

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL**

Grado en Biotecnología



**Estudio de la regulación transcripcional del
promotor de la proteína metalotioneína de tipo
2B mediante el sistema CRISPR/Cas9 en
*Nicotiana benthamiana***

TRABAJO FINAL DE GRADO

Curso académico: 2017 - 2018

Autora: María Ajenjo Bauzá

Tutor académico: Prof. Dña. Regina Niños Rodenes

Tutor externo: D. Diego Orzáez Calatayud

Cotutor externo: Dña. Sara Selma García

Valencia, junio 2018

Datos del Trabajo de Fin de Grado

Alumna: Dña. María Ajenjo Bauzá

Título de TFG: Estudio de la regulación transcripcional del promotor de la proteína metalotioneína de tipo 2B mediante el sistema CRISPR/Cas9 en *Nicotiana benthamiana*

Tutor Académico: Prof. Dña. Regina Niñoles Rodenes

Tutor externo: D. Diego Orzáez Calatayud

Cotutora externa: Dña. Sara Selma García

Valencia, Junio 2018

Resumen

El descubrimiento del sistema CRISPR/Cas ha supuesto una revolución para el campo de la biología sintética, ya que entre sus múltiples aplicaciones se encuentran el editado genómico y la regulación transcripcional programable. En el presente trabajo se ha tratado de modular la expresión del promotor de la proteína metalotioneína de tipo 2B (MTB) de *Solanum lycopersicum* utilizando el sistema CRISPR/dCas9 en *Nicotiana benthamiana*. Se han desarrollado dos estrategias diferentes con el fin de optimizar el sistema de regulación transcripcional tanto en expresión transitoria como en estable. Por un lado, la fusión de distintos dominios de activación y represión a dCas9 en C-terminal. Por otro lado, se ha modificado la estructura del guía de ARN que se une a dCas9, para que sea reconocido por la proteína de la cápsula del virus MS2. Esta proteína se ha fusionado también a diferentes dominios de activación y represión, permitiendo una acción combinatoria entre los dominios fusionados a dCas9 y los unidos al complejo mediante MS2.

Palabras clave: CRISPR/dCas9, *Nicotiana benthamiana*, regulación transcripcional, Golden Braid, SAM.

Resum

El descobriment del sistema CRISPR/Cas ha suposat una revolució per al camp de la biologia sintètica, ja que entre les seues diferents aplicacions es trova l'editat genòmic i la regulació transcripcional programable. En aquest treball s'ha tractat de modular l'expressió del promotor de la proteïna metalotioneïna de tipus 2B (MTB) de *Solanum lycopersicum* utilitzant el sistema CRISPR/Cas9 en *Nicotiana benthamiana*. S'han desenvolupat dues estratègies diferents amb la finalitat d'optimitzar el sistema de regulació transcripcional tant en expressió transitòria com en estable. Per una banda, la fusió de diferents dominis d'activació i repressió a dCas9 en C-terminal. D'altra banda, s'ha modificat l'estructura del guía d'ARN que s'uneix a dCas9, perquè siga reconegut per la proteïna de la càpsula del virus MS2. Aquesta proteïna s'ha fusionat també a diferents dominis d'activació i repressió, permetent una acció combinatòria entre els dominis fusionats a dCas9 i els units al complex mitjançant MS2.

Paraules clau: CRISPR/dCas9, *Nicotiana benthamiana*, regulació transcripcional, Golden Braid, SAM.

Abstract

The discovery of CRISPR/Cas system has meant a revolution in the synthetic biology field. Among all its applications, it could be found the genomic engineering or programmable transcriptional modulation. In this work, we have tried to modulate the expression of the *Solanum lycopersicum* Metallothionein-like protein type 2B promoter with the CRISPR/Cas9 system in *Nicotiana benthamiana*. Two different strategies have been developed in order to optimize the transcriptional regulation system in transient expression as much as in stable expression. The first strategy consists in fusing different activation and repression domains to dCas9 in C-terminal. On the other hand, the second one consists in the modification of the structure of RNA guide, which is joined with dCas9, in order to be recognized by MS2 virus coat protein. This protein has been fused to different activation and repression domains, allowing for a combinatorial action between domains fused to dCas9 and the ones linked to the complex through MS2.

Keywords: CRISPR/dCas9, *Nicotiana benthamiana*, transcriptional regulation, Golden Braid, SAM.

AGRADECIMIENTOS

A Sara, por su paciencia infinita. A Diego, por dejarme formar parte del 2.10 y permitirme aprender tanto. Y a todas las personas que han estado en el labo durante mi estancia, me han ayudado y me han hecho sentir como en casa, en especial a Borja.

A Regina, por emocionarme con su asignatura y por ayudarme en todo lo que he necesitado.

A mis padres, a mi hermana Belén y a Adri, por ser mis pilares fundamentales, por apoyarme y animarme en los momentos de agobio y estrés, que este año han sido muchos, y por creer en mí cuando ni yo lo hago.

A mi familia y amigos, por el cariño y el apoyo.

“Investigar es ver lo que todo el mundo ya ha visto y pensar lo que nadie ha pensado todavía”.
Albert Szent-Györgyi.

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE TABLAS	III

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3.1. MATERIAL VEGETAL	4
3.1.1. Caracterización semillas.....	4
3.1.2. Agroinfiltración	4
3.2. CONSTRUCCIONES GENÉTICAS MEDIANTE <i>GOLDEN BRAID</i>.....	5
3.2.1. Dominios de represión	6
3.2.2. Dominios de activación.....	7
3.2.3. Diseño de guías de ARN para el promotor MTB de <i>Solanum lycopersicum</i>	8
3.2.4. Reacciones de restricción-ligación mediante <i>Golden Braid</i>	8
3.2.5. Transformación en células.....	10
3.2.6. Transformación en células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10
3.2.7. Obtención del plásmido de las células transformadas	11
3.3. ENSAYOS DE LUCIFERASA.....	11
3.3.1. Procesado de los datos	11
3.4. PCR CUANTITATIVA (RT-qPCR)	12
4. RESULTADOS.....	13
4.1. ANTECEDENTES DEL LABORATORIO.....	13
4.2. SEGREGACIÓN DE POBLACIONES DE SEMILLAS	13
4.3. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN TRANSITORIA EN PLANTAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i>	15
4.3.1. Estudio de dominios de activación y represión fusionados a dCas9	15
4.3.2. Estudio de dominios de activación utilizando la estrategia SAM	17
4.3.3. Cinéticas.....	19
4.3.4. Multiplexado	20
4.4. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN EN LÍNEAS REPORTERAS ESTABLES DE <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i>.....	22
4.4.1. Elección línea y estudio de dominios de activación y represión fusionados a dCas9.....	22
4.4.2. Estudio de dominios de activación utilizando la estrategia SAM	26
4.4.3. Cinéticas.....	27
4.4.4. PCR cuantitativa (RT – qPCR).....	29
4.5. COMPARACIÓN RESULTADOS EXPRESIÓN TRANSITORIA Y ESTABLE..	30
5. DISCUSIÓN	32
6. CONCLUSIONES	33
7. BIBLIOGRAFÍA	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica de los distintos módulos posibles de la estrategia <i>Golden Braid</i>	6
Figura 2. Representación gráfica de la posición de los guías diseñados para el promotor de la proteína metalotioneína de tipo 2B (MTB) de <i>Solanum lycopersicum</i>	8
Figura 3. Representación gráfica de los módulos para el ensamblaje estándar de los guías de ARN para CRISPR de la estrategia <i>Golden Braid</i>	8
Figura 4. Esquema del proceso del multiplexado de los guías de ARN utilizando la estrategia <i>Golden Braid</i>	10
Figura 5. Imagen que muestra los controles de esterilización y del medio.....	13
Figura 6. Imagen que muestra la diferencia entre una placa con las semillas resistentes al antibiótico kanamicina (L5-1) (A) y semillas WT sensibles al antibiótico (B).....	14
Figura 7. Gráfica del estudio del efecto de los dominios VP64 y BRD sobre el promotor MTB en plantas WT.....	16
Figura 8. Gráfica del estudio del efecto de los dominios BRD, BRD(x3) y SRDX(x3) sobre el promotor MTB en plantas WT.....	16
Figura 9. Gráfica del estudio del efecto de los dominios VPR y TV sobre el promotor MTB en plantas WT.....	17
Figura 10. Gráfica del estudio la combinación de dominios de activación, utilizando la estrategia SAM, sobre el promotor MTB en plantas WT.....	18
Figura 11. Gráfica del estudio del efecto de la posición de los diferentes guías de ARN modificados con el aptámero F6 de la proteína de la cápsula del virus MS2 diseñados sobre el promotor MTB en plantas WT.....	18
Figura 12. Gráfica que muestra la cinética obtenida a partir de muestras recolectadas a 3, 5, 7 y 11 dpi con dominios de represión sobre el promotor MTB en plantas WT.....	19
Figura 13. Gráfica que muestra la cinética obtenida a partir de muestras recolectadas a 3, 5, 7 y 11 dpi con la combinación de dominios de activación dCas9:EDLL y MS2:VPR sobre el promotor MTB en plantas WT.....	20
Figura 14. Gráfica del estudio del efecto de los nuevos guías (6, 7, 8 y 9) diseñados para la estrategia de multiplexado sobre el promotor MTB en plantas WT.....	21
Figura 15. Gráfica del estudio del efecto de los nuevos guías diseñados para la estrategia de multiplexado junto con los guías utilizados para represión (1 y 2) sobre el promotor MTB en plantas WT.....	21
Figura 16. Gráfica que muestra los valores absolutos de niveles de expresión de luciferasa (a la izquierda, en color amarillo) y de renilla (a la derecha, en color azul).....	22
Figura 17. Gráficas del estudio del efecto de los dominios VP64 y BRD sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de las líneas reporteras estables 3-5 (A) y 5-1 (B).....	23
Figura 18. Gráfica del estudio del efecto de los dominios VP64 y BRD sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de la línea reportera estable 5-6.....	24
Figura 19. Gráfica del estudio del efecto de los dominios VPR y BRD sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de la línea reportera estable 3-9.....	24
Figura 20. Gráficas del estudio del efecto de los dominios de represión BRD, SID4X, KRAB, SRDX y LSD1 sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de las líneas reporteras estables 3-9 (A) y 5-1 (B).....	25

