Del 4 pb en la posición 1271
PpMETTL14A		Del 7pb en la posición 5600
PpMETTL14B		Del 7pb en la posición 910
PpWTAP		Del 11pb en la posición 1628

familia Rho, PpMETTL14B presenta dos dominios de unión a ARN, este hecho hace pensar que ambas proteínas pudieran tener actividades particulares en lugar de ser redundantes entre sí, sugiriendo de esta forma que probablemente sólo PpMETTL14B con sus dominios de unión a ARN sea la única que forme un heterodímero con PpMETTL3. Sin embargo, en estos momentos es difícil comprobarlo ya que no contamos con las mutantes sencillas de estos genes. Por último, es necesario remarcar que al tener mutaciones que generen un codón de paro prematuro es probable que estos transcritos sean degradados por el sistema de NMD (Nonsense Mediated Decay), por lo cual el siguiente experimento consistió en analizar la expresión de estos genes en los genotipos mutantes y determinar si los transcritos correspondientes se acumulan o no. Se analizó el efecto de las mutaciones generadas a nivel de acumulación del ARNm. Para este experimento se utilizó ARN de plantas de 18 días de edad de los genotipos WT y la cuádruple mutante *Ppmettl3/Ppmettl14a/Ppmettl14b/Ppwtap* ya que los alelos mutados son los mismos que los presentes en las mutantes sencillas de cada uno de los genes. Como se puede apreciar en la Fig. 9 la cuádruple mutante carece de la acumulación de los transcritos de PpMETTL3, PpWTAP, PpMETTL14A y PpMETTL14B, mientras que éstos si se acumulan en las plantas silvestres.

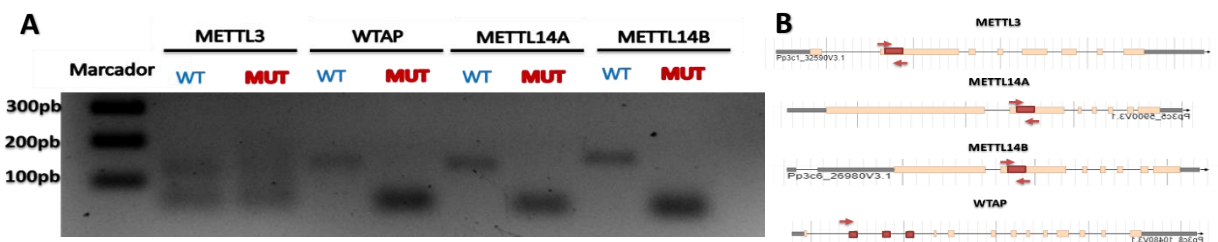


Figura 9. Análisis de RT-PCR para observar la acumulación de los transcritos de METTL3, WTAP, METTL14A y METTL14B en plantas WT y mutante cuádruple. En el panel A se muestra un gel de agarosa 2%, donde se muestra la acumulación de los transcritos de PpMETTL3, PpWTAP, PpMETTL14A y PpMETTL14B. Para este experimento, el cDNA sintetizado a partir de ARN de las plantas WT (azul) sirvió como control y el ARN de la cuádruple mutante (rojo) se usó para analizar el efecto de las mutaciones en la acumulación de los transcritos de estos genes. Como se puede apreciar en la figura, las mutaciones en la cuádruple mutante impiden la acumulación de los transcritos de los diferentes genes. En el panel B se muestran los sitios a los que se unen los oligonucleótidos utilizados para este ensayo.

Estos resultados nos sugieren que al menos en la cuádruple mutante la actividad de metiltransferasa se encuentra abatida y por lo tanto la abundancia de transcritos metilados debería verse afectada negativamente. Dicho esto, es importante analizar los niveles de metilación m⁶A en diferentes mutantes, con la finalidad de asociar los niveles globales de metilación m⁶A con los fenotipos que se mostrarán a continuación.

Para evaluar los niveles globales de metilación m⁶A en ARNm se realizaron experimentos de *dot blot*. El análisis de *dot blot* para detectar los niveles totales de m⁶A en el ARNm es relativamente fácil, rápido y rentable en comparación con otros métodos, tales como la cromatografía en capa fina bidimensional y LC-MS / MS. Este enfoque se puede utilizar, de manera cualitativa, para evaluar los cambios temporales y espaciales en los niveles de m⁶A en diversos tejidos vegetales o plantas en diferentes etapas de desarrollo. Esta metodología es particularmente útil para un análisis exploratorio de los cambios en los niveles de m⁶A en las mutantes del complejo de metilación, antes de recurrir a investigaciones detalladas por otros enfoques complejos y cuantitativos.

Para realizar el ensayo de dot blot (Fig.10) se usó un anticuerpo dirigido contra m⁶A y ARNm de plantas de 18 días de edad del genotipo silvestre (WT), las mutantes *Ppmett13*, *Ppwatap*, *Ppmett13/Ppmett14a/Ppmett14b/Ppwatap* (Cuádruple mutante CM), como control positivo se usó ARNm de *A. thaliana* extraído de hoja de plantas adultas y como control negativo se utilizó ARN sintetizado *in vitro*. En este ensayo podemos observar señal positiva del anticuerpo en las muestras de ARNm de plantas de *P. patens* de 18 días y *A. thaliana*, la cual disminuye en los sitios donde se utilizó solo 40 ng de ARNm, demostrando la especificidad del anticuerpo y la sensibilidad de la técnica. Como se puede observar en la Fig. 10 la señal de m⁶A no se observa en las diferentes mutantes del complejo de metilación, así como en el control negativo de ARN sintético, indicando que la actividad de metiltransferasa se encuentra abatida en estas plantas. Estos datos indican que los genes *PpMETTL3* y *PpWTAP* son proteínas que participan en la metilación de ARNm y son, por lo tanto, proteínas homólogas a *AthMETTL3* y *AthWTAP* las cuales ya han sido caracterizadas en *A. thaliana* como la proteína catalítica y la proteína de andamiaje del complejo, respectivamente. Hace falta realizar una segunda réplica biológica de este experimento para corroborar lo propuesto.

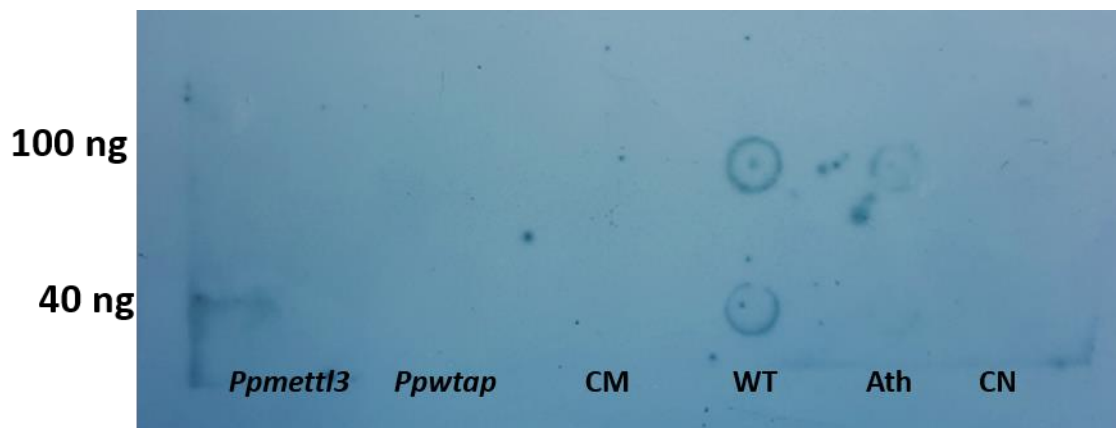


Figura 10. Análisis de dot blot demuestra una reducción en la metilación de ARNm en las distintas mutantes del complejo de metilación. Dot blot para detectar la señal de m⁶A en ARNm purificado de plantas de 18 días de edad de *Ppmett13*, *Ppwtap*, *Ppmett13/Ppmett14a/Ppmett14b/Ppwtap* (Cuadruple mutante, CM), WT, *A. thaliana* (Ath) y ARN sintético como control negativo (CN). Para cada uno de las muestras se utilizaron dos concentraciones 100 ng (superior) y 40 ng (inferior).

Análisis del desarrollo y crecimiento del protonema en los diferentes genotipos

Como se mencionó anteriormente, para hacer comparable la tasa de crecimiento y el desarrollo de las plantas, se aislaron protoplastos de los genotipos *Ppmett13*, *Ppwtap*, *Ppmett13/Ppmett14a/Ppmett14b/Ppwtap* y WT, a partir de los cuales se regeneraron y crecieron plantas durante 7 días. El seguimiento del crecimiento se realizó tomando fotografías de 60 plantas de cada genotipo, las que fueron analizadas con el *plugin* Macro de ImageJ, los resultados se muestran en la figura 11A. No se observan diferencias estadísticas significativas en el área ocupada por protonema entre los distintos genotipos, esto indica que la tasa del crecimiento del protonema no se ve afectada por la ausencia de las proteínas principales del complejo de metiltransferasa de m⁶A, al menos bajo estas condiciones. Por otro lado, se calculó también el índice de circularidad ya que es un parámetro indicativo de la dominancia apical en esta planta. La dominancia apical es el término usado para describir el control de la punta del brote sobre la excrecencia de la yema axilar, que para *P. patens* en este estado de desarrollo es en forma estrellada, lo cual se expresa como un índice de circularidad bajo (es decir alejado de 1) y refleja una alta dominancia apical. Como se observa en la figura

10B, el índice de circularidad de los diferentes genotipos mutantes es estadísticamente distinto al índice de circularidad de las plantas silvestres, sin embargo, como podemos observar el índice sigue manteniéndose bajo, por lo que lo consideramos un fenotipo leve. Los resultados anteriores sugieren que el desarrollo de protonema no se ve drásticamente afectado por la ausencia de las proteínas del complejo de metiltransferasa de m⁶A. Adicionalmente, analizando el perfil transcripcional de estos genes notamos que curiosamente los transcritos de estos genes se acumulan muy poco en protonema, por lo que probablemente estas proteínas no sean cruciales para el establecimiento y desarrollo del protonema, esto podría ayudar a explicar porque no observamos un fenotipo más dramático en las plantas mutantes del complejo de metilación en esta etapa del desarrollo.

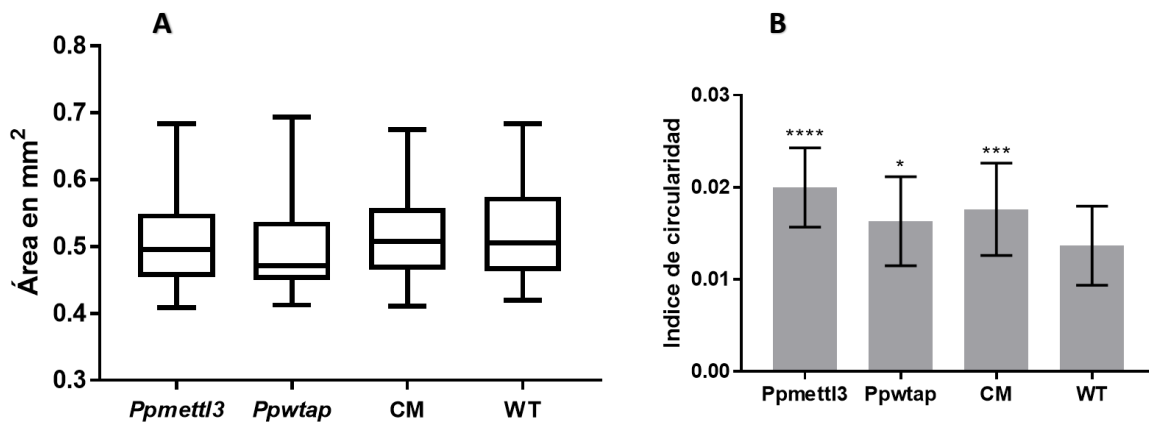


Figura 11. El desarrollo del protonema se ve ligeramente afectado en las diferentes mutantes. Se muestra el área (A) y la circularidad (B) de protonema después de 7 días de aislamiento de protoplastos. Para cada uno de los experimentos se realizaron tres réplicas biológicas independientes con una N=60 en cada una de las réplicas en la figura B se grafica el promedio y la desviación estándar. En el caso de ambas mediciones se calculó la significancia estadística usando un análisis de ANOVA de una variable con una $p < 0.05$. En el caso de las mediciones del área no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los diferentes genotipos, sin embargo, en el caso de las mediciones de circularidad todas las líneas mutantes presentan diferencias estadísticas significativas cuando se comparan con la línea silvestre. WT (silvestre) CM (cuádruple mutante).

Análisis del crecimiento y desarrollo de los brotes y filidios

El gametofito haploide de *P. patens* presenta distintos tipos de células pluripotentes, incluyendo las células apicales que se dividen en un simple plano para generar el protonema filamentoso, y las células de los brotes que se dividen en tres planos para generar los gametóforos (Fig. 12). Esta transición de un desarrollo filamentoso a uno triplanar ocurre progresivamente durante el ciclo de vida de *P. patens* y se cree que recapitula la evolución de las primeras plantas terrestres (Frank Margaret y Scanlon Michael 2015). Dada la profunda significancia evolutiva de esta etapa del desarrollo y debido a que implica una transición a otro estado del desarrollo, decidimos evaluar si los diferentes genotipos presentan un defecto en la formación de estas células. Para ello, se analizó protonema de 14 días crecido a partir de protoplastos obtenidos a partir de los genotipos *Ppmett13*, *Ppwtap*, *Ppmett13/Ppwtap/Ppmett14a/Ppmett14b* (CM) y WT. Se contabilizó el número de brotes axiales y estos fueron clasificados en tres categorías de acuerdo a su etapa de desarrollo: temprana, intermedia y tardía (fotos en anexos), bajo este enfoque se obtuvieron los resultados que se muestran en la Fig. 13A. Como se puede observar en primera instancia, las plantas mutantes presentan un menor número de brotes, comparados con plantas del tipo silvestre. Sin embargo, la clasificación del estado del desarrollo del brote en estados tempranos, intermedios y tardíos no es tan sencilla, ya que no es posible distinguir con claridad el número de células que conforman al brote, y por lo tanto es muy probable que existan sub-clasificaciones adicionales. Dicho lo anterior, decidimos analizar estas plantas en tiempos posteriores, en los cuales comienza la formación de los filidios (estructuras parecidas a hojas) a partir de los brotes y en los cuales es mucho más fácil observar diferencias.

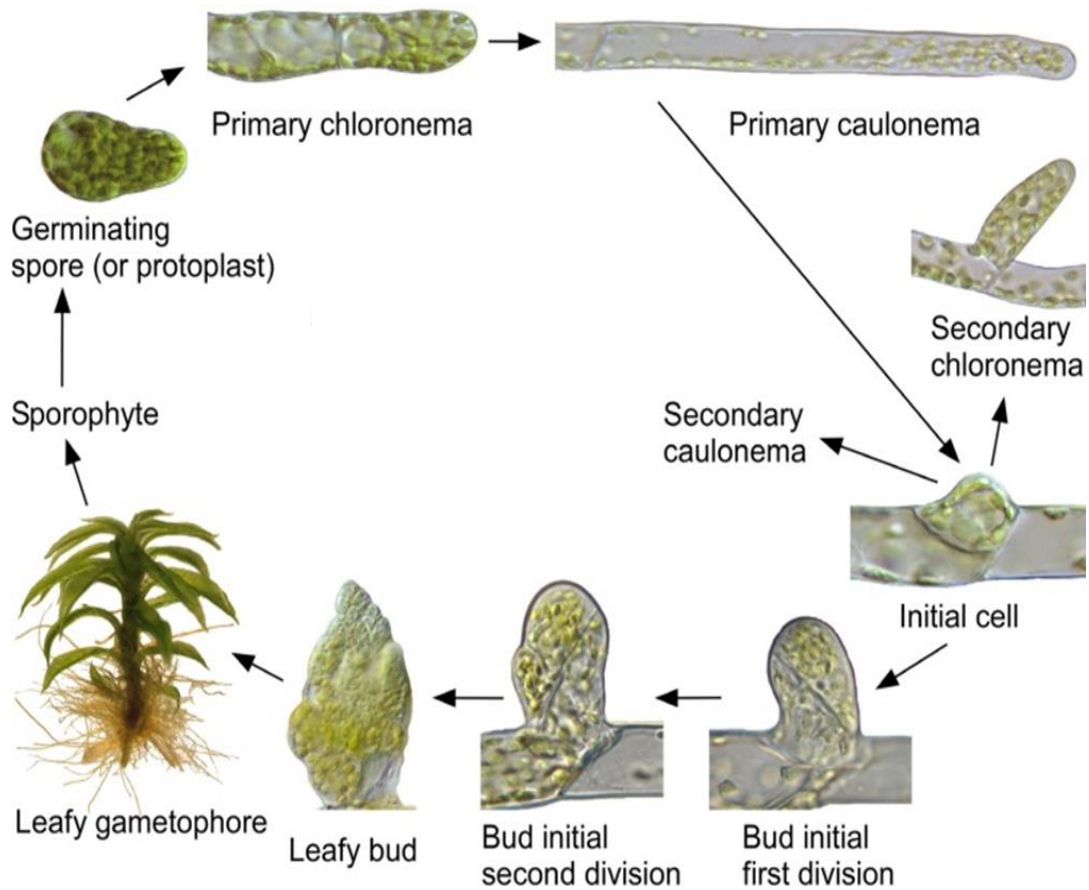


Figura 12. Representación esquemática del establecimiento del protonema y el desarrollo de los brotes. Inicialmente el protonema consiste en un solo tipo celular, llamado cloronema. Posteriormente, después de algunos días de crecimiento, pueden dar lugar a un nuevo tipo celular, llamado caulonema, en conjunto conocido como protonema. El 5% de las ramificaciones laterales del caulonema sub-apical pueden tener otro destino y formar un tipo celular pluripotente de división multiplanar conocido como brotes axiales de gametóforos (*buds* en la figura), marcando el inicio de la segunda etapa del desarrollo gametofítico llamado gametóforo (Cove *et al.* 2009)

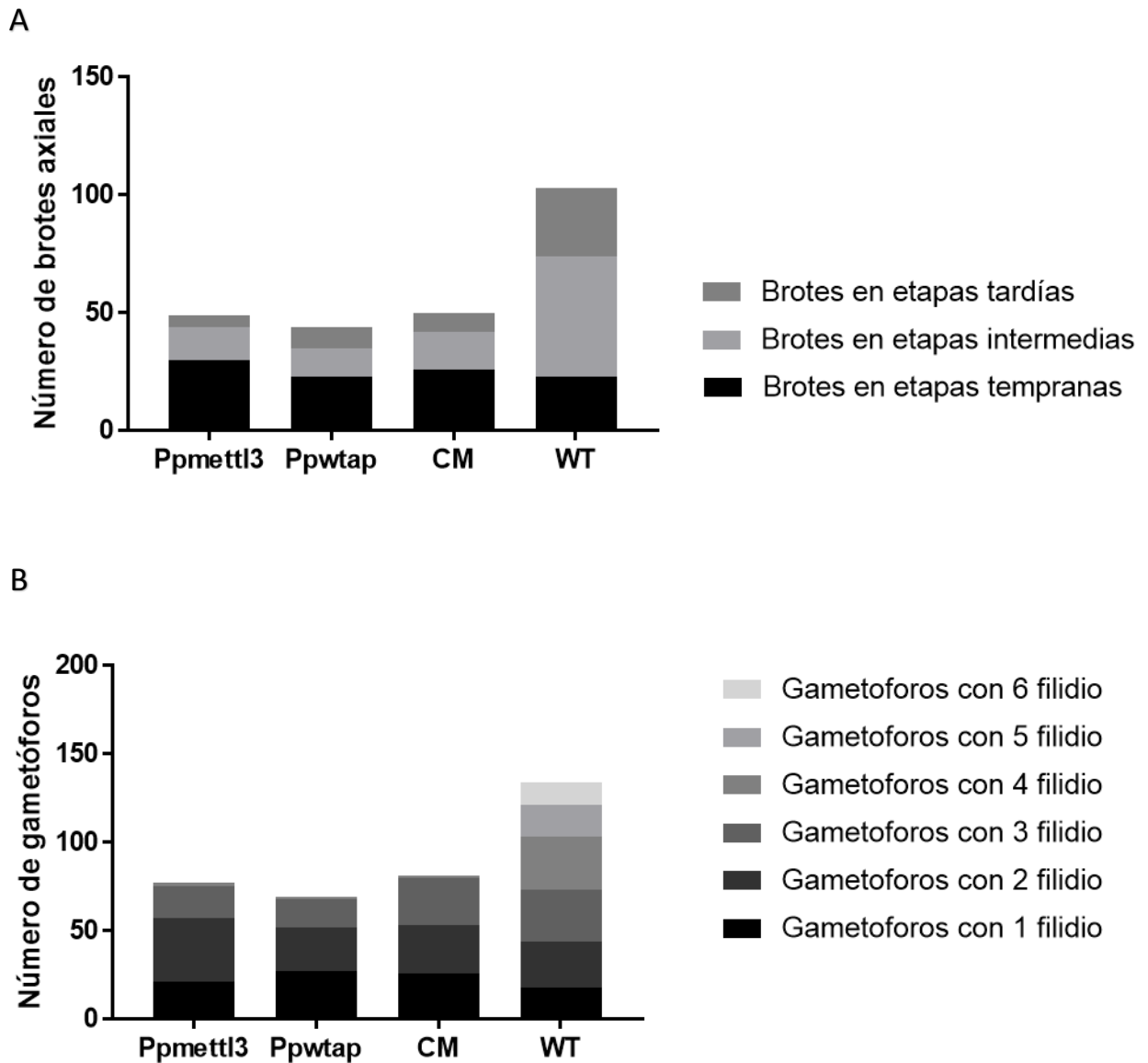


Figura 13. Análisis del conteo de brotes y filidios en los diferentes genotipos. Se muestra (A) el conteo de brotes axiales de 3 réplicas biológicas cada una con N=10 plantas de 14 días de edad y las distintas etapas de desarrollo observadas en las mutantes Ppmett13, Ppwtap, Ppmett13/Ppmett14a/Ppmett14b/Ppwtap (CM), así como el genotipo silvestre (WT). En la figura (B) se encuentra graficado el número de gametóforos y el número de filidios presentes por gametóforo. Para este análisis se realizaron 3 réplicas biológicas independientes con una N=30 plantas de 20 días de edad, crecidas a partir de protoplastos.

Como se puede observar en la Fig. 13B las diferentes plantas mutantes tienen un menor número de gametóforos comparados con el tipo silvestre. Además de esto, se puede apreciar también que los gametóforos de plantas mutantes están un estado de desarrollo más temprano ya que la mayoría de ellos presentan de 1 a 3 filidios, mientras que plantas del tipo silvestre presentan gametóforos tanto en etapas tempranas como tardías, es decir, gametóforos que contienen de 1 a 6 filidios. La presencia de gametóforos en etapas tempranas de desarrollo es algo normal en las plantas silvestres, ya que la planta se encuentra produciendo constantemente más brotes, a partir de los cuales se generan los futuros gametóforos. En conjunto, los datos de la figura 13 sugieren fuertemente que el menor número de brotes observados en las líneas mutantes se deben a un retraso en la aparición de brotes, que más adelante en el desarrollo se ve reflejado en un menor número de gametóforos, en etapas tempranas de desarrollo en las plantas mutantes, respecto a las plantas silvestres, que muestran mayor número de gametóforos con mayor número de filidios.

Se sabe por reportes previos, que existen varias mutantes de pérdida de función que están afectadas en el desarrollo de los gametóforos. El genoma de *P. patens* codifica para cuatro proteínas pertenecientes a la familia de factores de transcripción AP2, conocidos como APB1, APB2, APB3, APB4 por sus ortólogos en *A. thaliana* (*AINTEGUMENTA*, *PLETHORA*, *BABY BOOM*) y se sabe que estos genes son indispensables para la formación de los brotes, ya que la cuádruple mutante de los genes APBs en plantas de *P. patens* no forma gametóforos (Aoyama *et al.* 2012). Los cuatro genes APBs se expresan ampliamente en los brotes axiales de *P. patens* y su transcripción está regulada positivamente por auxina, al igual que con los ortólogos de *Arabidopsis*. Por otro lado, se sabe que la citocinina también induce la formación de los brotes (Saleh *et al.* 2011). La citocinina regula negativamente a un microRNA, PpMIR534a, que a su vez regula negativamente los transcritos PpBOP1/2, reguladores positivos de la formación de los brotes.

Debido a que la formación de los brotes axiales está regulada en gran medida por reguladores transcripcionales decidimos analizar la acumulación relativa del ARNm de YDA (YODA), DEK1 (Defective kernel 1), y APB1 los cuales son transcritos que tienden a acumularse en las células del brote axial, que por predicciones *in silico* en la base de datos

(lin.uestc.edu.cn/server/M6ATH) tienen una alta probabilidad de estar metilados y cuya función se ha reportado como relevante en el desarrollo de los brotes axiales. Para este análisis se aisló ARN de plantas de 18 días de edad (debido a la abundancia de brotes axiales presentes en este momento del desarrollo) de las mutantes *Ppmett13*, *Ppwtpap*, *Ppmett13/Ppwtpap/Ppmett14a/Ppmett14b* (CM) y de la planta silvestre (WT). A partir de este ARN se realizó la síntesis de cDNA, con el cual se realizaron los ensayos de qPCR. Como podemos observar en la Fig. 14, la acumulación de los transcritos de YDA, DEK1 y APB1 se ve disminuida en las diferentes mutantes, cuando se comparan con los niveles de acumulación de estos transcritos en las plantas silvestres. Dado estos resultados resulta interesante observar en las distintas plantas mutantes una disminución en los niveles de acumulación relativa de transcritos que son importantes para el desarrollo del brote axial, sin embargo hasta este punto no sabemos si la acumulación de estos transcritos está siendo regulada directamente por metilación o por un mecanismo de regulación río arriba de estos genes, por

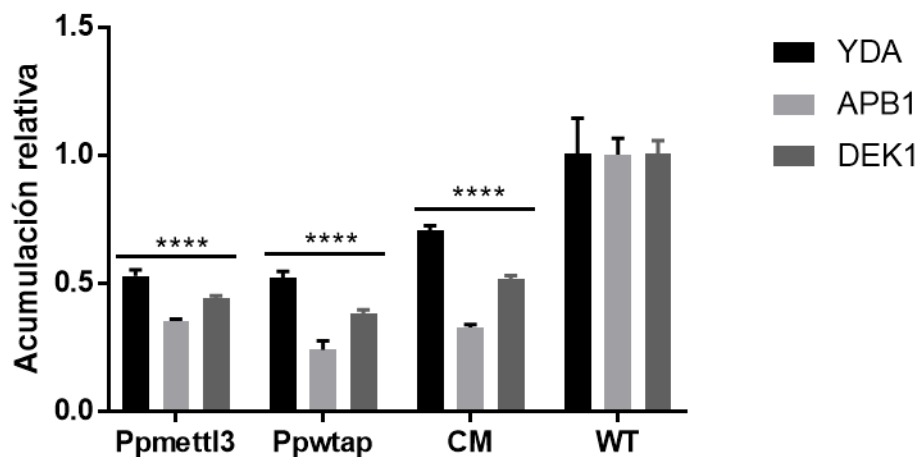


Figura 14. Acumulación relativa de algunos transcritos involucrados en el desarrollo de los brotes axiales. Se aisló ARN de plantas de 18 días de edad de las mutantes *Ppmett13*, *Ppwtpap*, *Ppmett13/Ppwtpap/Ppmett14a/Ppmett14b* (CM) y la planta silvestre (WT). Se utilizó UBI10 como gen de referencia interno. La abundancia es relativa a la acumulación de los transcritos en las plantas WT. Las barras de error representan la desviación estándar de dos réplicas biológicas con tres replicas técnicas. Se realizó un ANOVA múltiple y con una $p < 0.001$.

lo cual nuestro siguiente objetivo fue analizar si alguno de estos transcritos se encontraban metilados, para lo cual realizamos una inmunoprecipitación de ARN metilado, seguido de PCR punto final.