Figura 21. Gráfica del estudio de la combinación de dominios de activación, utilizando la estrategia SAM, sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de la línea reportera estable 3-9	26
Figura 22. Gráfica del estudio del efecto de la posición de los diferentes guías de ARN modificados con el aptámero F6 de la proteína de la cápsula del virus MS2 diseñados sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de la línea reportera estable 3-9.....	27
Figura 23. Gráfica que muestra la cinética obtenida a partir de muestras recolectadas a 3, 5, 7 y 11 dpi con dominios de represión sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de la línea reportera estable 3-9	28
Figura 24. Gráfica que muestra la cinética obtenida a partir de muestras recolectadas a 3, 5, 7 y 11 dpi con la combinación de dominios de activación dCas9:EDLL y MS2:VPR sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de la línea reportera estable 3-9	28
Figura 25. Gráfica que muestra los valores de cDNA obtenidos a partir de muestras recolectadas a 4 y 7 dpi con la construcción dCas9:BRD sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de la línea reportera estable 3-5	29
Figura 26. Gráfica que muestra los valores de luciferasa obtenidos a partir de muestras recolectadas a 4 y 7 dpi con la construcción dCas9:BRD sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de la línea reportera estable 3-5.	29
Figura 27. Gráfica que muestra los datos de expresión del gen luciferasa tanto infiltrada en una planta WT a una OD de 0,1 como en las diferentes líneas reporteras	30
Figura 28. Gráfica que muestra las diferencias de expresión del gen luciferasa al activar el promotor MTB en planta WT con la construcción reportera infiltrada a una OD de 0,1 y en las diferentes líneas reporteras estables	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla que muestra los resultados del recuento de semillas de la línea 5 y su análisis mediante la prueba estadística t de Student (α : 0,05).....	13
Tabla 2. Tabla que muestra los resultados del recuento de semillas de la línea 3 y su análisis mediante la prueba estadística t de Student (α : 0,05).....	14

ABREVIATURAS

CRISPR: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas.

dpi: días post-infiltración.

GB: *Golden Braid*

Indels: inserciones y deleciones.

Kan: antibiótico kanamicina

MG: medio de germinación.

MTB: proteína metalotioneína de tipo 2B.

SAM: Mediador de activación sinérgica.

scRNA: *scaffold* del guía de ARN.

sgRNA: guía de ARN de simple cadena.

TALENs: Efectores de tipo activador de transcripción truncada.

tRNA: ARN de transferencia

WT: *Wild type*

ZFNs: nucleasas dedos de zinc.

1. INTRODUCCIÓN

La ingeniería genética y la biología sintética han estado en continuo desarrollo desde la aparición de las primeras tecnologías del ADN recombinante. En concreto, la biología sintética de plantas es un campo que combina principios de ingeniería genética con biología de plantas. Los avances en este campo pueden utilizarse para mejora de cultivos tradicionales y producción de metabolitos en plantas, entre otras aplicaciones (Liu y Stewart, 2015).

Los primeros métodos de editado genético que se conocieron fueron las enzimas de restricción, que se empezaron a utilizar a finales de los 60 (Revel y Georgopoulos, 1969). Posteriormente se descubrieron las nucleasas dedos de zinc (ZFNs) y los efectores de tipo activador de transcripción truncada (TALENs), que utilizan la estrategia de anclar dominios catalíticos de tipo endonucleasa a proteínas de unión al ADN modulares para introducir roturas en la doble cadena del ADN dirigidas a *loci* específicos (Ran et al., 2013). Estas roturas pueden ser reparadas por unión de los extremos no homólogos, lo que da lugar a pequeñas inserciones y deleciones (indels) en los lugares donde ha habido rotura (Wood et al., 2011).

Desde 2005 se conoce un nuevo sistema basado en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas o CRISPR (Mojica et al., 2005), que ha revolucionado el campo de la ingeniería genética y la biología sintética. El sistema CRISPR asociado a una endonucleasa Cas (CRISPR/Cas) es el más utilizado actualmente. La endonucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes* es guiada a la secuencia diana con la ayuda de un guía de ARN. El reconocimiento y formación de un complejo proteína-guía de ARN se lleva a cabo gracias a la secuencia del *scaffold* del presente guía. Esta estructura forma una serie de bucles que permiten que la proteína Cas9 reconozca el guía y lo una. Este sistema presenta una serie de ventajas frente a otros como TALENs o dedos de zinc (ZFNs): es más fácil de diseñar, altamente específico, eficiente y adecuado para alto rendimiento y editado genético con *multiplexing* (Ran et al., 2013). En el campo vegetal, se ha empleado este sistema para diferentes enfoques, desde *knock-outs* de genes simples y múltiples (Shan et al., 2013) a inserciones dirigidas de secuencias (Schiml et al., 2014) o regulación transcripcional a través de la fusión de dominios activadores o represores transcripcionales a la Cas9 catalíticamente inactiva o dCas9 (Piatek et al., 2015). La nucleasa dCas9 es una variante mutacional de la endonucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, que reconoce específicamente una secuencia diana de ADN y se une a ella sin realizar su actividad endonucleasa (Chávez et al., 2015).

El sistema CRISPR/dCas9 abre las puertas a la modificación programada de la expresión génica, ya que al fusionar este sistema a dominios activadores o represores se puede conseguir una programación celular a nivel transcripcional. Esta habilidad de programación permite un gran número de aplicaciones, activación o represión de circuitos genéticos endógenos o sintéticos e inducción de la diferenciación celular, así como la bioproducción de metabolitos en plantas (Chávez et al., 2015).

Para implementar un sistema modular sintético basado en ARN para programación transcripcional específica de locus, se puede extender la secuencia del guía sgRNA (guía de simple cadena) de CRISPR añadiendo en el extremo 3' una secuencia de aptámeros o una secuencia de ARN que forme una estructura secundaria reconocible por una proteína. La incorporación de una secuencia de aptámeros permite el reconocimiento del complejo Cas9-guía de ARN por una proteína a la que pueden fusionarse diferentes dominios para aumentar el rango funcional del sistema. Esta estrategia que utiliza la modificación del guía de ARN cambia la denominación del sgRNA a scRNA (*scaffold* de ARN), y se denomina SAM (mediador de activación sinérgica). El guía modificado o scRNA presenta tanto la capacidad de unión al ADN como la capacidad de reclutamiento de proteínas (Zalatan et al., 2015). En este caso, se utilizó la

secuencia del aptámero F6 que es reconocido por la proteína de la cápsula del virus MS2 (Parrot et al., 2000).

Para la puesta a punto de la estrategia SAM, y generar las construcciones genéticas necesarias se utilizó el sistema de clonaje y ensamblado *Golden Braid* (GB). Este sistema se utiliza para aplicaciones de biología sintética e ingeniería metabólica, y ha sido desarrollado por el Laboratorio de Genómica y Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) “Eduardo Primo Yúfera” (*Golden Braid 3.0. A Digital Toolbox for Plant Synthetic Biology* [online], 2011). Se trata de una herramienta estándar de ensamblaje de piezas de ADN que está compuesto por distintos niveles de complejidad de las secuencias. El nivel 0 corresponde a vectores que contienen piezas individuales, como promotores, secuencias codificantes (CDS), terminadores, etc. El nivel 1 está formado por cuatro vectores del tipo pDGB α y pDGB Ω , que contienen una o varias unidades transcripcionales unidas mediante módulos del nivel 0. El sistema GB está basado en el uso de enzimas de restricción de tipo IIS, que permiten el ensamblaje ordenado de las piezas de ADN del nivel 0 en los vectores destino del nivel 1. Estos módulos del nivel 1 pueden ensamblarse gracias a las enzimas de restricción mediante una estrategia de doble bucle, en la que dos vectores α pueden ensamblarse en un Ω , y, a su vez, dos vectores Ω pueden ensamblarse en un α . Esta estrategia permite ensamblajes sucesivos y la obtención de construcciones de ADN de cada vez mayor tamaño (Vázquez-Vilar et al., 2017).

En este trabajo se ha pretendido abordar la regulación de la expresión transcripcional, tratando de modular la expresión del promotor de la proteína metalotioneína de tipo 2B (MTB) de *Solanum lycopersicum* mediante el sistema CRISPR/dCas9 y la estrategia SAM, utilizando diferentes dominios represores, activadores y guías de ARN para intentar comprender cómo se comportan y ayudarnos a poder modular la expresión de genes endógenos con mayor precisión en un futuro cercano. Una vez dominada la modificación de la expresión de los genes endógenos se podría utilizar esta información para la regulación de rutas metabólicas implicadas en la producción de metabolitos de interés en plantas.

2. OBJETIVOS

Los objetivos principales de este trabajo son los siguientes:

1. Caracterizar plantas transgénicas de *Nicotiana benthamiana* que llevan incorporada una construcción reportera que consta del gen luciferasa bajo la regulación del promotor de la proteína metalotioneína de tipo 2B (MTB) de *Solanum lycopersicum* y el gen reportero de renilla bajo la regulación del promotor 35S.
2. Modular la expresión del promotor de la proteína metalotioneína de tipo 2B (MTB) de *Solanum lycopersicum* tanto en expresión transitoria como en estable, utilizando el sistema CRISPR/dCas9.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

3.1.1. Caracterización semillas

Se partió de dos líneas de semillas de la población T2 de plantas de *Nicotiana benthamiana* transgénicas a las cuáles se les había incorporado una construcción reportera que consta del gen luciferasa bajo la regulación del promotor de la proteína metalotioneína de tipo 2B (MTB) de *Solanum lycopersicum* y el gen reportero de renilla bajo la regulación del promotor 35S, que se utiliza como control interno. En este vector estaba incorporada también la resistencia al antibiótico kanamicina como marcador de selección.

Previamente se había realizado un trabajo de caracterización de semillas de las poblaciones T0 y T1 (Ver apartado 4.1 *Antecedentes del laboratorio*).

Para la esterilización de las semillas, se lavaron con 1 ml de EtOH al 70% y Tritón-X-100 al 0,05% durante 3 minutos, invirtiendo el tubo con suavidad. Tras eliminar la solución, se añadió 1 ml de EtOH al 96% y se realizó un lavado de 1 minuto, invirtiendo el tubo. Se volcaron las semillas junto con etanol en un papel estéril en cabina de flujo y, cuando estuvieron secas, se sembraron en una placa que contenía medio de germinación (MG) y el antibiótico kanamicina. Se sembraron 40 semillas por placa, 10 por cada cuarto de placa. Se dejaron crecer y se realizaron recuentos, observando las semillas que eran capaces de crecer en presencia del antibiótico (resistentes).