Para el ensayo de inmunoprecipitación se aisló ARN de plantas silvestres de 18 días de edad, posteriormente se purificó ARNm del cual se partió para la reacción de inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo específico anti-m⁶A. De esta manera se obtuvieron las fracciones de ARN metilado (m⁶A) y ARN no metilado (no-m⁶A), se llevó a cabo la síntesis de cDNA utilizando el ARNm del que se partió y las dos fracciones recuperadas de la reacción de inmunoprecipitación. Posteriormente se procedió a realizar las PCR punto final, para la cual se analizó el transcrito de actina, pues se sabe que es un transcrito que en otros organismos y en *A. thaliana* no se encuentra metilado. Como podemos observar en la Fig. 15 el transcrito de actina muestra una mayor señal en los carriles ARNm y no-m⁶A, y muestra una señal más debil en el carril de m⁶A. Sin embargo cuando analizamos la PCR del transcrito de YDA podemos observar que la señal se encuentra aumentada en la fracción metilada y se observa muy poca señal en la fracción no metilada, indicando la presencia de la metilación en el transcrito de YDA y sugiriendo la disminución de la acumulación de los transcritos de YDA en las diferentes mutantes se debe principalmente a la pérdida de la metilación en estos transcritos, indicando que la metilación es necesaria para la estabilidad de los transcritos de

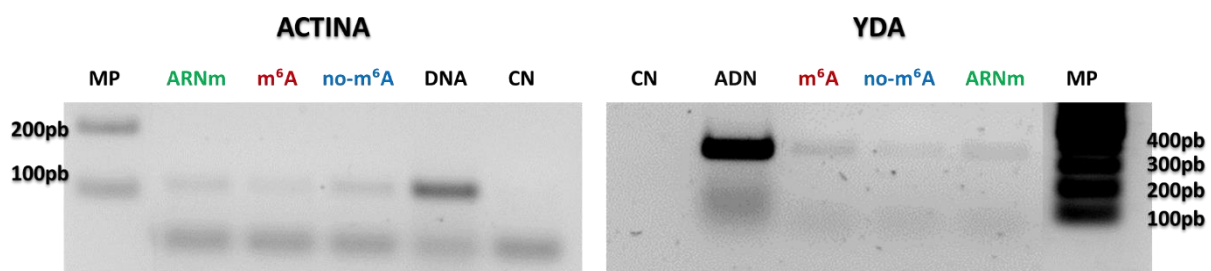


Figura 15. MeRIP-PCR. Gel de agarosa al 1% en el que se pueden observar los productos de amplificación de PCR de ACTINA y YDA, partiendo de diferentes templados. Control negativo (CN) DNA, m⁶A (representa la fracción metilada recuperada de la reacción de inmunoprecipitación) no-m⁶A (representa la fracción NO metilada recuperada de la reacción de inmunoprecipitación), ARNm del cual se partió para la reacción de inmunoprecipitación y MP (marcador de peso molecular).

YDA. Por otro lado, la PCR de los demás genes no se logró realizar debido a la poca cantidad de templado obtenido, por lo que es necesario realizar nuevamente este ensayo con la finalidad de analizar los transcritos de DEK1 y APB1, así como de replicar estos resultados.

Los resultados presentados sugieren que durante el desarrollo de los brotes axiales varios transcritos necesitan ser metilados, por lo que es necesario que la maquinaria de metilación se encuentre activa. Sin embargo, en el atlas de expresión presentado al inicio no se muestra como se encuentra la expresión génica en los brotes axiales, por ello, decidimos analizar un transcriptoma reportado de brotes axiales en el que se combinó la microdissección láser con secuenciación de siguiente generación para realizar un análisis transcriptómico de tipos celulares (Frank y Scanlon 2015). Analizando estos datos pudimos observar que los transcritos de PpWTAP y PpMETTL14A se encuentran sobrerrepresentados en brotes axiales comparados con caulonema, así como varios transcritos que codifican a proteínas con dominio YTH, las cuales son las proteínas con la capacidad de unirse a ARN metilado. Lo anterior es consistente con el hecho de que brotes axiales, la actividad de metilación de ARNm es relevante para el desarrollo de la planta.

Análisis del desarrollo del esporofito y esporas

Es importante remarcar en este punto que a diferencia de la mutante *Athmett13* en *A. thaliana* en la que casi todos los órganos se ven afectados, en las mutantes que hemos analizado de *P. patens* no se observan fenotipos dramáticos. Sin embargo, bajo la premisa de que existe una correlación entre los niveles de expresión del transcrito y los fenotipos a observar, entonces se esperaría observar fenotipos más drásticos en el desarrollo de la estructura esporofítica ya que es donde, de acuerdo con los datos de expresión, se encuentran los mayores niveles de acumulación de los transcritos de estos genes (Fig. 6). Adicionalmente, la etapa posterior a la fusión entre núcleos haploides de dos gametos y formación del cigoto diploide, podría ser comparada con la etapa de la formación del embrión en *Arabidopsis*, en la cual mutaciones nulas en *AthMETTL3* y en *AthWTAP* son letales; es decir, demuestran el fenotipo más fuerte. Dicho lo anterior decidimos analizar si los diferentes mutantes muestran un defecto en el desarrollo del esporangio y las esporas. Para ello se utilizaron plantas de *Ppmett13*, *Ppwtap*, *Ppmett13/Ppwtap/Ppmett14a/Ppmett14b* (CM) y plantas silvestres (WT), todas las plantas

tenían 45 días de edad y fueron crecidas sobre un sustrato de turba estéril a 25°C, con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. Posteriormente se transfirieron a condiciones de inducción de estructuras reproductivas (anteridios y arquegonios, 16 h de oscuridad/8 h luz y a 16 °C). Después de 45 días de crecimiento en estas condiciones los diferentes genotipos presentaron esporangios maduros que fueron usados para los siguientes análisis. El primer parámetro que se determinó fue el porcentaje de gametóforos con esporangio, el cual no mostró diferencias notorias entre los diferentes mutantes y tipo silvestre (Fig. 16A). Este parámetro nos refleja los eventos de fertilización que ocurrieron, por lo cual nuestros resultados sugieren que a este nivel los diferentes mutantes no muestran diferencias evidentes cuando son comparadas con el tipo silvestre. El siguiente parámetro que se analizó fue el estado de desarrollo de los esporangios (Fig. 16B). Para este segundo análisis se colectaron todos los esporangios, se observaron al estereoscopio y se clasificaron en 5 diferentes estados de desarrollo, siendo S1 el estado de desarrollo más temprano y SM esporangios maduros (las fotografías representativas de los diferentes estados de desarrollo se encuentran en Anexos). De esta manera, como podemos observar en la figura 16B, parece que existe un ligero retraso en el desarrollo de los esporangios, ya que el porcentaje de esporangios maduros es menor en las diferentes mutantes comparadas con el tipo silvestre. Estos resultados podría deberse a que hubo un retraso desde la etapa de desarrollo de los brotes axiales. Sin embargo, para compensar el posible retraso, las plantas se dejaron 15 días adicionales a los 30 días de crecimiento en condiciones normales, el período que se recomienda en la literatura (25°C 16 h luz/8h oscuridad). Como consecuencia, las plantas se encontraban todas en la misma etapa de desarrollo antes de iniciar la inducción de las estructuras reproductivas, por lo que consideramos que el retraso en el desarrollo de los esporangios es un fenotipo adicional y no es consecuencia de un efecto *a posteriori* del retraso en el desarrollo de los brotes axilares.

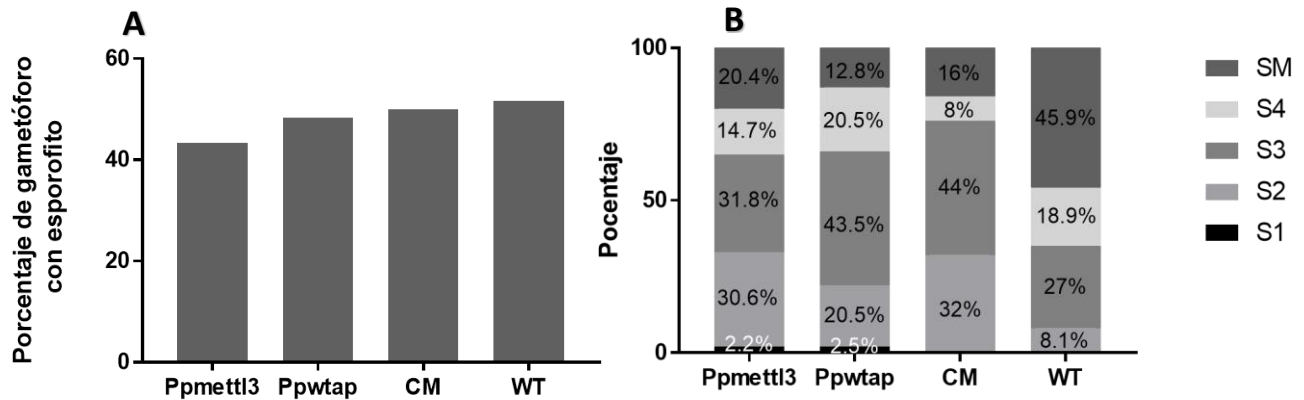


Figura 16. Análisis del esporofito en los diferentes genotipos. Se muestra (A) el porcentaje de gametóforos con esporangios para cada genotipo: *Ppmett13*, *Ppwatap*, *Ppmett13/Ppwatap/Ppmett14a/Ppmett14b* (CM) y plantas de tipo silvestre (WT) (n= 100 gametóforos al azar para cada una de las líneas). En la figura (B) se encuentra graficado el estado del desarrollo de todos los esporangios producidos por las plantas con diferentes genotipos, donde S1 es el estado de desarrollo más temprano, SM son los esporangios maduros y S2, S3 y S4 son los estados intermedios en orden ascendente.

Posteriormente se analizó el tamaño de las esporas provenientes de los esporangios SM para los diferentes genotipos y como podemos observar en las Fig. 17A y 17B todos los mutantes presentan una reducción en el tamaño y una afectación en la morfología de las esporas, comparados con el genotipo silvestre. También se realizó un análisis exploratorio por microscopía confocal multifotónica con la finalidad de observar con mayor resolución las diferencias morfológicas, para ello se analizaron esporas de plantas silvestres y esporas de la cuádruple mutante *Ppmett13/Ppwatap/Ppmett14a/Ppmett14b*. Como podemos observar en las Fig. 17C y 17D existen diferencias morfológicas muy notorias, además del tamaño de las esporas la forma que presentan las esporas de la cuádruple mutante es diferente a la forma esférica observada en las esporas del tipo silvestre. Sin embargo, este análisis solo se ha realizado una vez, por lo que es necesario realizar otra réplica y visualizar más esporas para poder afirmar que es realmente un fenotipo y no un artefacto del diseño del experimento.

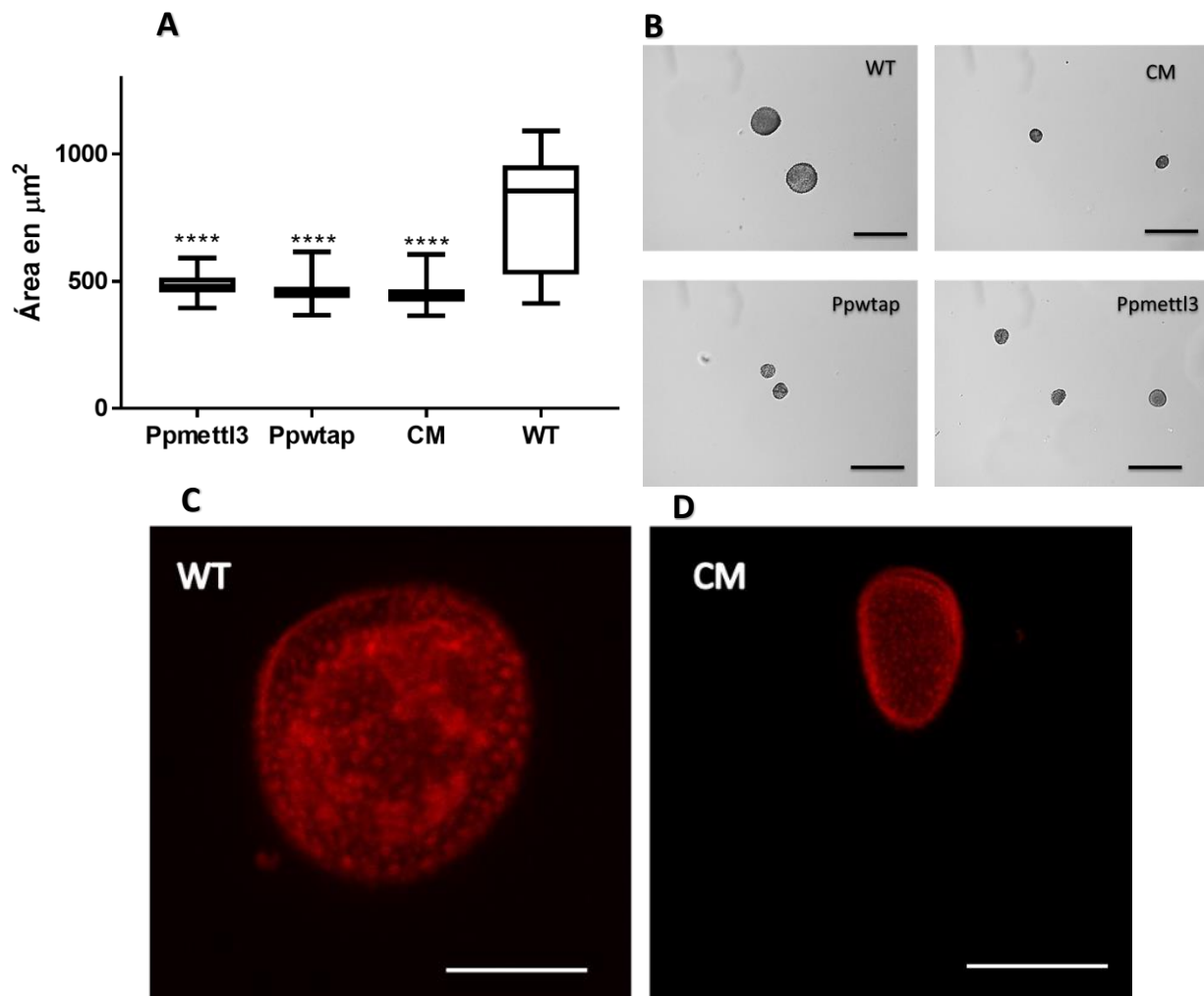


Figura 17. Análisis de los fenotipos observados en espora. En la figura (A) se encuentra graficado el tamaño de las esporas en μm^2 , los datos de este análisis provienen de 4 réplicas biológicas con una N=100 esporas que provenían de una mezcla de esporangios. En la figura (B) se muestran fotografías representativas de las esporas de los distintos genotipos, la escala de las barras es de 50 μm . En el panel C y D se muestran imágenes de microscopía confocal multifotónica de un ensayo exploratorio, en las que se puede observar con mayor claridad las diferencias morfológicas entre las esporas de la cuádruple mutante *Ppmett13/Ppwtap/Ppmett14a/Ppmett14b* y el tipo silvestre (WT), la escala de las barras es de 25 μm .

Por último, decidimos evaluar la viabilidad de las esporas de los diferentes genotipos, para ello las esporas liberadas a partir de esporangios individuales se sembraron en medio PpNH₄ suplementado con 10 mM de CaCl₂ y se colocaron en condiciones de fotoperiodo 16 h luz y 8 h oscuridad a 25 °C. Como podemos observar en la Fig. 18, ninguna de las esporas de los diferentes mutantes germinaron, mientras que las esporas de tipo silvestre si germinaron. Estos resultados sugieren fuertemente que es necesaria la actividad de los componentes del complejo de metiltransferasa para el desarrollo y viabilidad de las esporas. Sin embargo es necesario remarcar que los resultados mostrados en la Fig. 18 provienen de una sola réplica biológica, debido a que las dos últimas replicas biológicas no se obtuvieron resultados satisfactorios pues ninguna de las esporas de los diferentes genotipos germinaron, incluyendo al tipo silvestre, por lo cual estamos a la espera de que los colaboradores en Francia puedan replicar estos resultados. Dados estos inconvenientes, los resultados de la figura 18 son todavía preliminares y necesitan más soporte para ser concluyentes.

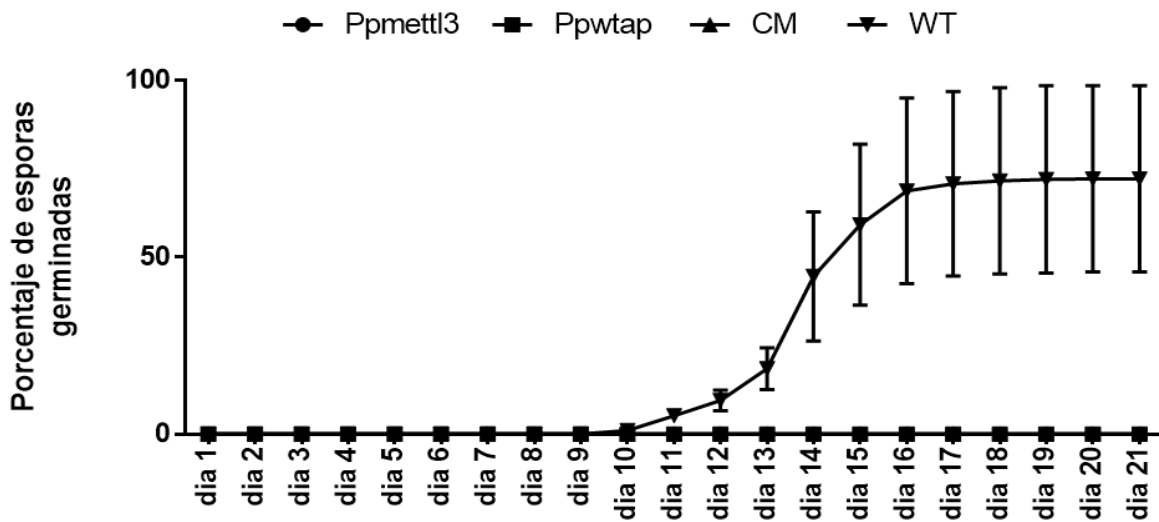


Figura 18. Eficiencia de germinación de las esporas de los diferentes mutantes. Para este análisis se utilizaron esporas de los diferentes mutantes y de tipo silvestre y se germinaron en medio PpNH₄ suplementado con 10 mM de CaCl₂. Se muestra el promedio para 3 réplicas técnicas independientes (N=800 esporas) por cada genotipo: Ppmett13, Ppwtap, Ppmett13/Ppmett14a/Ppmett14b/Ppwtap (CM) y el tipo silvestre WT. Las barras representan la desviación estándar para cada medición.

DISCUSIÓN

Sobre la conservación de la función del complejo de metilación.

Se ha reportado que el complejo multiprotéico que cataliza la reacción de metilación está formado principalmente por dos componentes: el heterodímero con actividad catalítica METTL3-METTL14, el cual cataliza la reacción de transferencia del grupo metilo desde la S-adenosilmetionina hacia la posición seis de la adenina y la proteína de andamiaje WTAP la cual se encarga del reconocimiento del ARN y de anclar al heterodímero en la secuencia consenso RRACH (Śledź y Jinek 2016, Wang, Doxtader y Nam 2016a, Wang *et al.* 2016b). En *A. thaliana* se ha reportado la presencia de METTL3, METTL14 y WTAP, también se ha reportado la participación de cada una de estas proteínas en la formación de m⁶A y como la ausencia de una de estas proteínas afecta los niveles de metilación (Zhong *et al.* 2008; Bodi *et al.* 2012; Shen *et al.* 2016). En este trabajo reportamos la presencia de los genes que codifican a METTL3, METTL14 y WTAP en el musgo *P. patens* y además comprobamos la participación de PpMETTL3 y PpWTAP en la formación de m⁶A, ya que en las mutantes nulas *Ppmettl3* y *Ppwatap* se observa reducida la señal de m⁶A en ARNm, lo que observamos en un ensayo de *dot blot* de ARNm con un anticuerpo que reconoce la metilación m⁶A. Por otra parte, es interesante observar que *P. patens* presenta dos genes que contienen una alta similitud de secuencia con AthMETTL14, a las que denominamos PpMETTL14A y PpMETTL14B. Sin embargo, hasta este punto no podemos discernir si las dos proteínas participan en la catálisis de metilación ya que ambas presentan patrones de expresión similares y aunado a esto no contamos con mutantes sencillas para estos genes. Por otro lado, en cuanto a su secuencia de aminoácidos a pesar de que las dos proteínas presentan el dominio de MTAsa característico de METTL14, presentan dominios diferentes hacia el extremo N terminal: mientras que PpMETTL14B presenta dos dominios de unión a ARN, PpMETTL14A presenta un dominio de la super familia Rho y un dominio de neuromodulina. Estos datos nos hacen pensar que tal vez no sean proteínas redundantes, sin embargo, es necesario un análisis más detallado para asegurarlo, por lo que actualmente estamos en el proceso de obtener las mutantes sencillas mediante CRISPR-Cas9 utilizando ARN guías específicos para cada uno de los genes.

La importancia del patrón de expresión de genes que codifican el complejo de metilación

Se conoce que en la mayoría de los casos un aumento en los niveles de expresión está relacionado con una necesidad funcional del producto del gen que se transcribe. Según los datos publicados en Affymetrix se sugiere que en *A. thaliana* los genes del complejo de metiltransferasa se expresan a bajos niveles en la mayoría de los tejidos (Craigon *et al.* 2004). En *A. thaliana* Zhong y colaboradores realizaron una fusión traduccional de *pAthMETTL3::AthMETTL3-GUS*, con la finalidad de observar los tejidos donde se encuentra más acumulada esta proteína, sus resultados muestran que esta proteína se encuentra acumulada a bajos niveles en la mayoría de los tejidos, pero también demostraron que existen sitios en los que la proteína se encontraba mayormente acumulada, como en granos de polen, durante el desarrollo de la semilla, en el óvulo antes de la fertilización, en el meristemo apical de las plántulas y en los primordios de las raíces laterales (Zhong *et al.* 2008). Estos datos de expresión se vuelven aún más interesantes cuando se analiza el fenotipo de las mutantes homocigotas de *Athmett13* y *Athwtap*, pues ambas presentan fenotipos de letalidad embrionaria: como se mencionó arriba, se observó un aumento en la acumulación de la señal de *Athmett13* en el embrión. Así mismo, cuando estas mutantes se complementan con la construcción *pABI3:AthMETTL3* o bien *pABI3:AthWTAP* y se logran obtener plantas homocigotas para estos genes, se observa una excesiva proliferación de células del meristemo apical del brote (SAM). Este hecho fue asociado con una pérdida de metilación en los transcritos *WUSCHEL (WUS)* y *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*, dicha pérdida de m⁶A afecta su vida media haciéndolos más estables desplazando el equilibrio del meristemo hacia proliferación, de manera que estas plantas no desarrollan órganos aéreos (Shen *et al.* 2016). De manera similar a los hallazgos en *A. thaliana*, se observa que los genes *PpMETTL3*, *PpWTAP*, *PpMETTL14A* y *PpMETTL4B*, se expresan a bajos niveles en la mayoría de los tejidos de la planta, sin embargo, existen ciertas etapas en las cuales la acumulación de los transcritos que codifican a estas proteínas aumenta, como durante el desarrollo los brotes axiales, del esporofito y en la espora madura. De manera interesante, estas etapas de desarrollo son en las que encontramos los fenotipos más evidentes, como el retraso en la formación de los

brotos axiales, el retraso en el desarrollo de los esporofitos y una reducción en el tamaño y morfología de las esporas.

La importancia de un crecimiento en tres dimensiones y la participación de la metilación de ARNm en este proceso.

Uno de los eventos más importantes en la historia de la vida en la tierra fue la colonización del ambiente terrestre por las plantas. Esta transición coincidió y probablemente fue posible gracias a la evolución del crecimiento tridimensional (3D). Hoy en día, las diversas morfologías exhibidas en la biosfera terrestre surgen a partir de la regulación diferencial de los procesos de crecimiento 3D durante el desarrollo (Aoyama *et al.* 2012). En muchas plantas, el crecimiento 3D se inicia durante las primeras divisiones del cigoto y, por lo tanto, el estudio de los factores genéticos involucrados en este proceso se complica porque las mutantes no sobreviven (Moody *et al.* 2018). Sin embargo, en *P. patens*, que es un musgo representante de las plantas terrestres más antiguas, el crecimiento de brotes axiales en 3D está precedido por una fase filamentosa 2D que puede mantenerse indefinidamente (Harrison *et al.* 2009). Además de ser una etapa sumamente importante desde el punto de vista evolutivo, la transición de un crecimiento bidimensional del protonema hacia el desarrollo en tres dimensiones de los brotes axiales, ésta etapa representa una transición en el desarrollo de *P. patens* y por lo tanto es necesario que en esta etapa se lleven a cabo una serie de ajustes metabólicos para adquirir la identidad de brote axial, el cual se ha reportado presenta una actividad tipo meristemática (Kofuji y Hasebe 2014). En el análisis realizado en este estudio se observó que existe un menor número de brotes axiales en las diferentes mutantes analizadas comparadas con el tipo silvestre y además se comprobó que este fenotipo se debe a un retraso en el desarrollo de los mismos, ya que al analizarse el estado del desarrollo de los gametóforos se puede observar que los gametóforos de las plantas mutantes se encuentran en estados de desarrollo tempranos comparados con los del tipo silvestre. De manera interesante, demostramos que en las plantas mutantes de 18 días de edad, la cual es una etapa en la que encontramos una mayor cantidad de brotes axiales, existe una reducción en los niveles de acumulación de algunos transcritos involucrados en la formación y desarrollo de los brotes axiales como: YDA, DEK1 y APB1. Así mismo, observamos que en las plantas del tipo silvestre

el ARNm de YDA se encontraba metilado, lo cual indica que muy probablemente la metilación sea necesaria para otorgarle estabilidad a estos transcritos que son importantes para la formación y desarrollo de los brotes axiales. Sin embargo, la reducción en los niveles de acumulación de estos transcritos puede deberse también a un efecto múltiple en el que estén participando reguladores de la transcripción en un nivel de regulación río arriba. Se ha reportado que la formación de los brotes axiales es regulada mediante auxinas y citocininas, por lo cual sería interesante analizar el efecto de auxinas y citocininas exógenas sobre el desarrollo de los brotes axiales en las plantas mutantes.

La importancia de la alternancia de generaciones y la participación de la metilación de ARN en este proceso.

Un ciclo de vida con dos generaciones multicelulares (*i.e.* esporofito y gametofito) es una autapomorfía (un carácter derivado único para una especie o un grupo) de las embriofitas (Graham y Wilcox, 2000). La interacción entre estas dos etapas de ciclo de vida multicelulares, o alternancia de generaciones, ha sufrido modificaciones a través de la evolución de las plantas terrestres: en las plantas no vasculares el gametofito haploide es predominante mientras que el esporofito diploide es menos prominente y depende nutricionalmente del gametofito. Por el contrario, en las plantas vasculares el esporofito es la etapa dominante y a través de la evolución existe evidencia de la disminución progresiva del desarrollo del gametofito (Kenrick y Crane, 1997; Graham y Wilcox, 2000). Existen diferentes teorías acerca del surgimiento de la alternancia de generaciones en las plantas (Graham y Wilcox, 2000; Kenrick y Crane, 1997), y uno de sus aspectos más intrigantes es que dos planes corporales morfológicamente distintos son generados a partir de un mismo genoma, fenómeno que se ha relacionado directamente con la expresión diferencial de genes durante el desarrollo (Ambrose y Ferrándiz, 2012). Algunos estudios han demostrado que existen diferencias en los transcriptomas de los gametofitos femenino (Yu *et al.*, 2005) y masculino (Pina *et al.*, 2005) con respecto a los transcriptomas del esporofito en *Arabidopsis*. En cuanto a *P. patens*, se realizó un análisis de microarreglos de una colección muy amplia de esporofitos de diferentes etapas de desarrollo, así como de las primeras etapas del desarrollo del gametofito, los datos presentados en este trabajo indican que los cambios más significativos en el perfil

transcripcional ocurren durante la transición de gametófito a esporofito, con más del 12% de todo el transcriptoma de *P. patens* alterado durante esta importante transición de desarrollo. Además, el análisis de los conjuntos de genes que contribuyen a estas diferencias respalda la opinión de que el esporofito depende energética y nutricionalmente del gametofito (O'Donoghue *et al.* 2013). Todos estos datos remarcan la importancia de la regulación transcripcional en el desarrollo de la etapa esporofítica, por lo cual fue considerada desde el inicio de este proyecto como una etapa de sumo interés para analizar el efecto que origina la pérdida de metilación de ARNm en el desarrollo del esporofito *in planta*. Como lo indican nuestros resultados de la Fig. 16B, el desarrollo de los esporangios se ve retrasado, teniendo un menor porcentaje de esporangios maduros en las diferentes líneas mutantes del complejo de metilación, también posteriormente se demostró que existe una reducción en el tamaño y la morfología de las esporas de estas mutantes. A pesar de que aún no ha sido posible replicar los resultados de la germinación de las esporas es muy probable que este proceso también se vea afectado, puesto que representa una etapa transicional muy importante en la que la planta pasa de un estado latente, metabólicamente poco activo a un estado de proliferación metabólicamente muy activo. Además, sabemos que los transcritos de todos los genes de la maquinaria de metilación se acumulan abundantemente en la espora, lo cual sugiere que la modificación m⁶A es importante en la regulación genética del proceso de germinación o incluso etapas previas a la germinación, ya que es necesario que exista un recambio rápido y adecuado para poder transicionar de una a otra etapa de desarrollo. Por otro lado, existen diferentes razones que podrían explicar por que no se pudo lograr la germinación de las esporas: Los expertos en el tema nos comentaron que el tipo de agar, la concentración de cloruro de calcio, la luz, la temperatura y la forma en la que se almacenan las esporas influyen significativamente sobre la germinación, por lo que se planea estandarizar las condiciones para el análisis de la germinación de las esporas.