Para la determinación de la homocigosidad de las líneas se realizó un análisis estadístico en el que la hipótesis nula (H_0) fue considerarlas homocigotas y la hipótesis alternativa (H_1), considerarlas heterocigotas. Mediante un análisis t de Student con un α del 0,05 se testaron todas las muestras y así se pudo determinar cuáles eran homocigotas con un 95% de confianza.

3.1.2. Agroinfiltración

La agroinfección por infiltración o agroinfiltración es un proceso que consiste en la introducción de la solución de *Agrobacterium* en el apoplasto (Valero Martínez, MC., 2016).

Se eligieron plantas de *Nicotiana benthamiana* de entre 45 a 60 días crecidas en fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a una temperatura de 24 y 20°C respectivamente.

Para la agroinfiltración de las plantas de *Nicotiana benthamiana* se realizó el siguiente protocolo:

En primer lugar, se sembraron pre-cultivos de las construcciones requeridas en 5 ml de medio LB con los antibióticos correspondientes y se dejaron crecer a 28°C durante 36 horas. Posteriormente, se utilizaron entre 25 y 50 ml del pre-cultivo para inocular 5 ml de medio LB fresco, y se dejaron crecer a 28°C durante 16 horas. Una vez esos cultivos hubieron crecido, se centrifugaron 10 minutos a una velocidad de 4500 rpm, posteriormente se descartó el sobrenadante y se incorporó el doble de volumen de tampón de agroinfiltración, compuesto por MES 10 mM pH 5,6, MgCl₂ 10 mM, Acetosiringona 200 μ M.

Los cultivos se incubaron al menos 2 horas con la solución de infiltración, para activar los genes de infección de *Agrobacterium*, en un agitador horizontal protegidos de la luz.

La densidad óptica (OD) de cada cultivo debe ser medida a 600 nm y posteriormente ajustada. La OD requerida en los experimentos realizados en este trabajo era de 0.1, por lo que las concentraciones de cada cultivo se ajustaron para mantener cada una de las mezclas a una OD final requerida.

Una vez preparadas las diferentes mezclas se infiltraron tres hojas jóvenes por planta para cada construcción con la ayuda de una jeringuilla de un 1ml de capacidad. La infiltración se realiza por el envés de la hoja ya que de esa forma entrará con más facilidad a los espacios intracelulares.

3.2. CONSTRUCCIONES GENÉTICAS MEDIANTE *GOLDEN BRAID*

Para las construcciones genéticas se utilizó *Golden Braid*, un sistema para la construcción modular de estructuras multigénicas de ADN que utiliza enzimas de restricción de tipo IIS.

Algunos de los dominios de represión o activación utilizados, descritos en los apartados 3.2.1 y 3.2.2, fueron sintetizados *de novo* como *gBlocks® Gene Fragments*. Estas construcciones se diseñaron con dianas para la enzima de restricción BsbmI, para que al cortar encajaran directamente en los vectores del nivel 0. La domesticación de las secuencias de ADN se puede llevar a cabo mediante una herramienta disponible en la página web de *Golden Braid (Golden Braid 3.0. A Digital Toolbox for Plant Synthetic Biology [online], 2011)*, que elimina las dianas internas de las enzimas utilizadas por el sistema y añade la secuencia para unos nucleótidos en sus extremos, de nomenclatura estándar, que permitirá su posterior ensamblaje.

Tanto los dominios de activación como los de represión se fusionaron en C-terminal, en nomenclatura de *Golden Braid* como módulo del tipo B5 (Figura 1).

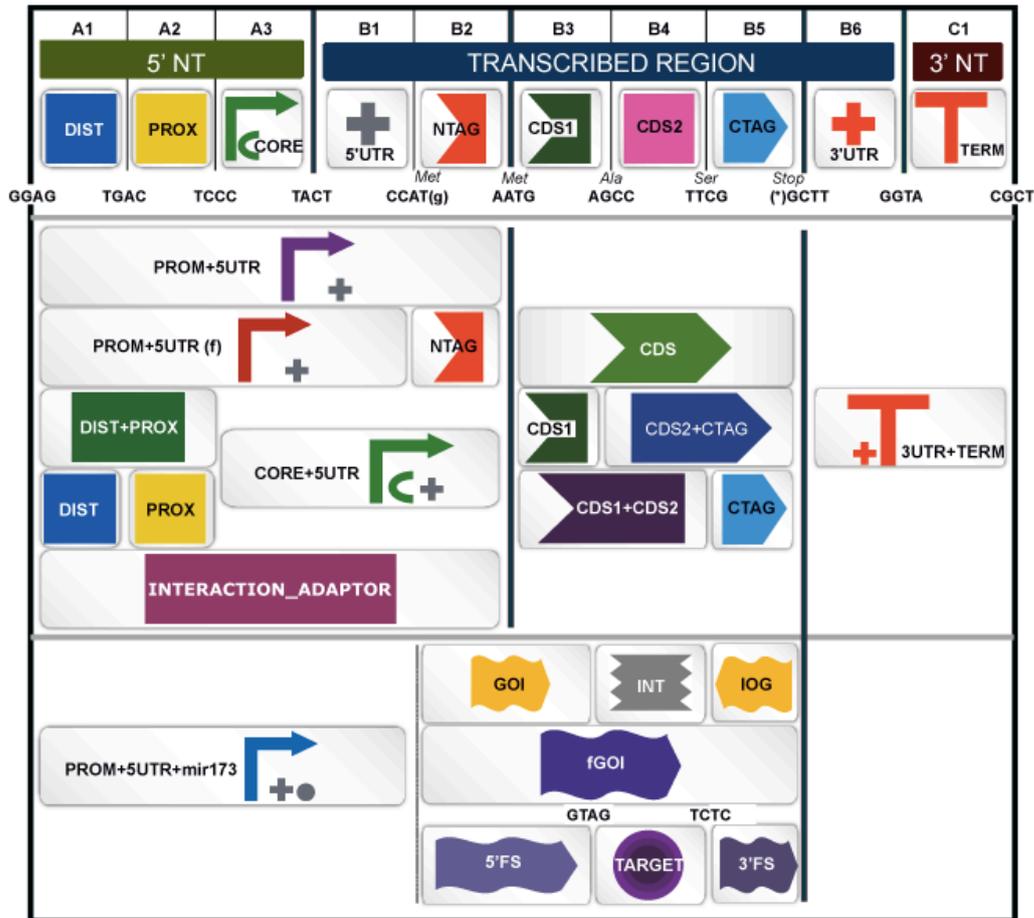


Figura 1. Representación gráfica de los distintos módulos posibles de la estrategia Golden Braid. Fuente: Golden Braid 3.0. A Digital Toolbox for Plant Synthetic Biology [online], 2011

3.2.1. Dominios de represión

Un represor transcripcional es una proteína que se une a una secuencia específica de ADN y controla la expresión de un gen u operón (Brenner et al., 2002).

Se realizó una búsqueda bibliográfica para acotar los dominios presentes en los factores de transcripción descritos y que se adaptarían para ser utilizados en nuestro sistema. Para el estudio de la represión se seleccionaron 5 dominios:

- SRDX

Fue el primer dominio de represión descrito en plantas. Está definido por los patrones consenso LxLxL o DLNxxP y es la forma de represión predominante identificada en plantas. Se le conoce también con las siglas EAR: represor anfílico asociado a factores de respuesta a etileno (Kagale et al., 2011).

- BRD

Dominio de represión B3 que proviene de la familia de factores de transcripción B3 específicos de plantas con dominios de unión al ADN. No tiene similitud con ninguna otra secuencia conocida que corresponda a un dominio de represión. Se descubrió gracias a un estudio sobre el dominio de represión SRDX (Ikeda y Ohme-Takagi, 2009).

- KRAB

Krüppel-associated box. Se trata de una región muy conservada de 75 aminoácidos que contiene dos hélices alfa anfipáticas. Actúa como represor transcripcional cuando se une al co-represor KKAP-1, que sirve como *scaffold* para reclutar proteínas para metilación y deacetilación de histonas (Stege et al., 2002).

- SID4X

El dominio SID o mSin3 actúa reclutando un complejo de histonas deacetilasas que modifica la estructura de la cromatina. (Stege et al., 2002). Contiene cuatro dominios, cada uno formando dos α -hélices anfipáticas separadas por un conector flexible. Estas regiones llamadas dominios PAH (α -hélices anfipáticas emparejadas) son dominios de interacción proteína-proteína. (Eilers et al., 1999).

- LSD1

Histona desmetilasa específica de lisinas. Se trata de la primera histona desmetilasa identificada en células animales, y pertenece a la superfamilia de los dinucleótidos de adenina flavina (FAD) dependientes de amino oxidasas. Desmetila específicamente la histona 3 de la lisina 4 (H3K4) mono o dimetilada y la histona 3 de la lisina 9 (H3K9) por procesos redox. (Chen et al., 2012).

3.2.2. Dominios de activación

Basándose en resultados previos obtenidos en el laboratorio, se acotaron los dominios de activación sintéticos para modular la actividad de nuestro promotor problema a los siguientes:

- VP64

Consiste en una repetición tetramérica del dominio de activación de la proteína VP16 del virus del herpes simplex (Gräslund et al., 2004).

- VPR

Se trata de una combinación de los dominios de activación VP64, p65 y Rta. A su vez, VP64 es la combinación de cuatro dominios VP16 en tándem. Actúa reclutando factores de transcripción diversos. Presenta un efecto combinado, ya que puede ser utilizado como una endonucleasa específica, represor transcripcional y activador transcripcional en la misma célula (Kiani et al., 2015).

- TV

Consta de 6 dominios TAL (TALE TAD) y un dominio VP128, 8 repeticiones en tándem del dominio VP16, que se trata de un activador viral procedente del virus del herpes simplex (Hagmann et al., 1997). Se trata de un potente activador que presenta el efecto combinado de sus componentes. (Li et al., 2017).

- EDLL

Fuerte dominio de activación de origen vegetal. Pertenece a la familia de reguladores transcripcionales ERF/EREBP. Activa en posiciones distales y proximales del promotor diana. (Tiwari et al., 2012).