La importancia de la metilación m⁶A en las transiciones de desarrollo de los organismos multicelulares.

Estudios genéticos de pérdida de función del complejo de metiltransferasa de m⁶A, de las proteínas de unión a m⁶A y de las desmetilasas de m⁶A, han definido un rol crítico para la modificación m⁶A en el control de la expresión génica en varios procesos fisiológicos (Roignant y Soller 2017). Sin embargo, todavía no está completamente claro cómo es que m⁶A afecta la expresión y que beneficios obtienen las células y los organismos de este nivel de regulación adicional. Basándose en las observaciones que se tienen hasta el momento sobre los mecanismos moleculares por los cuales la modificación m⁶A impacta en el metabolismo del ARN, se propone que la principal función de m⁶A es facilitar las transiciones metabólicas que implican un recambio completo o casi completo del transcriptoma. Tal función de m⁶A de facilitar las transiciones a nivel transcriptómico tiene sentido biológico para las células que necesitan no solo reaccionar rápidamente a las señales de desarrollo durante la diferenciación celular, sino que también necesitan adaptarse a los cambios ambientales.

Por ejemplo, la meiosis en la levadura es inducida por inanición. Aunque el estrés por inanición generalmente reduce la expresión génica, los transcritos meioticos evaden esta respuesta al presentar la modificación m⁶A, la cual facilita la traducción de estos transcritos (Bodi *et al.* 2015). A pesar de que se conocía que existe una reducción en los niveles de expresión génica y que solo ciertos transcritos se lograban traducir, no se conocía el mecanismo por el cual se generaba esta selección, ahora con estos datos se propone que la modificación m⁶A lleva a degradación los transcritos que no son necesarios en ese momento y favorece la traducción de los que son necesarios para la meiosis, facilitando de esta manera los cambios metabólicos necesarios para que las células puedan responder ante este estímulo. Lo que aún no se conoce es, si ambos tipos de transcritos presentan la modificación m⁶A y como es el mecanismo de reconocimiento que permite que unos se transcriban y otros se degraden. Hasta el momento se ha propuesto que el reconocimiento diferencial de m⁶A por diferentes proteínas con dominio YTH puede ayudar explicar los destinos específicos de los transcritos.

Este es uno de los muchos ejemplos que se han descrito; también sabemos de la importancia de esta modificación para facilitar procesos importantes de desarrollo como la transición

zigótica materna (MTZ) en el pez cebra (Zhao *et al.* 2017b), en la determinación sexual de la mosca de la fruta (Hausmann *et al.* 2016b), en la inactivación del cromosoma X en humanos (Patil *et al.* 2016), en el desarrollo embrionario en *A. thaliana* (Zhong *et al.* 2008), entre otros.

Bajo el esquema anterior es importante remarcar que las etapas de desarrollo afectadas en *P. patens* tanto en brotes axiales como en el desarrollo de la espora son transiciones de desarrollo que implican un recambio transcriptómico masivo, en el cual la modificación m⁶A podría estar facilitando estas transiciones y debido a que en las plantas mutantes del complejo de metiltransferasa esta abatida la señal de m⁶A, las transiciones metabólicas son más lentas y es muy probable que por esto las diferentes mutantes no logran adecuarse y presenten un retraso en su desarrollo. Sin embargo, será necesario un análisis más detallado en el que se incluyan las complementaciones genéticas de estas mutantes (con la finalidad de descartar un potencial efecto debido a la posible presencia de *off targets* obtenidos por la edición realizada con CRISPR-Cas9); un análisis de la localización tisular y subcelular de estas proteínas, así como también incluir el análisis de las proteínas de unión a m⁶A ya que a diferencia de *A. thaliana* que presenta 13 miembros de la familia YTH en *P. patens* solo se han encontrado 4 (Scutenaire *et al.* 2018), por lo cual el análisis se vuelve menos complejo.

Las funciones biológicas para esta enigmática modificación m⁶A están surgiendo a través de análisis más mecanicistas que revelan una estrategia conservada para afinar la expresión génica. Sin embargo, queda mucho por aprender antes de que podamos entender cómo la regulación de la adición cotranscripcional de la modificación m⁶A se instruye dinámicamente, cómo m⁶A afecta los eventos de procesamiento de ARNm río abajo y cómo la pérdida de esta regulación se traduce en defectos del desarrollo de los organismos.

CONCLUSIONES

- Los genes de *Physcomitrella patens* que codifican para las proteínas principales del complejo de metiltransferasa de m⁶A se expresan predominantemente durante desarrollo del esporofito y en la espora madura.
- Las mutaciones generadas por CRISPR/Cas9 en los genes que codifican a las proteínas principales del complejo de metiltransferasa de m⁶A resultan en transcritos con un codón de paro prematuro que no se acumulan y por lo tanto no se traducen, como consecuencia las plantas mutantes para estos genes presentan niveles reducidos de metilación.
- La actividad de las proteínas principales del complejo de metiltransferasa no es necesaria para el establecimiento y desarrollo del protonema, pero sí para la formación de brotes axiales, el desarrollo de los cuales es más lento en las mutantes en comparación con el tipo silvestre, así mismo se logró demostrar que existe una disminución en la acumulación de ciertos transcritos que son importantes para el desarrollo de estas estructuras en las plantas mutantes.
- Se demostró la importancia de la actividad de estas proteínas en la formación y desarrollo de las esporas, las cuales en las mutantes *Ppmett13*, *Ppwtpap* y *Ppmett13/Ppmett14a/Ppmett14b/Ppwtpap* (CM) muestran el fenotipo más evidente al tener un área reducida y una morfología diferente.

PERSPECTIVAS

- Generar las mutantes sencillas para los genes PpMETTL14A Y PpMETTL14B y determinar la participación de cada una en la catálisis de metilación.
- Realizar la complementación de los genes *METTL3* Y *WTAP* en las mutantes *Ppmettl3* y *Ppwtap*, respectivamente, para asegurarnos de que los efectos que observamos se deben a las mutaciones en estas proteínas y no a un posible *off target*.
- Analizar la localización de alguna de las proteínas del complejo de metilación, con la finalidad de delimitar el momento en el que ocurre el retraso en las transiciones estudiadas.
- Estandarizar las condiciones de la germinación de las esporas para determinar en las distintas mutantes: *Ppmettl3*, *Ppwtap* y *Ppmettl3/Ppmettl14a/Ppmettl14b/Ppwtap* (CM) en esta etapa del ciclo de vida de *P. patens*.
- Incluir en el análisis a las proteínas de *P. patens* de la familia YTH y determinar su participación en la formación y desarrollo de los brotes, así como en el desarrollo de las esporas.
- Identificar los transcritos que presentan la modificación m⁶A en cada una de las etapas afectadas por las mutaciones en la maquinaria de metilación de m⁶A, para conocer su participación en los distintos procesos celulares implicados.

REFERENCIAS

- Agarwala, S. D., H. G. Blitzblau, A. Hochwagen & G. R. Fink (2012) RNA Methylation by the MIS Complex Regulates a Cell Fate Decision in Yeast. *PLOS Genetics*, 8, e1002732.
- Aguzzi, A. & M. Altmeyer (2016) Phase Separation: Linking Cellular Compartmentalization to Disease. *Trends in Cell Biology*, 26, 547-558.
- Alarcon, C. R., H. Lee, H. Goodarzi, N. Halberg & S. F. Tavazoie (2015) N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, 519, 482-485.
- Alarcón, C. R., H. Goodarzi, H. Lee, X. Liu, S. Tavazoie & S. F. Tavazoie (2015) HNRNPA2B1 is a mediator of m(6)A-dependent nuclear RNA processing events. *Cell*, 162, 1299-1308.
- Alemu, E. A., C. He & A. Klungland (2016) ALKBHs-facilitated RNA modifications and de-modifications. *DNA repair*, 44, 87-91.
- Aoyama, T., Y. Hiwatashi, M. Shigyo, R. Kofuji, M. Kubo, M. Ito & M. Hasebe (2012) AP2-type transcription factors determine stem cell identity in the moss *Physcomitrella patens*. *Development*, 139, 3120.
- Beemon, K. & J. Keith (1977) Localization of N6-methyladenosine in the Rous sarcoma virus genome. *Journal of Molecular Biology*, 113, 165-179.
- Bodi, Z., J. D. Button, D. Grierson & R. G. Fray (2010) Yeast targets for mRNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 38, 5327-5335.
- Bodi, Z., S. Zhong, S. Mehra, J. Song, N. Graham, H. Li, S. May & R. G. Fray (2012) Adenosine Methylation in Arabidopsis mRNA is Associated with the 3' End and Reduced Levels Cause Developmental Defects. *Frontiers in plant science*, 3, 48.
- Bodi Z, Bottley A, Archer N, May ST, Fray RG (2015) Yeast m6A Methylated mRNAs Are Enriched on Translating Ribosomes during Meiosis, and under Rapamycin Treatment. *PLOS ONE* 10(7): e0132090.
- Bokar, J. A., M. E. Rath-Shambaugh, R. Ludwiczak, P. Narayan & F. Rottman (1994) Characterization and partial purification of mRNA N6-adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei. Internal mRNA methylation requires a multisubunit complex. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 17697-17704.
- Bokar, J. A., M. E. Shambaugh, D. Polayes, A. G. Matera & F. M. Rottman (1997) Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N6-adenosine)-methyltransferase. *RNA*, 3, 1233-1247.
- Bowman, J. L., S. K. Floyd & K. Sakakibara (2007) Green Genes—Comparative Genomics of the Green Branch of Life. *Cell*, 129, 229-234.
- Cove D.J. (1992) Regulation of Development in the Moss, *Physcomitrella patens*. In: *Development*. Springer, Berlin, Heidelberg
- Cove, D., M. Bezanilla, P. Harries & R. Quatrano (2006) MOSES AS MODEL SYSTEMS FOR THE STUDY OF METABOLISM AND DEVELOPMENT. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 497-520.

Cove, D. J., P.-F. Perroud, A. J. Charron, S. F. McDaniel, A. Khandelwal & R. S. Quatrano (2009) The Moss *Physcomitrella patens*: A Novel Model System for Plant Development and Genomic Studies. Cold Spring Harbor Protocols, 2009, pdb.emo115.

Craigon, D.J., James, N., Okyere, J., Higgins, J., Jotham, J., and May, S. (2004). NASCArrays: A repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service. *Nucleic Acids Res.* 32: 575–577.

Deng, X., K. Chen, G.-Z. Luo, X. Weng, Q. Ji, T. Zhou & C. He (2015) Widespread occurrence of N(6)-methyladenosine in bacterial mRNA. *Nucleic Acids Research*, 43, 6557-6567.

Desrosiers, R., K. Friderici & F. Rottman (1974) Identification of Methylated Nucleosides in Messenger RNA from Novikoff Hepatoma Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 3971-3975.

Dominissini, D., S. Moshitch-Moshkovitz, S. Schwartz, M. Salmon-Divon, L. Ungar, S. Osenberg, K. Cesarkas, J. Jacob-Hirsch, N. Amariglio, M. Kupiec, R. Sorek & G. Rechavi (2012) Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, 485, 201-206.

Du, T., S. Rao, L. Wu, N. Ye, Z. Liu, H. Hu, J. Xiu, Y. Shen & Q. Xu An association study of the m6A genes with major depressive disorder in Chinese Han population. *Journal of Affective Disorders*, 183, 279-286.

Frank Margaret, H. & J. Scanlon Michael (2015) Cell-specific transcriptomic analyses of three-dimensional shoot development in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal*, 83, 743-751.

Fu, Y., G. Jia, X. Pang, R. N. Wang, X. Wang, C. J. Li, S. Smemo, Q. Dai, K. A. Bailey, M. A. Nobrega, K.-L. Han, Q. Cui & C. He (2013) FTO-mediated formation of N6-hydroxymethyladenosine and N6-formyladenosine in mammalian RNA. 4, 1798.

Geula, S., S. Moshitch-Moshkovitz, D. Dominissini, A. A. Mansour, N. Kol, M. Salmon-Divon, V. Hershkovitz, E. Peer, N. Mor, Y. S. Manor, M. S. Ben-Haim, E. Eyal, S. Yunger, Y. Pinto, D. A. Jaitin, S. Viukov, Y. Rais, V. Krupalnik, E. Chomsky, M. Zerbib, I. Maza, Y. Rechavi, R. Massarwa, S. Hanna, I. Amit, E. Y. Levanon, N. Amariglio, N. Stern-Ginossar, N. Novershtern, G. Rechavi & J. H. Hanna (2015) m6A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science*, 347, 1002.

Graham, L. K. & L. W. Wilcox (2000) The origin of alternation of generations in land plants: a focus on matrotrophy and hexose transport. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355, 757-767.

Grimanelli, D. & F. Roudier. 2013. Chapter Six - Epigenetics and Development in Plants: Green Light to Convergent Innovations. In *Current Topics in Developmental Biology*, ed. E. Heard, 189-222. Academic Press.