3.2.3. Diseño de guías de ARN para el promotor MTB de *Solanum lycopersicum*

El promotor de la proteína metalotioneína de tipo 2B (MTB) se escogió como modelo para realizar un estudio de represión transcripcional con el sistema CRISPR/dCas9. Este promotor constitutivo presenta unos valores de expresión relativamente altos, por lo que es considerado un buen candidato para realizar estudios de represión transcripcional.

Se diseñaron 9 guías de ARN para esta construcción, tal y como se puede observar en la figura 2.

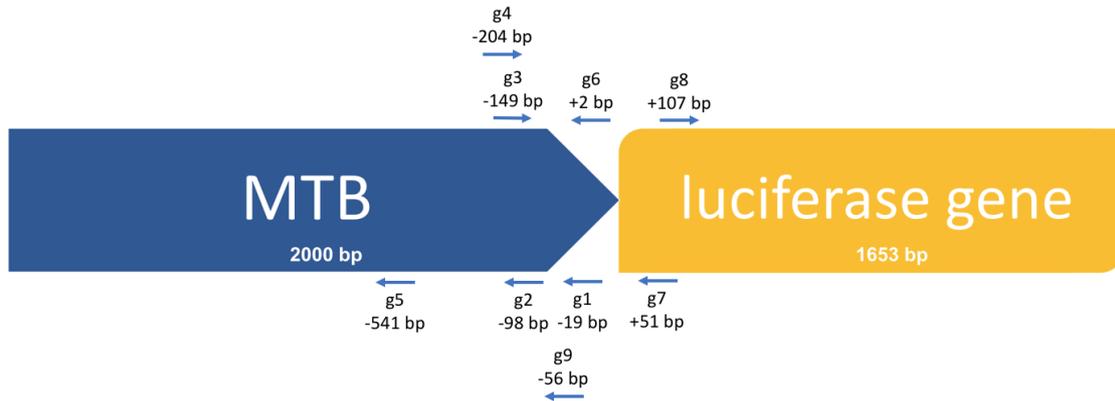


Figura 2. Representación gráfica de la posición de los guías diseñados para el promotor de la proteína metalotioneína de tipo 2B (MTB) de *Solanum lycopersicum*. La nomenclatura de los guías está realizada respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS). Fuente: propia.

3.2.4. Reacciones de restricción-ligación mediante *Golden Braid*

Gracias al sistema *Golden Braid* (GB) las secuencias no variables de las diferentes construcciones están diseñadas como piezas individuales. Para obtener las piezas completas hay que diseñar las partes variables y ensamblarlas con piezas ya presentes en la colección GB. Cada una de las posibles piezas responde a una nomenclatura determinada que ayuda a clasificarlas en el sistema GB (Figura 1).

3.2.4.1. Guías de ARN

El ensamblaje de los guías de ARN se realizó siguiendo dos estrategias diferentes, por un lado, el ensamblaje estándar y por otro el multiplexado o *multiplexing*. En el caso de los guías, la parte variable que hubo que diseñar fue la diana, de 20 pares de bases (bp).

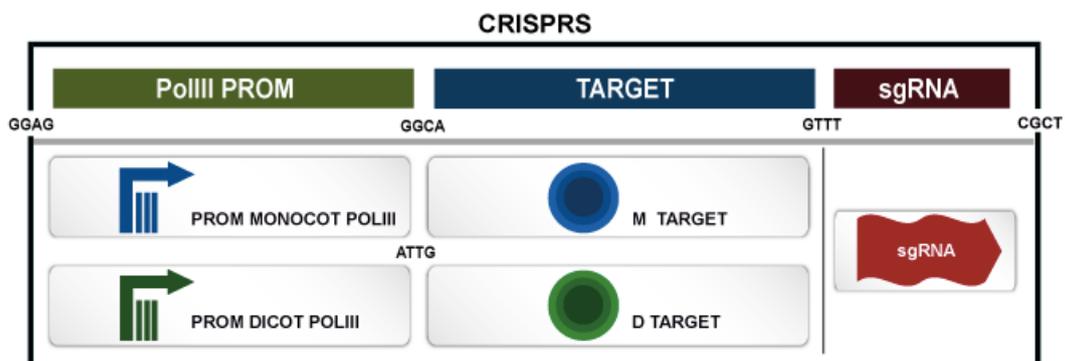


Figura 3. Representación gráfica de los módulos para el ensamblaje estándar de los guías de ARN para CRISPR de la estrategia *Golden Braid*. Fuente: *Golden Braid 3.0. A Digital Toolbox for Plant Synthetic Biology* [online], 2011

ENSAMBLAJE ESTÁNDAR DE LOS GUÍAS DE ARN

Para realizar el ensamblaje estándar de los guías de ARN en los niveles 0 o 1 de *Golden Braid*, se partió de una concentración de 100 μM de los oligos directo y reverso de cada guía de ARN diseñado. Para este tipo de ensamblaje se utilizaron los guías 1 (-19 bp), 2 (-98 bp), 3 (-149 bp), 4 (-204 bp) y 5 (-541 bp), cuyas posiciones respecto a la construcción MTB:luciferasa pueden observarse en la Figura 2.

Los oligos directo y reverso a una concentración de 10 μM se mantuvieron 5 minutos a temperatura ambiente para que hibridaran y formaran una pieza de doble de doble hebra con los extremos cohesivos con la nomenclatura adecuada. Posteriormente se realizó una reacción de restricción-ligación para incorporar las secuencias a un vector pDGB α . Esta reacción constaba de la secuencia diana de 20 nucleótidos obtenida de la hibridación de los oligos, el promotor U626 (GB1001), el *scaffold* del guía modificado con la adición de dos copias del aptámero F6 de la proteína MS2 (GB1437) y el vector destino (pDGB α). Para llevar a cabo la reacción se ajustó la concentración del vector destino a 75 ng y la del resto de componentes a una proporción 1:2 del vector, es decir, unos 150 ng.

MULTIPLEXADO O *MULTIPLEXING*

La estrategia del multiplexado o *multiplexing* consiste en el ensamblaje de diferentes guías de ARN en un mismo vector para su expresión simultánea como un sólo transcrito de múltiples guías de ARN, que luego serán procesados por ribonucleasas de ARN de transferencia (tRNA) para producir los guías de ARN individuales (Vázquez-Vilar et al., 2016).

Se diseñaron 4 guías de ARN para la estrategia del multiplexado, los guías 6 (+2 bp), 7 (+51 bp), 8 (+107 bp) y 9 (-56 bp) (Figura 2). Posteriormente a la hibridación de los oligos para la obtención de la secuencia diana de los guías, explicada en el apartado anterior, se realizaron reacciones de restricción-ligación para la clonación de los diferentes guías junto al tRNA que determinaría su posición en el vector final. La construcción de tRNA contenía también el aptámero F6 de la proteína de la cápsula del virus MS2.

Los guías 6 y 7 se clonaron en posición 1, debido a que era posible que el guía 6 no se clonara bien por su porcentaje de GCs (15%). El guía 8 se clonó en posición 2 y el guía 9 en posición 3. Cada uno de estos guías se clonó en el vector pUPD2.

Posteriormente se procedió a la ligación de los guías juntos. Se clonaron en el vector pDGB α 1 los guías 6 (posición 1), 8 (posición 2) y 9 (posición 3) y los guías 7 (posición 1), 8 (posición 2) y 9 (posición 3) en el vector pDGB α 2.

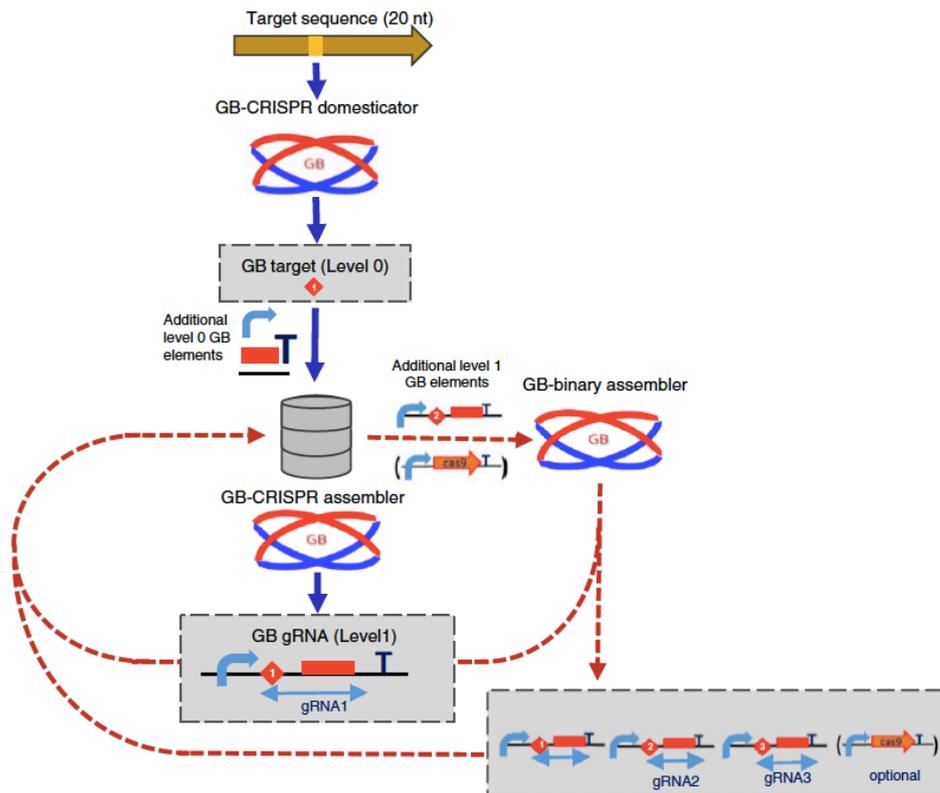


Figura 4. Esquema del proceso del multiplexado de los guías de ARN utilizando la estrategia *Golden Braid*. Fuente: Vázquez-Vilar et al., 2016.

3.2.4.2. Dominios de represión y ligación fusionados con dCas9 y MS2

A través de reacciones de restricción-ligación y combinando los diferentes vectores pDGB3 α o pDGB3 Ω mediante la estrategia de doble buque se fusionaron los diferentes dominios de activación y represión tanto a dCas9 como a la proteína de la cápsula del virus MS2.

3.2.5. Transformación en células de *Escherichia coli*

Tras las diferentes reacciones de restricción-ligación se transformaron las construcciones en células de *Escherichia Coli* de la cepa TOP10 mediante electroporación con voltaje a 1500V. Tras la recuperación de las células transformadas en medio LB 30 min a 37°C, se sembraron en placa con la resistencia del vector correspondiente, IPTG y X-gal. Una vez crecidas, se seleccionaron colonias blancas y se crecieron en medio LB con el antibiótico correspondiente, IPTG y X-gal.

3.2.6. Transformación en células de *Agrobacterium tumefaciens*

Una vez obtenidas ya las construcciones deseadas se transformaron en células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58, para su posterior agroinfiltración (Ver apartado 3.1.2. *Agroinfiltración*). La transformación se realizó mediante electroporación con voltaje a 1440V. La recuperación de las células transformadas fue en medio LB 1 hora a 28°C. Una vez recuperadas se sembraron en cultivo líquido con el antibiótico correspondiente a la resistencia del vector con el que las células habían sido transformadas y el antibiótico rifampicina, al cual es resistente esta cepa de *Agrobacterium*.

3.2.7. Obtención del plásmido de las células transformadas

Cuando las bacterias hubieron crecido en el medio líquido se realizó el aislamiento del plásmido con la que fueron transformadas. En el caso de las células de *Escherichia coli*, la obtención del plásmido se realizó mediante el kit comercial de MiniPrep *E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit II, Q (capless) Spin*. En cuanto a las células de *Agrobacterium tumefaciens*, se obtuvo el plásmido utilizando el kit comercial de MiniPrep *Qiaprep spin miniprep kit*, de Qiagen®.

Finalmente, se midió la pureza y concentración del ADN obtenido mediante el NanoDrop de Thermo Scientific y se comprobó por secuenciación.

3.3. ENSAYOS DE LUCIFERASA

Para los ensayos de medida de luminiscencia de las proteínas luciferasa y renilla se recogió muestra a 5 días post-infiltración (ver apartado 4.1. *Antecedentes del laboratorio*). Se recogió con la ayuda de un sacabocados una porción circular de 0,8 cm de diámetro de cada una de las tres réplicas biológicas. Cada una de estas réplicas se depositó en un tubo *Eppendorf* de seguridad de 2 ml de capacidad en el que previamente se habían depositado dos bolas de acero que ayudarían en la posterior trituración. Las muestras se conservaron inmediatamente en nitrógeno líquido para evitar su degradación y poder almacenarlas hasta su posterior procesado.

Para la realización del ensayo se trituraron las muestras, sometiéndolas a agitación en frío durante 30 segundos ajustando la frecuencia de agitación a 30 Hz. Posteriormente añadieron 375 µl por muestra de tampón de lisis (5X) para las muestras, mantenidas en hielo, y se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C. 7,5 µl del sobrenadante de cada muestra se incorporaron a una placa de 96 pocillos de material opaco (*Corning™ 96-Well Solid White Polystyrene Microplates* de Fisher Scientific). Se añadieron 30 µl del tampón que contenía luciferina a cada uno de los pocillos y se midió la señal de luminiscencia en el luminómetro. Una vez realizada la medida, se añadieron 30 µl del tampón *stop&glow* (al que previamente se había añadido el sustrato de la renilla, que está a una concentración de 50X) a cada pocillo y se realizó la segunda y última medida de luminiscencia.

3.3.1. Procesado de los datos

Una vez recabados todos los datos se procesaron en el ordenador con la ayuda de una hoja de cálculo de Microsoft Excel.

Se contaba con tres medidas de cada una de las tres réplicas biológicas, por lo que se realizó un promedio por réplica tanto de las medidas de luciferasa como de las de renilla. Posteriormente se realizó el ratio luciferasa/renilla, tanto de cada una de las réplicas como de la media, dividiendo la media de las medidas de luciferasa entre la de renilla para cada réplica biológica.

Para la normalización de los datos frente al control negativo, se realizó la división del ratio luciferasa/renilla de cada réplica biológica entre la media de los ratios de la muestra control.

Por último, y puesto que para cada muestra problema se quería un único resultado, se calculó la división entre la media de los ratios de cada muestra problema y la media de los ratios del control. Además, se calculó la desviación estándar del resultado obtenido en esta división.

3.4. PCR CUANTITATIVA (RT-qPCR)

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa reversa en tiempo real permite la detección y la medida fiable de los productos generados durante cada ciclo de PCR. (NCBI [online], 2018).

Se realizó una RT-qPCR para realizar un análisis de cuantificación relativo del nivel de transcrito obtenido a 4 y 7 días post-infiltración, y comparar esta cantidad con las medidas de luminiscencia (donde la luminiscencia es proporcional a la cantidad de proteína).

Con la ayuda de un sacabocados de aproximadamente 2 cm de diámetro, se recogieron 4 discos de hoja a 4 y 7 días post-infiltración, que correspondía a una cantidad de aproximadamente 100 mg de tejido vegetal. Se realizó la extracción de ARN utilizando el kit *Nucleo Spin RNA plant* de Macherey-Nagel. En ARN obtenido debe ser tratado para eliminar la posible contaminación de genómico, por lo que se realizó una digestión con la rDNasa del kit *DNA-free™ DNA Removal* de AMBION. Una vez tratadas las muestras se realizó la retrotranscripción a DNA complementario (cDNA) utilizando el kit de Takara *PrimeScript first strand cDNA syntesis*.

La PCR cuantitativa se realizó utilizando el sistema *7500 Fast Real-Time PCR System* de Thermo Scientific.

4. RESULTADOS

4.1. ANTECEDENTES DEL LABORATORIO

Para la realización de este trabajo se partió del conocimiento generado previamente en el Laboratorio de Genómica y Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) “Eduardo Primo Yúfera”, donde ya se habían realizado trabajos de investigación en el campo de la modulación transcripcional. En el artículo de Vázquez-Vilar et al. (2016), se muestra la adecuación del sistema CRISPR/Cas9 a *Golden Braid*, para poder utilizarlo como herramienta de clonaje en Biología Sintética de Plantas. En el trabajo mencionado se desarrolló la construcción reportera basada en la actividad lucifereasa/renilla donde el promotor MTB fue fusionado al gen de la luciferasa y la renilla actúa como control interno.

De este trabajo se tomó también como fecha de recogida de las muestras agroinfiltradas para los ensayos de luciferasa los 5 días post-infiltración (dpi), ya que se había estimado como día óptimo para observar la expresión de las proteínas en cuestión.

Además, previamente al inicio de este trabajo ya se había realizado la transformación y caracterización de las plantas transgénicas de la T0 y T1 que contenían la construcción reportera del gen luciferasa bajo la regulación del promotor de la proteína metalotioneína de tipo 2B (MTB), y el gen renilla bajo la regulación del promotor 35S.

4.2. SEGREGACIÓN DE POBLACIONES DE SEMILLAS

Para el análisis de poblaciones se realizaron recuentos en las placas sembradas con las semillas de líneas transgénicas en la fase T2 con la construcción reportera del gen luciferasa bajo la regulación del promotor de la proteína metalotioneína de tipo 2B (MTB), y el gen renilla bajo la regulación del promotor 35S.

En cada esterilización y siembra se realizaron siempre los controles, que consistían en la siembra de semillas no transgénicas o *Wild type* (WT) tanto en medio sin antibiótico, control de esterilización, como de siembra en medio con el antibiótico cuya resistencia estaba incorporada en la construcción reportera (kanamicina), control del medio.

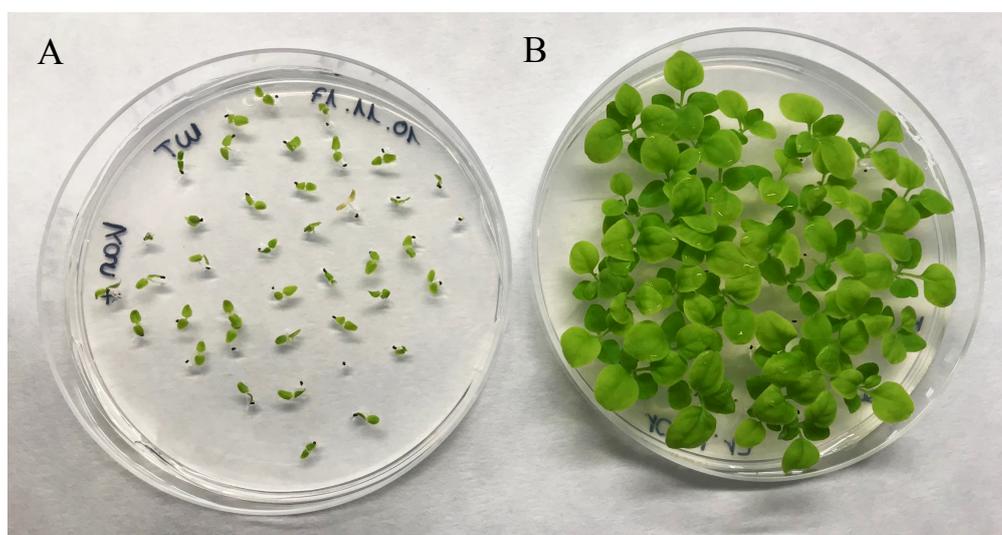


Figura 5. Imagen que muestra los controles de esterilización y del medio. (A) Semillas WT sembradas en medio de germinación con el antibiótico kanamicina. (B) Semillas WT sembradas en medio de germinación sin antibiótico. Fuente: propia.

Para determinar que las líneas eran homocigotas debían haber crecido todas las plántulas en medio con kanamicina, al igual que en la figura 5B. Eso mostraría que todas las plantas llevarían incorporada en el genoma la construcción reportera de manera homocigota. La única línea de la cual germinaron y crecieron todas las semillas sembradas fue la línea 5-1.