Harper, J. E., S. M. Miceli, R. J. Roberts & J. L. Manley (1990) Sequence specificity of the human mRNA N6-adenosine methylase in vitro. *Nucleic Acids Research*, 18, 5735-5741.

Harrison, C.J., Roeder, A.H., Meyerowitz, E.M., and Langdale, J.A. (2009). Local cues and asymmetric cell divisions underpin body plan transitions in the moss *Physcomitrella patens*. *Curr. Biol.* 19, 461–471.

Hausmann, I. U., Z. Bodi, E. Sanchez-Moran, N. P. Mongan, N. Archer, R. G. Fray & M. Soller (2016a) m6A potentiates Sxl alternative pre-mRNA splicing for robust *Drosophila* sex determination. *Nature*.

Hausmann, I. U., Z. Bodi, E. Sanchez-Moran, N. P. Mongan, N. Archer, R. G. Fray & M. Soller (2016) m6A potentiates Sxl alternative pre-mRNA splicing for robust *Drosophila* sex determination. *Nature*, 540, 301-304.

Hess, M. E., S. Hess, K. D. Meyer, L. A. W. Verhagen, L. Koch, H. S. Bronneke, M. O. Dietrich, S. D. Jordan, Y. Saletore, O. Elemento, B. F. Belgardt, T. Franz, T. L. Horvath, U. Ruther, S. R. Jaffrey, P. Kloppenburg & J. C. Bruning (2013) The fat mass and obesity associated gene (*Fto*) regulates activity of the dopaminergic midbrain circuitry. *Nat Neurosci*, 16, 1042-1048.

Hongay, C. F. & T. L. Orr-Weaver (2011) *Drosophila* Inducer of MEiosis 4 (*IME4*) is required for Notch signaling during oogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 14855-14860.

Horiuchi, K., T. Kawamura, H. Iwanari, R. Ohashi, M. Naito, T. Kodama & T. Hamakubo (2013) Identification of Wilms' Tumor 1-associating Protein Complex and Its Role in Alternative Splicing and the Cell Cycle. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 33292-33302.

Horowitz, S., A. Horowitz, T. W. Nilsen, T. W. Munns & F. M. Rottman (1984) Mapping of N6-methyladenosine residues in bovine prolactin mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81, 5667-5671.

Jain, S., Joshua R. Wheeler, Robert W. Walters, A. Agrawal, A. Barsic & R. Parker (2016) ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure. *Cell*, 164, 487-498.

Jia, G., Y. Fu, X. Zhao, Q. Dai, G. Zheng, Y. Yang, C. Yi, T. Lindahl, T. Pan, Y.-G. Yang & C. He (2011) N(6)-Methyladenosine in Nuclear RNA is a Major Substrate of the Obesity-Associated FTO. *Nature chemical biology*, 7, 885-887.

Kato, M., Tina W. Han, S. Xie, K. Shi, X. Du, Leeju C. Wu, H. Mirzaei, Elizabeth J. Goldsmith, J. Longgood, J. Pei, Nick V. Grishin, Douglas E. Frantz, Jay W. Schneider, S. Chen, L. Li, Michael R. Sawaya, D. Eisenberg, R. Tycko & Steven L. McKnight (2012) Cell-free Formation of RNA Granules: Low Complexity Sequence Domains Form Dynamic Fibers within Hydrogels. *Cell*, 149, 753-767.

Kennedy, E. M., H. P. Bogerd, A. V. R. Kornepati, D. Kang, D. Ghoshal, J. B. Marshall, B. C. Poling, K. Tsai, N. S. Gokhale, S. M. Horner & B. R. Cullen (2016) Post-transcriptional m(6)A editing of HIV-1 mRNAs enhances viral gene expression. *Cell host & microbe*, 19, 675-685.

Kofuji, R., and Hasebe, M. (2014). Eight types of stem cells in the life cycle of the moss *Physcomitrella patens*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 17, 13–21.

Konig, J., K. Zarnack, G. Rot, T. Curk, M. Kayikci, B. Zupan, D. J. Turner, N. M. Luscombe & J. Ule (2010) iCLIP reveals the function of hnRNP particles in splicing at individual nucleotide resolution. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 909-915.

Kowalak, J. A., J. J. Dalluge, J. A. McCloskey & K. O. Stetter (1994) The Role of Posttranscriptional Modification in Stabilization of Transfer RNA from Hyperthermophiles. *Biochemistry*, 33, 7869-7876.

Landberg, K., E. R. A. Pederson, T. Viaene, B. Bozorg, J. Friml, H. Jönsson, M. Thelander & E. Sundberg (2013) The Moss *Physcomitrella patens* Reproductive Organ Development Is Highly Organized, Affected by the Two SHI/STY Genes and by the Level of Active Auxin in the SHI/STY Expression Domain. *Plant Physiology*, 162, 1406-1419.

Lence, T., J. Akhtar, M. Bayer, K. Schmid, L. Spindler, C. H. Ho, N. Kreim, M. A. Andrade-Navarro, B. Poeck, M. Helm & J.-Y. Roignant (2016) m6A modulates neuronal functions and sex determination in *Drosophila*. *Nature*, 540, 242-247.

Lewis, J. D., R. R. Meehan, W. J. Henzel, I. Maurer-Fogy, P. Jeppesen, F. Klein & A. Bird (1992) Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to Methylated DNA. *Cell*, 69, 905-914.

Lin, S., J. Choe, P. Du, R. Triboulet & R. I. Gregory (2016) METTL3 promotes translation in human cancer cells. *Molecular cell*, 62, 335-345.

Linder, B., A. V. Grozhik, A. O. Olarerin-George, C. Meydan, C. E. Mason & S. R. Jaffrey (2015) Single-nucleotide resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome. *Nature methods*, 12, 767-772.

Liu, J., Y. Yue, D. Han, X. Wang, Y. Fu, L. Zhang, G. Jia, M. Yu, Z. Lu, X. Deng, Q. Dai, W. Chen & C. He (2014) A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N(6)-adenosine methylation. *Nature chemical biology*, 10, 93-95.

Liu, N., Q. Dai, G. Zheng, C. He, M. Parisien & T. Pan (2015) N(6)-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*, 518, 560-564.

Luo, G.-Z., A. MacQueen, G. Zheng, H. Duan, L. C. Dore, Z. Lu, J. Liu, K. Chen, G. Jia, J. Bergelson & C. He (2014) Unique Features of the m(6)A Methylome in *Arabidopsis thaliana*. *Nature communications*, 5, 5630-5630.

Luo, S. & L. Tong (2014) Molecular basis for the recognition of methylated adenines in RNA by the eukaryotic YTH domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 13834-13839.

Machnicka, M. A., K. Milanowska, O. Osman Oglou, E. Purta, M. Kurkowska, A. Olchowik, W. Januszewski, S. Kalinowski, S. Dunin-Horkawicz, K. M. Rother, M. Helm, J. M. Bujnicki & H. Grosjean (2013) MODOMICS: a database of RNA modification pathways—2013 update. *Nucleic Acids Research*, 41, D262-D267.

Martinez, F. J., G. A. Pratt, E. L. Van Nostrand, R. Batra, S. C. Huelga, K. Kapeli, P. Freese, S. J. Chun, K. Ling, C. Gelboin-Burkhart, L. Fijany, H. C. Wang, J. K. Nussbacher, S. M. Broski, H. J. Kim, R. Lardelli, B. Sundararaman, J. P. Donohue, A. Javaherian, J. Lykke-Andersen, S. Finkbeiner, C. F. Bennett, M. Ares Jr, C. B. Burge, J. P. Taylor, F. Rigo & G. W. Yeo (2016) Protein-RNA Networks Regulated by Normal and ALS-Associated Mutant HNRNPA2B1 in the Nervous System. *Neuron*, 92, 780-795.

Mauer, J., X. Luo, A. Blanjoie, X. Jiao, A. V. Grozhik, D. P. Patil, B. Linder, B. F. Pickering, J.-J. Vasseur, Q. Chen, S. S. Gross, O. Elemento, F. Debart, M. Kiledjian & S. R. Jaffrey (2017) Reversible methylation of m6Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature*, 541, 371-375.

Mer, W. C., G. Alan & M. Bernard (1976) 5'-Terminal and internal methylated nucleotide sequences in HeLa cell mRNA. *Biochemistry*, 15 397–401.

Meyer, K. D. & S. R. Jaffrey (2014) The dynamic epitranscriptome: N6-methyladenosine and gene expression control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 313-326.

Meyer, K. D. & S. R. Jaffrey (2016) Rethinking m6A Readers, Writers, and Erasers. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*.

Meyer, Kate D., Y. Saletore, P. Zumbo, O. Elemento, Christopher E. Mason & Samie R. Jaffrey (2012) Comprehensive Analysis of mRNA Methylation Reveals Enrichment in 3' UTRs and near Stop Codons. *Cell*, 149, 1635-1646.

Mishler, B. D. (2001) The biology of bryophytes—bryophytes aren't just small tracheophytes. *American Journal of Botany*, 88, 2129-2131.

Moody, L. A., Kelly, S., Rabbinowitsch, E., & Langdale, J. A. (2018). Genetic Regulation of the 2D to 3D Growth Transition in the Moss *Physcomitrella patens*. *Current Biology*, 28(3), 473–478.e5.

Narayan, P., R. L. Ludwiczak, E. C. Goodwin & F. M. Rottman (1994) Context effects on N6-adenosine methylation sites in prolactin mRNA. *Nucleic Acids Research*, 22, 419-426.

Narayan, P. & F. M. Rottman (1988) An in vitro system for accurate methylation of internal adenosine residues in messenger RNA. *Science*, 242, 1159.

Nichols, J. L. (1979) N6-methyladenosine in maize poly(A)-containing RNA. *Plant Science Letters*, 15, 357-361.

O'Donoghue, M.-T., Chater, C., Wallace, S., Gray, J. E., Beerling, D. J., & Fleming, A. J. (2013). Genome-wide transcriptomic analysis of the sporophyte of the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany*, 64(12), 3567–3581.

Ortiz-Ramírez, C., M. Hernandez-Coronado, A. Thamm, B. Catarino, M. Wang, L. Dolan, José A. Feijó & Jörg D. Becker (2016) A Transcriptome Atlas of *Physcomitrella patens* Provides Insights into the Evolution and Development of Land Plants. *Molecular Plant*, 9, 205-220.

Patil, D. P., C.-K. Chen, B. F. Pickering, A. Chow, C. Jackson, M. Guttman & S. R. Jaffrey (2016) m(6)A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 537, 369-373.

Pawson, T. & J. D. Scott (2005) Protein phosphorylation in signaling – 50 years and counting. *Trends in Biochemical Sciences*, 30, 286-290.

Pendleton, K. E., B. Chen, K. Liu, O. V. Hunter, Y. Xie, B. P. Tu & N. K. Conrad (2017) The U6 snRNA m6A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention. *Cell*, 169, 824-835.e14.

Pikaard, C. S. & O. Mittelsten Scheid (2014) Epigenetic Regulation in Plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6, a019315.

Ping, X.-L., B.-F. Sun, L. Wang, W. Xiao, X. Yang, W.-J. Wang, S. Adhikari, Y. Shi, Y. Lv, Y.-S. Chen, X. Zhao, A. Li, Y. Yang, U. Dahal, X.-M. Lou, X. Liu, J. Huang, W.-P. Yuan, X.-F. Zhu, T. Cheng, Y.-L. Zhao, X. Wang,

J. M. R. Danielsen, F. Liu & Y.-G. Yang (2014) Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res*, 24, 177-189.

Roignant, J.-Y., & Soller, M. (2017). m6A in mRNA: An Ancient Mechanism for Fine-Tuning Gene Expression. *Trends in Genetics*, 33(6), 380–390.

Roundtree, I. A., G.-Z. Luo, Z. Zhang, X. Wang, T. Zhou, Y. Cui, J. Sha, X. Huang, L. Guerrero, P. Xie, E. He, B. Shen & C. He (2017) YTHDC1 Mediates Nuclear Export of N6-methyladenosine Methylated mRNAs. *eLife*, 6, e31311.

Saleh, O., N. Issman, I. Seumel Gotelinde, R. Stav, A. Samach, R. Reski, W. Frank & T. Arazi (2011) MicroRNA534a control of BLADE-ON-PETIOLE 1 and 2 mediates juvenile-to-adult gametophyte transition in *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal*, 65, 661-674.

Schaefer, D. G. & J.-P. Zryd (2001) The Moss *Physcomitrella patens*, Now and Then. *Plant Physiology*, 127, 1430.

Schwartz, S., M. R. Mumbach, M. Jovanovic, T. Wang, K. Maciag, G. G. Bushkin, P. Mertins, D. Ter-Ovanesyan, N. Habib, D. Cacchiarelli, N. E. Sanjana, E. Freinkman, M. E. Pacold, R. Satija, T. S. Mikkelsen, N. Hacohen, F. Zhang, S. A. Carr, E. S. Lander & A. Regev (2014) Perturbation of m6A writers reveals two distinct classes of mRNA methylation at internal and 5' sites. *Cell reports*, 8, 284-296.

Scutenaire J, Deragon JM, Jean V, Benhamed M, Raynaud C, Favory JJ, Merret R, Bousquet-Antonelli C. 2018. The YTH domain protein ECT2 is an m6A reader required for normal trichome branching in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 30, 986–1005.

Shen, L., Z. Liang, X. Gu, Y. Chen, Zhi Wei N. Teo, X. Hou, Weiling M. Cai, Peter C. Dedon, L. Liu & H. Yu (2016) N6-Methyladenosine RNA Modification Regulates Shoot Stem Cell Fate in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 38, 186-200.

Shimba, S., J. A. Bokar, F. Rottman & R. Reddy (1995) Accurate and efficient N-6-adenosine methylation in spliceosomal U6 small nuclear RNA by HeLa cell extract in vitro. *Nucleic Acids Research*, 23, 2421-2426.

Śledź, P. & M. Jinek (2016) Structural insights into the molecular mechanism of the m6A writer complex. *eLife*, 5, e18434.

Slobodin, B., R. Han, V. Calderone, J. A. F. O. Vrieling, F. Loayza-Puch, R. Elkon & R. Agami (2017) Transcription Impacts the Efficiency of mRNA Translation via Co-transcriptional N6-adenosine Methylation. *Cell*, 169, 326-337.e12.

Stoilov, P., I. Rafalska & S. Stamm (2002) YTH: a new domain in nuclear proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 27, 495-497.