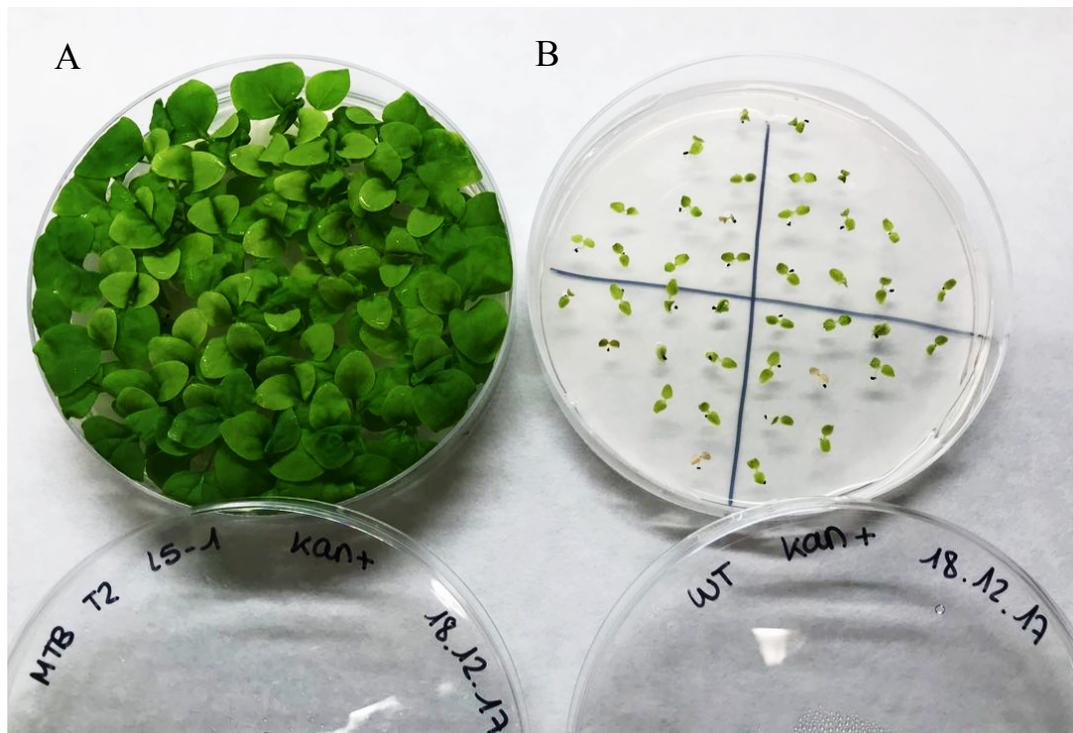


Figura 6. Imagen que muestra la diferencia entre una placa con las semillas resistentes al antibiótico kanamicina (L5-1) (A) y semillas WT sensibles al antibiótico (B).

Al partir las líneas de la T1 se esperaba segregación. Para averiguar qué líneas eran homocigotas se realizó un análisis estadístico en el que la hipótesis nula (H_0) fue considerarlas homocigotas y la hipótesis alternativa (H_1), considerarlas heterocigotas.

Mediante un análisis t de Student con un α del 0,05 se testaron todas las muestras y se obtuvieron los resultados mostrados en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Tabla que muestra los resultados del recuento de semillas de la línea 5 y su análisis mediante la prueba estadística t de Student (α : 0,05).

Línea	Sensibles	Resistentes	No germinadas	No contadas	TOTAL	Proporción resistentes	p valor
L5-1	0	40	0	0	40	1	0,00
L5-2	8	31	0	1	40	0,794871795	-5,38
L5-3	12	28	0	0	40	0,7	-7,87
L5-4	11	29	0	0	40	0,725	-7,21
L5-6	9	29	2	0	40	0,763157895	-6,21
L5-7	8	30	2	0	40	0,789473684	-5,52
L5-10	13	26	1	0	40	0,666666667	-8,74
						MEDIA:	0,777024291
						DESV. EST.	0,100854944

Tabla 2. Tabla que muestra los resultados del recuento de semillas de la línea 3 y su análisis mediante la prueba estadística t de Student (α : 0,05).

Línea	Sensibles	Resistentes	No germinadas	No contadas	TOTAL	Proporción resistentes	p valor
L3-1	11	10	19	0	40	0,476190476	-14,64
L3-3	10	29	1	0	40	0,743589744	-7,16
L3-4	13	25	2	0	40	0,657894737	-9,56
L3-5	8	30	2	0	40	0,789473684	-5,88
L3-6	10	29	1	0	40	0,743589744	-7,16
L3-7	7	31	2	0	40	0,815789474	-5,15
L3-8	10	28	2	1	41	0,736842105	-7,35
L3-9	7	32	1	0	40	0,820512821	-5,01
L3-10	6	22	12	0	40	0,785714286	-5,99
MEDIA:						0,72995523	
DESV.EST.						0,107370973	

Para la línea 5, con 6 grados de libertad, el p valor debería ser menor que -2,447. La única sublínea con la que se cumplió la posibilidad aceptar la hipótesis nula, es decir, considerar la línea homocigota con una confianza del 95%, fue la L5-1.

En cuanto a la línea 3, con 8 grados de libertad, el p valor debería ser menor que -2,306. Ninguna de las sublíneas de la línea 3 se pudo considerar homocigota.

4.3. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN TRANSITORIA EN PLANTAS DE *N. BENTHAMIANA*

Con el fin de modular la expresión del promotor de la proteína metalotioneína de tipo 2B (MTB) de *Solanum lycopersicum* se realizaron diferentes ensayos, agroinfiltrando la construcción reportera del gen luciferasa bajo la regulación del promotor MTB y el gen renilla bajo la regulación del promotor 35S (MTB:luc/35S:ren) a plantas no transgénicas o *Wild type* (WT) de *Nicotiana benthamiana* junto con diferentes combinaciones de guías de ARN y dominios.

4.3.1. Estudio de dominios de activación y represión fusionados a dCas9

En primer lugar, se realizó un estudio de un dominio de activación (VP64) junto con los guías 2, 3, 4 y 5 de MTB, conjunto de guías que previamente se había visto que estaban diseñados en unas posiciones que favorecían la activación. Se realizó un estudio también de un dominio de represión (BRD) junto a los guías 1, 2 y 3 del promotor MTB, conjunto de guías cuyas posiciones favorecían la represión (Figura 2).

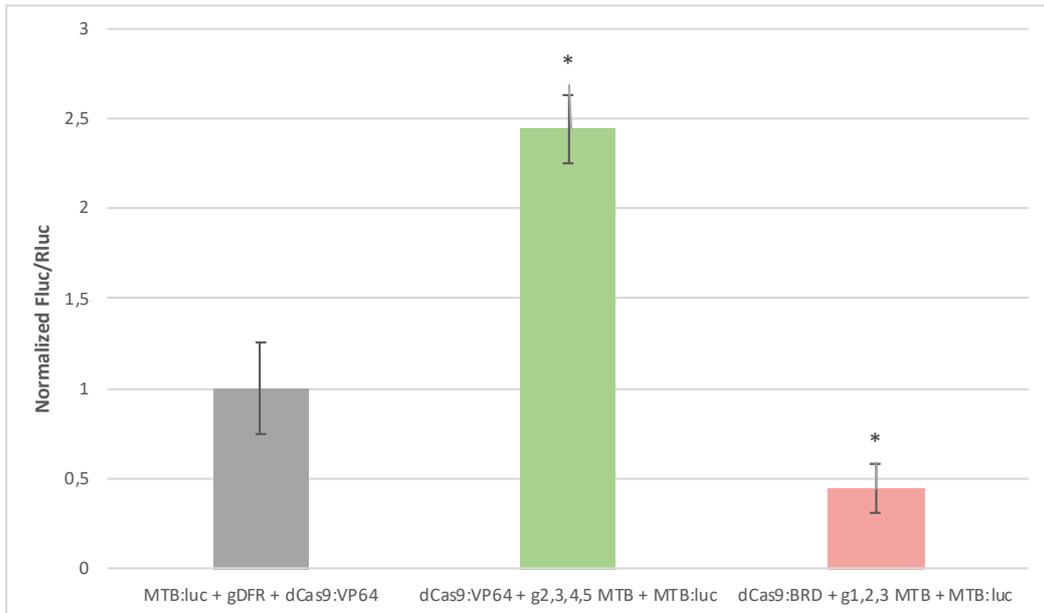


Figura 7. Gráfica del estudio del efecto de los dominios VP64 y BRD sobre el promotor MTB en plantas WT. Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control, que se muestra en la columna de la izquierda, de color gris (t de Student, α : 0,05).

Con este ensayo se consiguió una represión de aproximadamente el 50% y una activación del 2,5X.

Posteriormente y continuando el estudio de la represión se probaron los dominios de represión BRD, BRD en tándem 3 veces y SRDX en tándem 3 veces. Al haber obtenido anteriormente un buen resultado con el dominio BRD se pensó en la hipótesis de que un mayor número de dominios de represión podrían disminuir aún más la actividad del gen.

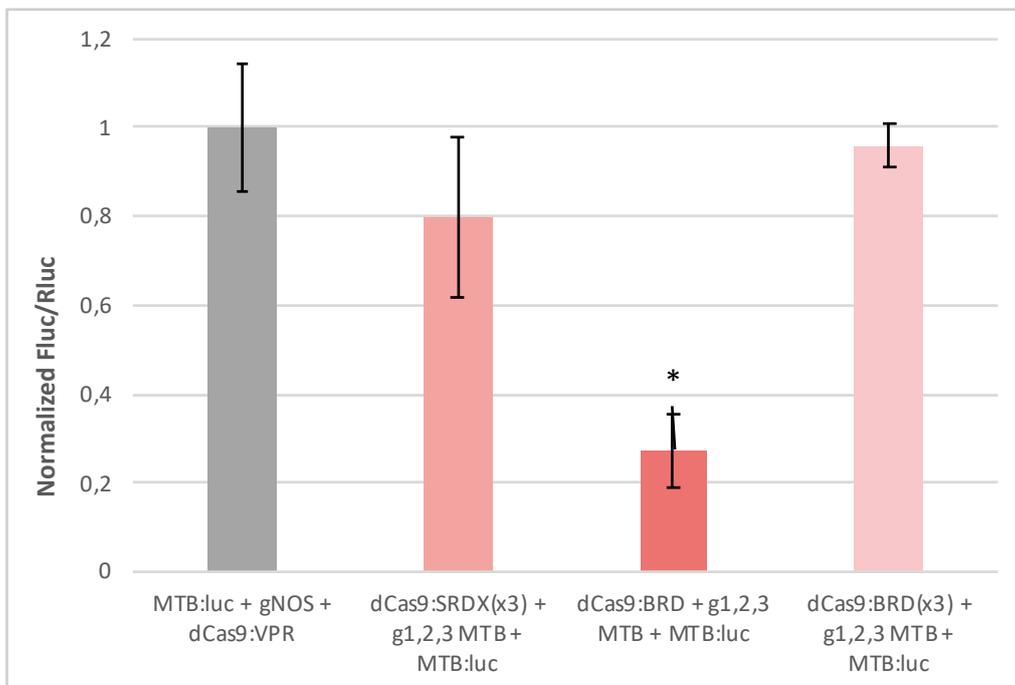


Figura 8. Gráfica del estudio del efecto de los dominios BRD, BRD(x3) y SRDX(x3) sobre el promotor MTB en plantas WT. Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control, que se muestra en la columna de la izquierda, de color gris (t de Student, α : 0,05).

Tras realizar el ensayo se observó que no era correcta esta hipótesis, ya que una única copia del dominio BRD junto a los guías 1, 2 y 3 del promotor MTB era la única combinación que daba lugar a una represión significativa. Se pensó en que era posible que al incorporar tres copias del dominio se estuviera expresando en menor medida la proteína por razón de las repeticiones en tándem.

En cuanto a la activación, se probaron los dominios de activación VPR y TV, junto con los guías 2, 3, 4 y 5 de MTB.

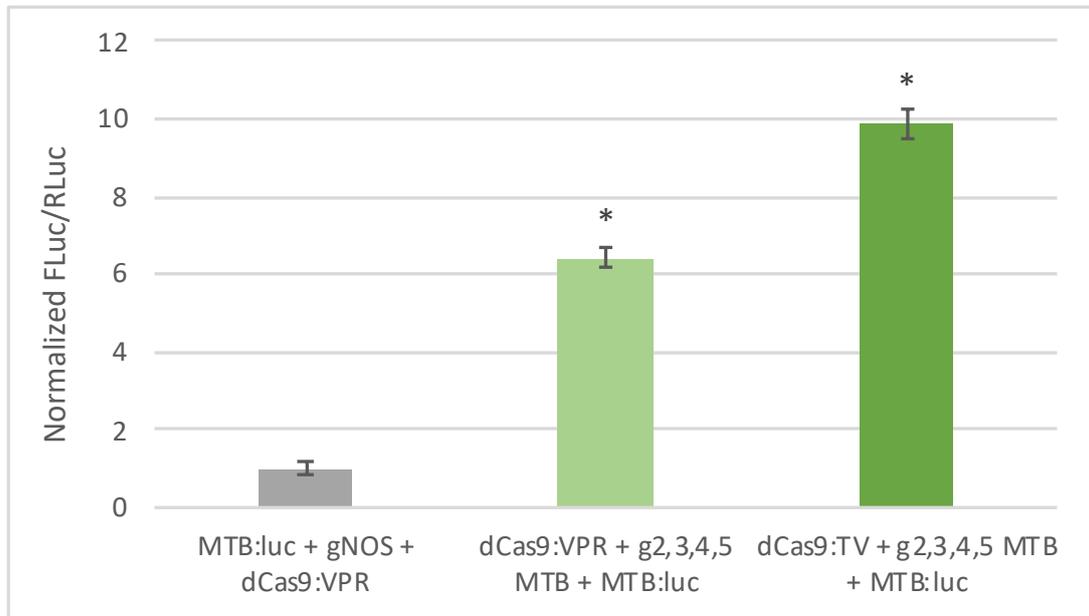


Figura 9. Gráfica del estudio del efecto de los dominios VPR y TV sobre el promotor MTB en plantas WT. Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control, que se muestra en la columna de la izquierda, de color gris (t de Student, α : 0,05).

Se observó que estos dominios aumentaban la expresión del gen luciferasa regulado por el promotor MTB aproximadamente en un 6 y un 10X, respectivamente.

4.3.2. Estudio de dominios de activación utilizando la estrategia SAM

Al modificar los guías de ARN para el promotor MTB añadiendo dos copias del aptámero F6 de la proteína de la cápsula del virus MS2 para la realización de la estrategia SAM, se probaron diferentes combinaciones de dominios de activación, para encontrar la combinación óptima que produjera la mayor activación.

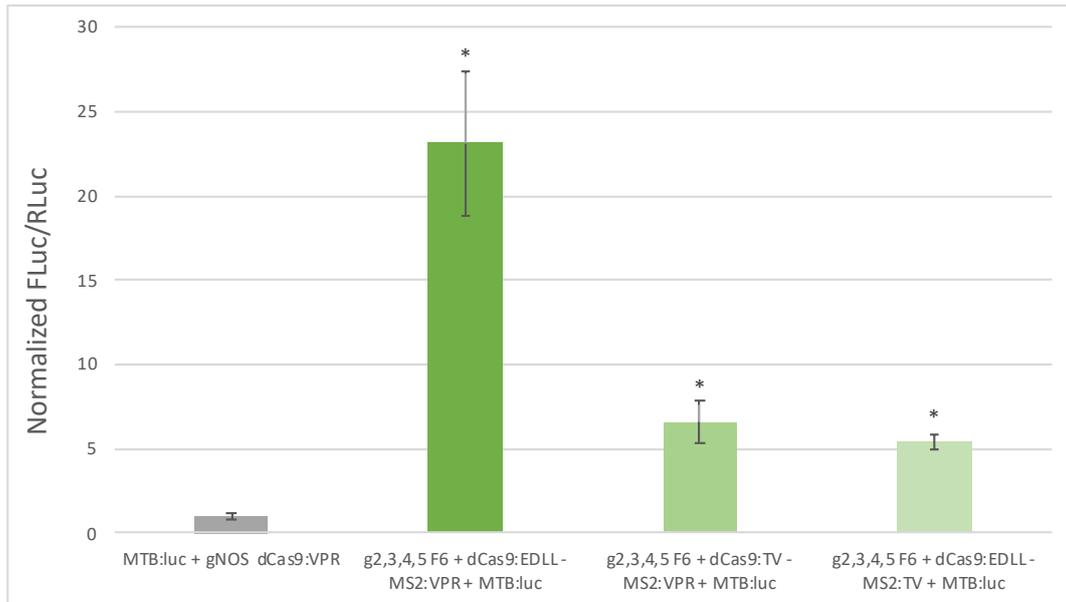


Figura 10. Gráfica del estudio la combinación de dominios de activación, utilizando la estrategia SAM, sobre el promotor MTB en plantas WT. Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control, que se muestra en la columna de la izquierda, de color gris (t de Student, α : 0,05).

La mejor combinación con diferencia fue la que combinaba dCas9 fusionada al dominio EDLL y MS2 fusionada a VPR, ya que se consiguió una activación de aproximadamente una activación de 23X. Por tanto, ésta fue la combinación utilizada para para determinar cómo influía la posición de los diferentes guías (Figura 2) a la activación del promotor.

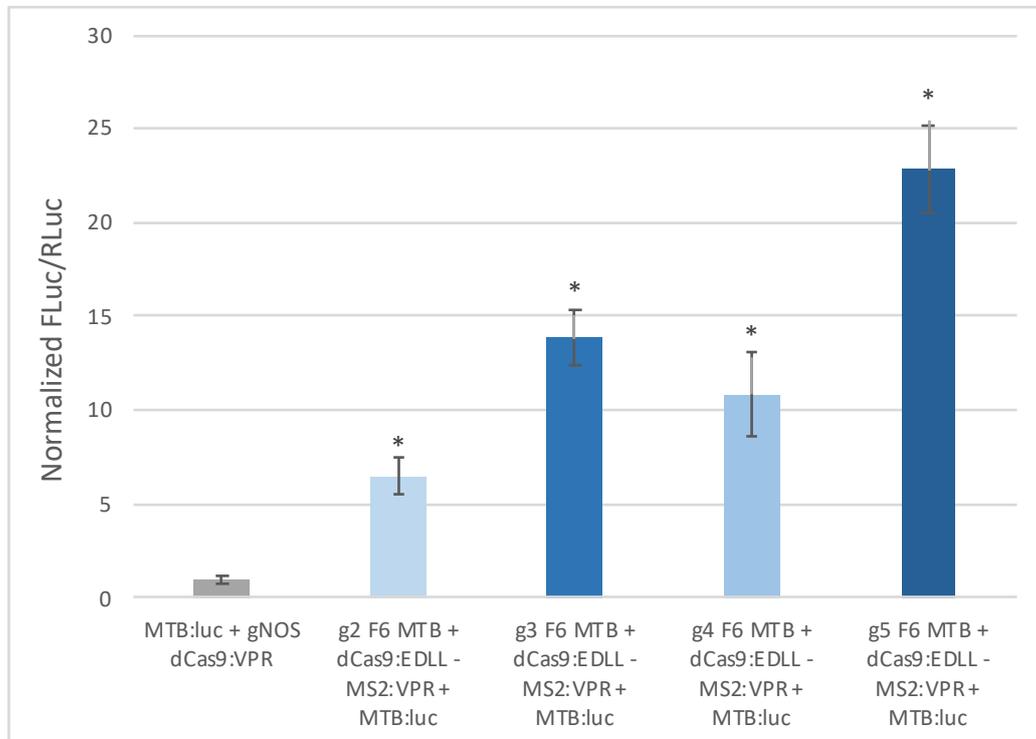


Figura 11. Gráfica del estudio del efecto de la posición de los diferentes guías de ARN modificados con el aptámero F6 de la proteína de la cápsula del virus MS2 diseñados sobre el promotor MTB en plantas WT. Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control, que se muestra en la columna de la izquierda, de color gris (t de Student, α : 0,05).

Con todas las combinaciones se obtuvieron activaciones significativamente diferentes al control negativo, siendo la mejor posición para activar la del guía 5 (-541 bp). Este resultado confirmaba la hipótesis de que cuanto más alejados a la caja TATA se unan los guías de ARN, más espacio tendrán los factores de inicio de la transcripción para unirse, ya que el complejo de dCas9 no interferirá.

Al observar también que utilizando el guía 3 (-149 bp) se conseguían buenos niveles de activación, siendo la segunda mejor posición para activar según la Figura 11, se decidió eliminarlo del conjunto de guías utilizados para reprimir. Por tanto, los guías utilizados para represión a partir de este ensayo fueron los guías 1 (-19 bp) y 2 (-98 bp).