Tanabe, A., K. Tanikawa, M. Tsunetomi, K. Takai, H. Ikeda, J. Konno, T. Torigoe, H. Maeda, G. Kutomi, K. Okita, M. Mori & H. Sahara (2016) RNA helicase YTHDC2 promotes cancer metastasis via the enhancement of the efficiency by which HIF-1 α mRNA is translated. *Cancer Letters*, 376, 34-42.

- Theler, D., C. Dominguez, M. Blatter, J. Boudet & F. H. T. Allain (2014) Solution structure of the YTH domain in complex with N6-methyladenosine RNA: a reader of methylated RNA. *Nucleic Acids Research*, 42, 13911-13919.
- Tirumuru, N., B. S. Zhao, W. Lu, Z. Lu, C. He & L. Wu (2016) N6-methyladenosine of HIV-1 RNA regulates viral infection and HIV-1 Gag protein expression. *eLife*, 5, e15528.
- Utsch, B., A. Kaya, A. Özburun, M. J. Lentze, N. Albers & M. Ludwig (2003) Exclusion of WTAP and HOXA13 as candidate genes for isolated hypospadias. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 37, 498-501.
- Wang, P., K. A. Doxtader & Y. Nam (2016a) Structural basis for cooperative function of Mettl3 and Mettl14 methyltransferases. *Molecular cell*, 63, 306-317.
- Wang, X., J. Feng, Y. Xue, Z. Guan, D. Zhang, Z. Liu, Z. Gong, Q. Wang, J. Huang, C. Tang, T. Zou & P. Yin (2016b) Structural basis of N6-adenosine methylation by the METTL3–METTL14 complex. *Nature*, 534, 575-578.
- Wang, X., Z. Lu, A. Gomez, G. C. Hon, Y. Yue, D. Han, Y. Fu, M. Parisien, Q. Dai, G. Jia, B. Ren, T. Pan & C. He (2014) N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 505, 117-120.
- Wang, X., B. S. Zhao, I. A. Roundtree, Z. Lu, D. Han, H. Ma, X. Weng, K. Chen, H. Shi & C. He (2015) N(6)-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell*, 161, 1388-1399.
- Wickett, N. J., S. Mirarab, N. Nguyen, T. Warnow, E. Carpenter, N. Matasci, S. Ayyampalayam, M. S. Barker, J. G. Burleigh, M. A. Gitzendanner, B. R. Ruhfel, E. Wafula, J. P. Der, S. W. Graham, S. Mathews, M. Melkonian, D. E. Soltis, P. S. Soltis, N. W. Miles, C. J. Rothfels, L. Pokornyy, A. J. Shaw, L. DeGironimo, D. W. Stevenson, B. Surek, J. C. Villarreal, B. Roure, H. Philippe, C. W. dePamphilis, T. Chen, M. K. Deyholos, R. S. Baucom, T. M. Kutchan, M. M. Augustin, J. Wang, Y. Zhang, Z. Tian, Z. Yan, X. Wu, X. Sun, G. K.-S. Wong & J. Leebens-Mack (2014) Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, E4859-E4868.
- Xiao, W., S. Adhikari, U. Dahal, Y.-S. Chen, Y.-J. Hao, B.-F. Sun, H.-Y. Sun, A. Li, X.-L. Ping, W.-Y. Lai, X. Wang, H.-L. Ma, C.-M. Huang, Y. Yang, N. Huang, G.-B. Jiang, H.-L. Wang, Q. Zhou, X.-J. Wang, Y.-L. Zhao & Y.-G. Yang (2016) Nuclear m6A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Molecular Cell*, 61, 507-519.
- Wan, Y., K. Tang, D. Zhang, S. Xie, X. Zhu, Z. Wang & Z. Lang (2015) Transcriptome-wide high-throughput deep m(6)A-seq reveals unique differential m(6)A methylation patterns between three organs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology*, 16, 272.
- Wu, B., L. Li, Y. Huang, J. Ma & J. Min (2017) Readers, writers and erasers of N6-methylated adenosine modification. *Current Opinion in Structural Biology*, 47, 67-76.
- Xu, C., X. Wang, K. Liu, I. A. Roundtree, W. Tempel, Y. Li, Z. Lu, C. He & J. Min (2014) Structural basis for selective binding of m6A RNA by the YTHDC1 YTH domain. *Nat Chem Biol*, 10, 927-929.

Yue, Y., J. Liu, X. Cui, J. Cao, G. Luo, Z. Zhang, T. Cheng, M. Gao, X. Shu, H. Ma, F. Wang, X. Wang, B. Shen, Y. Wang, X. Feng, C. He & J. Liu (2018) VIRMA mediates preferential m6A mRNA methylation in 3' UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell Discovery*, 4, 10.

Zhang, C., D. Samanta, H. Lu, J. W. Bullen, H. Zhang, I. Chen, X. He & G. L. Semenza (2016) Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m(6)A-demethylation of NANOG mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, E2047-E2056.

Zhang, Z., D. Theler, K. H. Kaminska, M. Hiller, P. de la Grange, R. Pudimat, I. Rafalska, B. Heinrich, J. M. Bujnicki, F. H. T. Allain & S. Stamm (2010) The YTH Domain Is a Novel RNA Binding Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 14701-14710.

Zhao, B. S., I. A. Roundtree & C. He (2017a) Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18, 31-42.

Zhao, B. S., X. Wang, A. V. Beadell, Z. Lu, H. Shi, A. Kuuspalu, R. K. Ho & C. He (2017b) m6A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature*, 542, 475-478.

Zheng, G., John A. Dahl, Y. Niu, P. Fedorcsak, C.-M. Huang, Charles J. Li, Cathrine B. Vågbø, Y. Shi, W.-L. Wang, S.-H. Song, Z. Lu, Ralph P. G. Bosmans, Q. Dai, Y.-J. Hao, X. Yang, W.-M. Zhao, W.-M. Tong, X.-J. Wang, F. Bogdan, K. Furu, Y. Fu, G. Jia, X. Zhao, J. Liu, Hans E. Krokan, A. Klungland, Y.-G. Yang & C. He (2013) ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility. *Molecular Cell*, 49, 18-29.

Zhong, S., H. Li, Z. Bodi, J. Button, L. Vespa, M. Herzog & R. G. Fray (2008) MTA Is an Arabidopsis Messenger RNA Adenosine Methylase and Interacts with a Homolog of a Sex-Specific Splicing Factor. *The Plant Cell*, 20, 1278-1288.

ANEXOS

Medio PpNH4

- Solución B: 10 ml
- Solución C: 10 ml
- Solución D: 10 ml
- Elementos traza 1 ml
- 8 g de agar
- Agua destilada a 1 L

Si es necesario agregar tartrato de amonio bibásico antes de esterilizar se pesan 920 mg (5 mM = 920 mg/l)

Esterilizar por autoclave

Agregar CaCl_2 a una concentración final de 1 mM inmediatamente antes de vertir en las placas. El CaCl_2 puede mantenerse como una solución madre de 1M (esterilizada en autoclave).

Solución B:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 25 g
H₂O destilada a 1 l

Esterilizar por autoclave

Solución C:

KH_2PO_4 25 g
H₂O destilada a 0.5 l

Ajustar el pH a 6.5 con
KOH 5 M

Llevar a 1 l

Esterilizar por autoclave

Solución D:

KNO_3 101 g
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.25 g

H₂O destilada a 1 l

Elementos traza:

H_3BO_3	614 mg	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	389 mg
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	110 mg	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	55 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	55 mg	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	55 mg
KBr	28 mg	KI	28 mg
LiCl	28 mg	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	28 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25 mg	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	59 mg

Disolver en 1 l de H₂O

Medio PRMB (protoplast regeneration medium – bottom layer)

- Solución B: 10 ml
- Solución C: 10 ml
- Solución D: 10 ml
- Elementos traza 1 ml
- D- manitol 60 g
- Tartrato de amonio dibasico 920 mg (=5mM)
- 10 g de agar
- Agua destilada a 1 L

Esterilizar por autoclave

Agregar 10 ml de CaCl_2 a 1 M inmediatamente antes de vertir en las placas. El CaCl_2 puede mantenerse como una solución madre de 1M (esterilizada en autoclave).

Medio PRMT (protoplast regeneration medium – top layer)

- Solución B: 10 ml
- Solución C: 10 ml
- Solución D: 10 ml
- Elementos traza 1 ml
- D- manitol 80 g
- Tartrato de amonio dibasico 920 mg (=5mM)
- 6 g de agar
- Agua destilada a 1 L

Esterilizar por autoclave

Agregar 10 ml de CaCl_2 1 M inmediatamente antes de vertir en las placas. El CaCl_2 puede mantenerse como una solución madre de 1M (esterilizada en autoclave).

Driselasa 0.5%

Para preparar Driselasa 0.5% primero es necesario tener la solución de Driselasa 2%

Ejemplo: 1 g de Driselasa se disuelve en 50 ml de una solución de manitol 8.5%

- Agitar gentilmente por 15 min a temperatura ambiente
- Colocar a 4 °C por 30 min
- Centrifugar a 2500 g por 10 min
- Esterilizar filtrando en una malla de 0.22 micras, en una campana de flujo laminar

Para tener una solución 0.5% diluir una parte de la Driselasa 2% con 3 partes de manitol 8.5%

Solución Protoplast Wash

Para preparar 100 ml mezclar 1 ml de CaCl₂ con 99 ml de D-manitol 8.5%

REACTIVOS PARA EL DOT BLOT

Wash Buffer

- 1x PBS
- 0.02% Tween-20

Blocking Buffer

- 1x PBS
- 0.02% Tween-20
- Leche descremada en polvo 5%

Antibody Dilution Buffer

- 1x PBS
- 0.02% Tween-20
- Leche 5%
- Anticuerpo de preferencia

REACTIVOS PARA MeRIP

Buffer IP 5X

- 0.5 ml de TRIS HCl (pH 7.4) 1 M
- 1.5 ml de NaCl 5 M
- 0.5 ml de igepal CA-630 10% (V/V)
- Llevar a 10 ml con agua libre de RNAsas

Buffer IP 1X

- Tomar dos mililitros del buffer IP 5X y llevar a 10 ml con agua libre de RNAsas

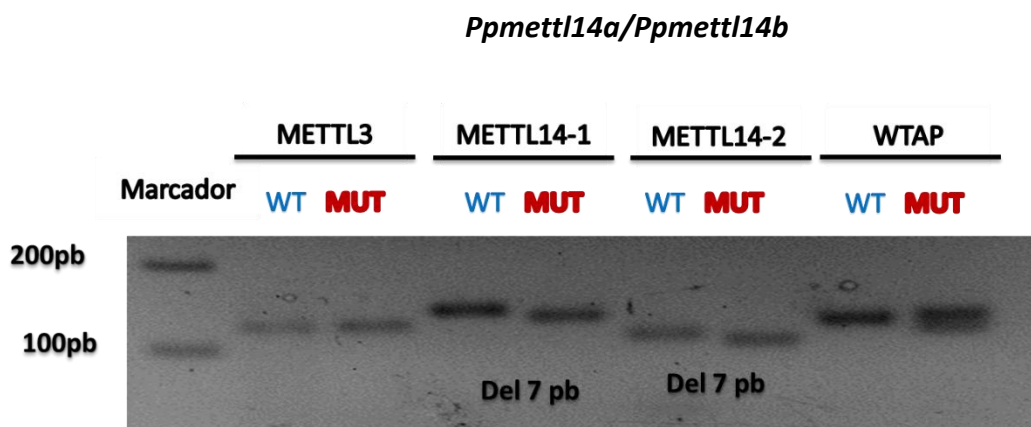
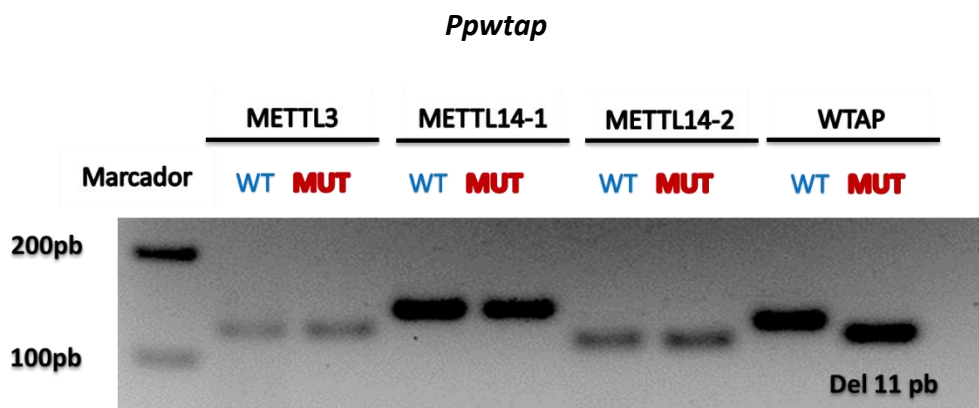
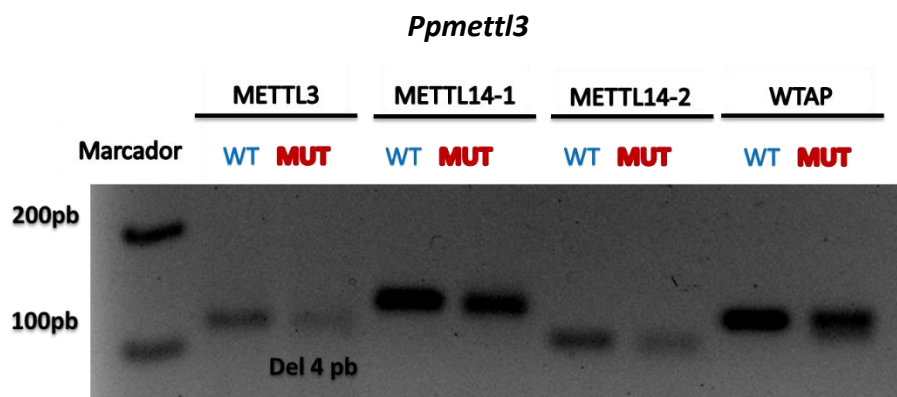
Buffer de elución

- 90 µl de buffer IP 5X
- 150 µl de m⁶A 20 mM
- 7 µl de inhibidor de RNAsas
- 203 µl de agua libre de RNAsas

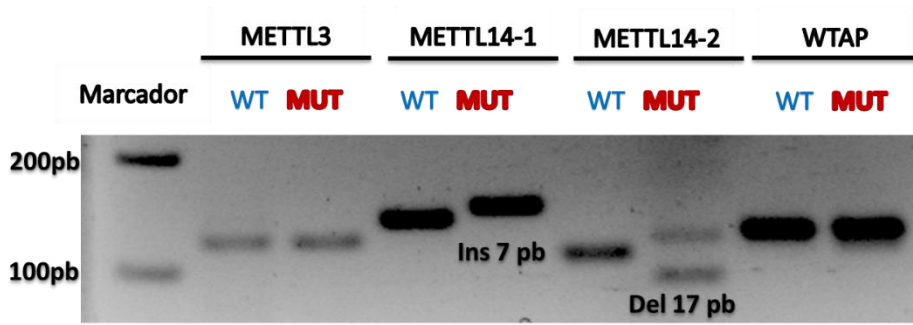
Para preparar la solución de m⁶A:

Disolver 10 mg de m⁶A en 1.3 ml de agua libre de RNAsas. Hacer alícuotas de 150 µl y guardar a -20 grados.

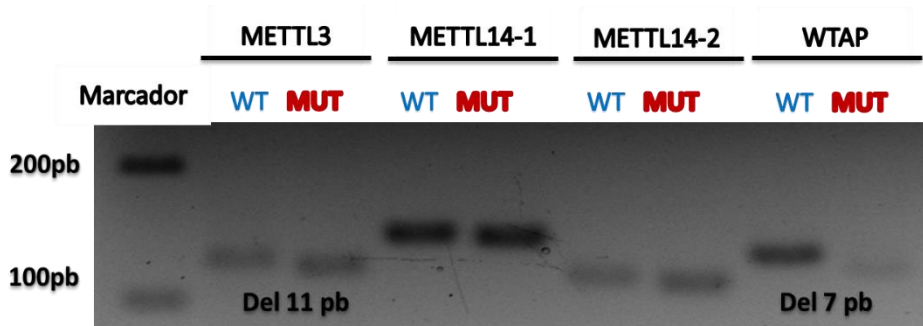
ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES EN CADA UNO DE LOS GENES DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE METILTRANSFERASA EN LOS DIFERENTES MUTANTES



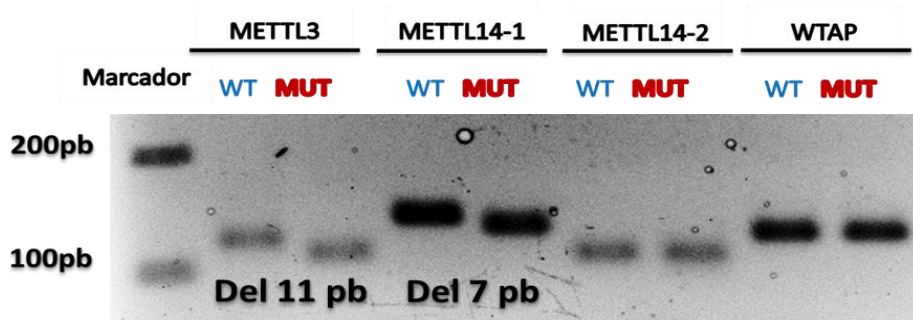
Ppmettl14b/Ppmettl14a



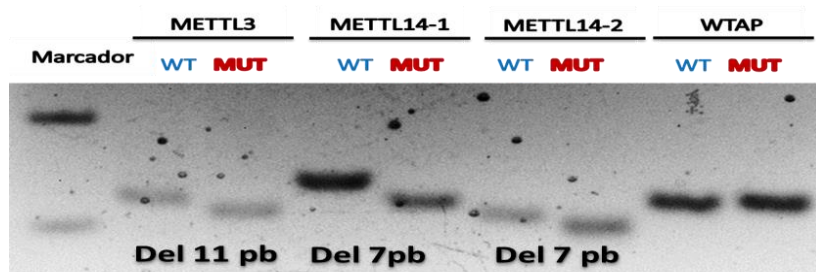
Ppmettl3/Ppwtap



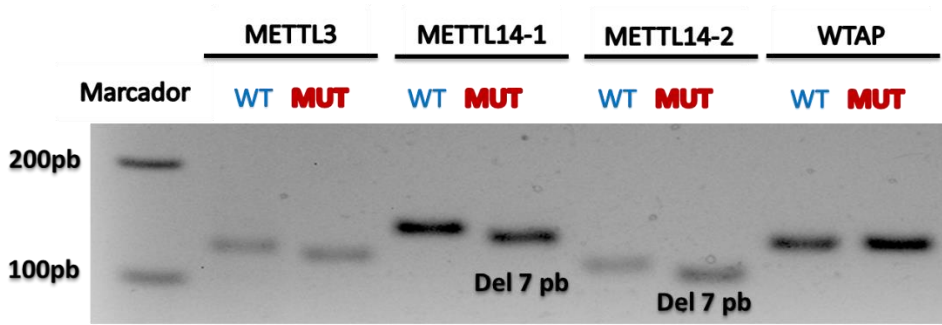
Ppmettl3/Ppmettl14a



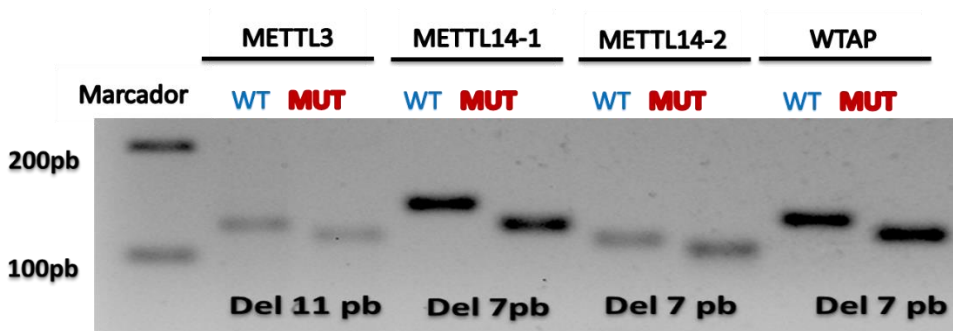
Ppmettl3/Ppmettl14a/Ppmettl14b



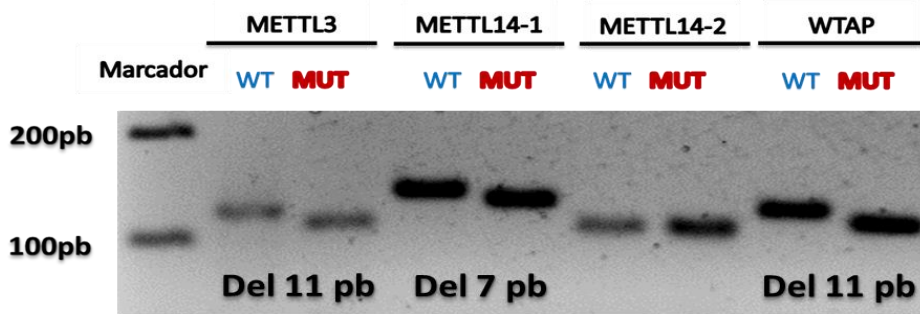
Ppmettl14a/Ppmettl14b



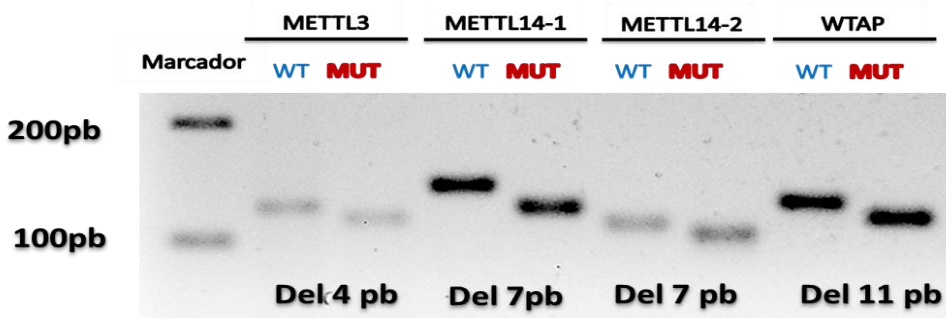
Ppmettl3/Ppwtap/Ppmettl14a/Ppmettl14b



Ppmettl3/Ppmettl14a/Ppwtap

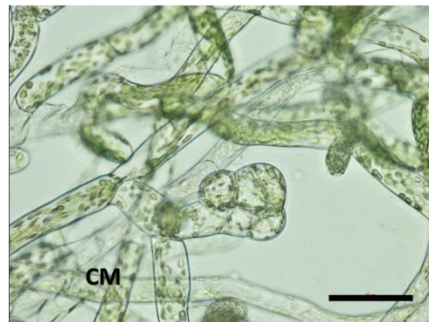
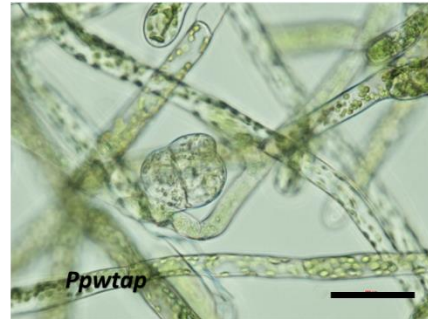
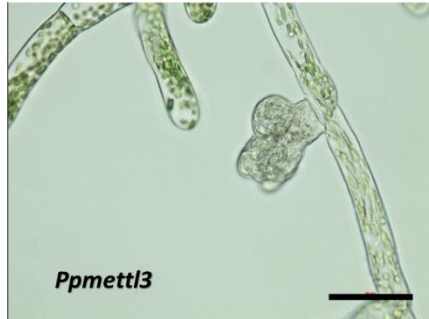


Ppmettl3/Ppmettl14a/Ppmettl14b/Ppwtap (CM)

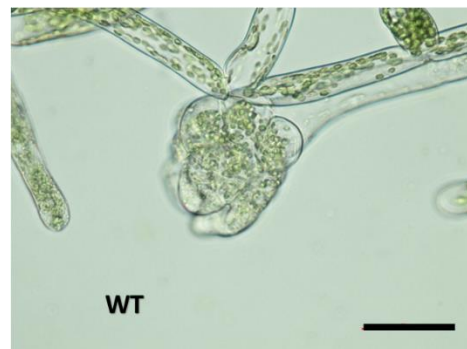
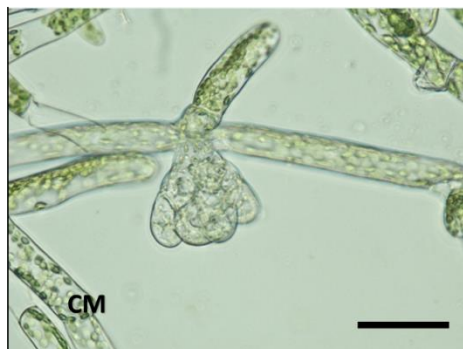
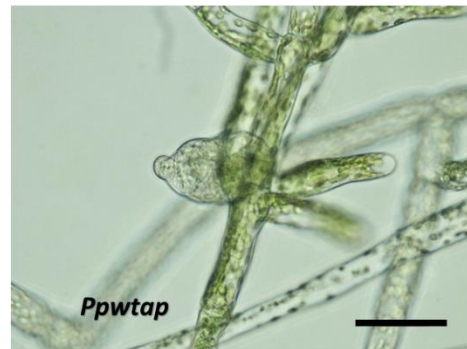


CLASIFICACIÓN DE LOS BROTES DE ACUERDO A ETAPAS DE DESARROLLO: TEMPRANA, INTERMEDIA Y TARDÍA (campo claro 40x la barra de escala es de 50 μ m)

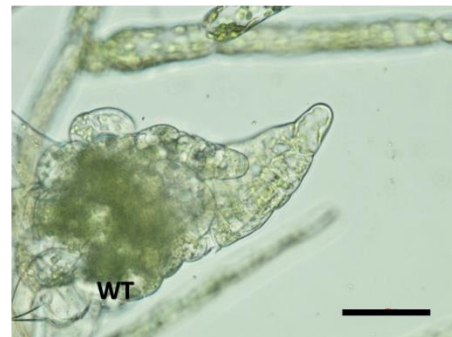
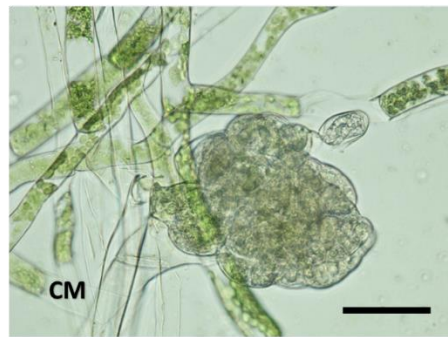
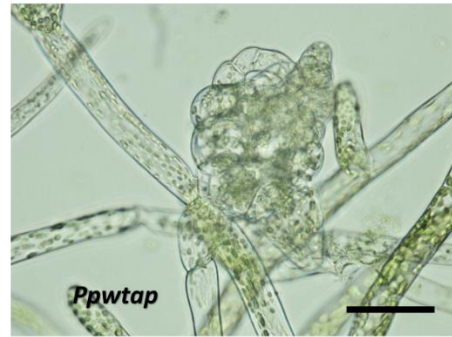
Tempranos



Intermedios



Tardíos



CLASIFICACIÓN DE LOS ESPORANGIOS DE ACUERDO A ETAPAS DE DESARROLLO: (campo claro la barra de escala es de 500 μ m)

Arquegonio



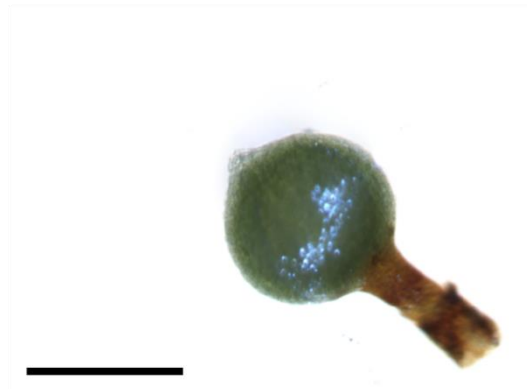
Esporangio S1



Esporangio S2



Esporangio S3



Esporangio S4



Esporangio SM