4.3.3. Cinéticas

Para poder entender cómo cambiaban los niveles de proteína tras la infiltración según el tiempo, se agroinfiltraron dos construcciones con dominios de represión junto los guías 1 y 2 y se recogió muestra a los 3, 5, 7 y 11 días post-infiltración.

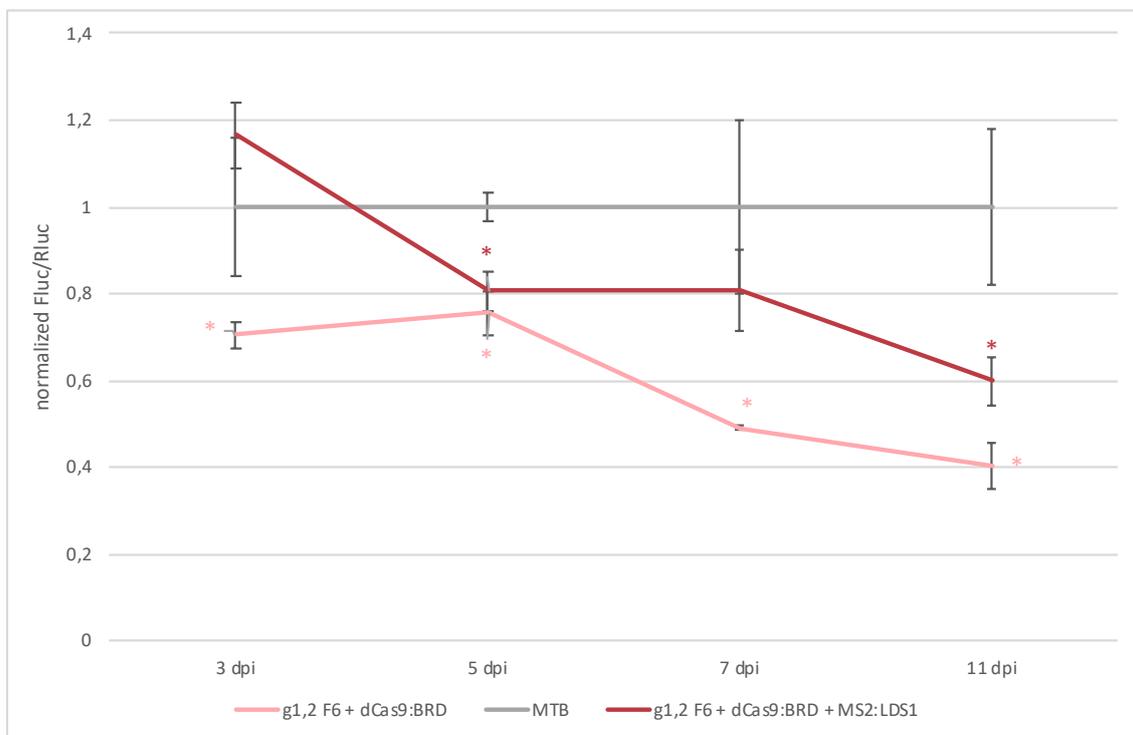


Figura 12. Gráfica que muestra la cinética obtenida a partir de muestras recolectadas a 3, 5, 7 y 11 dpi con dominios de represión sobre el promotor MTB en plantas WT. Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control (MTB), que se muestra de color gris (t de Student, α : 0,05).

Se observó que el dominio BRD fusionado a dCas9 era el que más represión conseguía, confirmando los resultados obtenidos en ensayos anteriores. Mostraba una represión significativamente diferente del control en todos los casos, y la represión máxima que se obtuvo fue de un 60% a los 11 días post-infiltración.

Esta cinética se realizó también con la combinación de dominios de activación con la que se habían obtenido los mejores resultados (dCas9:EDLL y MS2:VPR) junto a la combinación de guías utilizada para activación (guías 2, 3, 4 y 5).

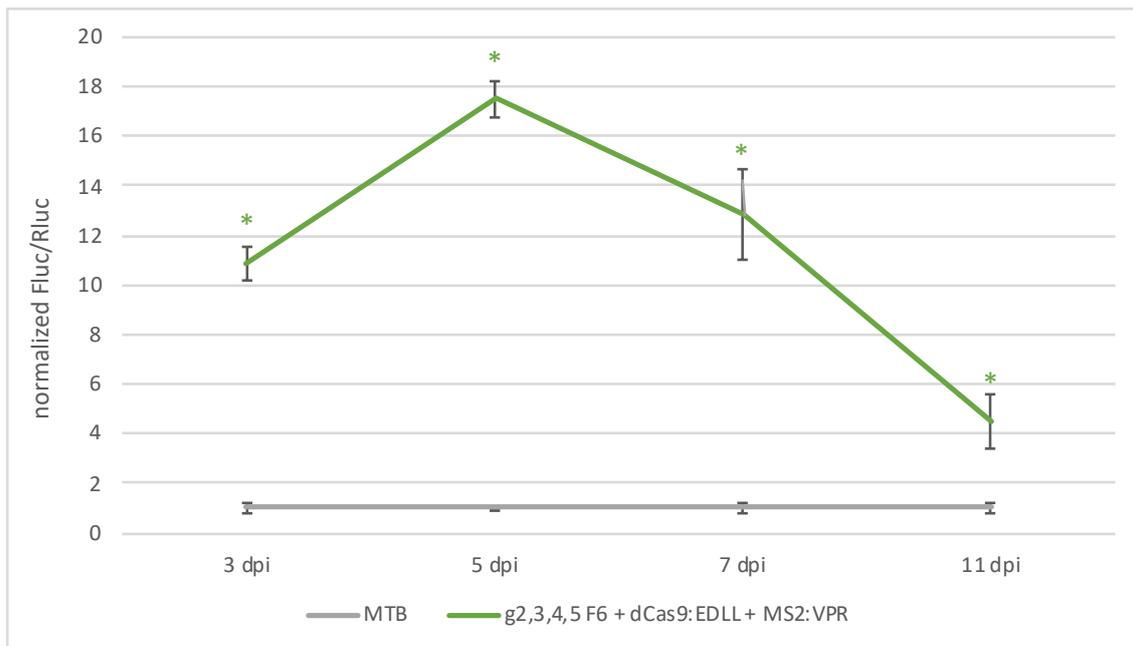


Figura 13. Gráfica que muestra la cinética obtenida a partir de muestras recolectadas a 3, 5, 7 y 11 dpi con la combinación de dominios de activación dCas9:EDLL y MS2:VPR sobre el promotor MTB en plantas WT. Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control (MTB), que se muestra de color gris (t de Student, α : 0,05).

Se observó que la mayor activación conseguida se daba a los 5 dpi, siendo de un 17X, aproximadamente.

4.3.4. Multiplexado

Para finalizar los ensayos en transitoria se diseñaron los guías 6 (+2 bp), 7 (+51 bp), 8 (+107 bp) y 9 (-56 bp), para abarcar nuevas posiciones. Como se ha explicado en el apartado Multiplexado o *multiplexing*, dentro del apartado 3.2.4.1., una de las construcciones de multiplexado era la de los guías 6, 8 y 9, y la otra, la de los guías 7, 8 y 9. Se probaron las diferentes construcciones de los guías con los dominios de represión utilizados anteriormente, dCas9:BRD y la combinación de dCas9:BRD y MS2:LSD1. Los nuevos guías se probaron sólo con dominios de represión porque las posiciones para las que habían sido diseñados eran favorables para ésta, ya que al reconocer zonas más cercanas al inicio de la transcripción se planteó la hipótesis de que inhibieran la transcripción por impedimento estérico, ya que los factores de transcripción no tendrían acceso a la hebra de ADN.

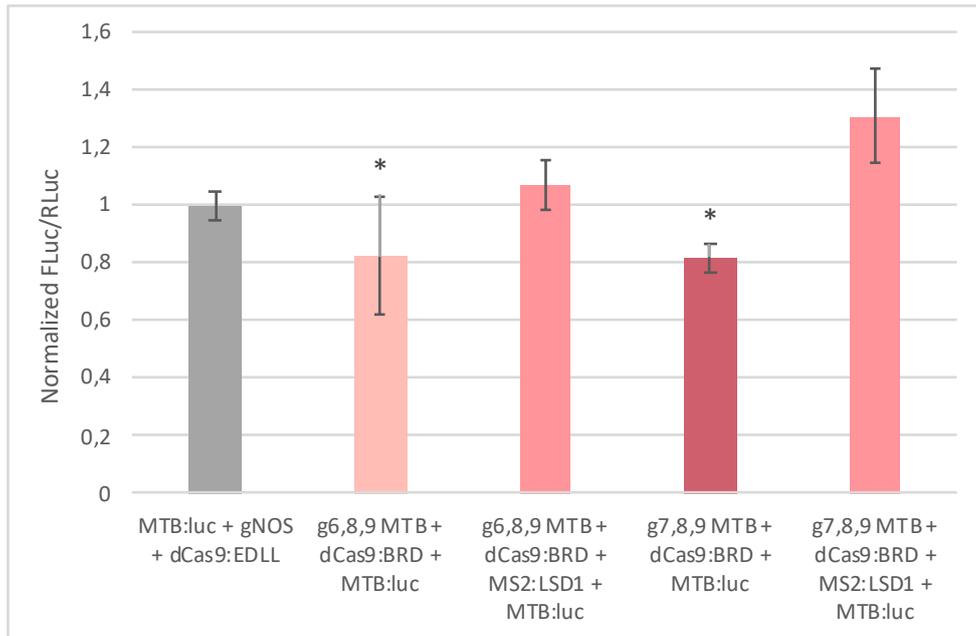


Figura 14. Gráfica del estudio del efecto de los nuevos guías (6, 7, 8 y 9) diseñados para la estrategia de multiplexado sobre el promotor MTB en plantas WT. Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control, que se muestra en la columna de la izquierda, de color gris (t de Student, α : 0,05).

Se observaron represiones significativas con las construcciones de los guías 6 (+2 bp), 8 (+107 bp) y 9 (-56 bp), y 7 (+51 bp), 8 (+107 bp) y 9 (-56 bp) junto con el dominio BRD fusionado a dCas9.

Posteriormente se probaron las nuevas construcciones con los guías de multiplexado en combinación con los guías ya utilizados anteriormente para represión (guías 1 y 2).

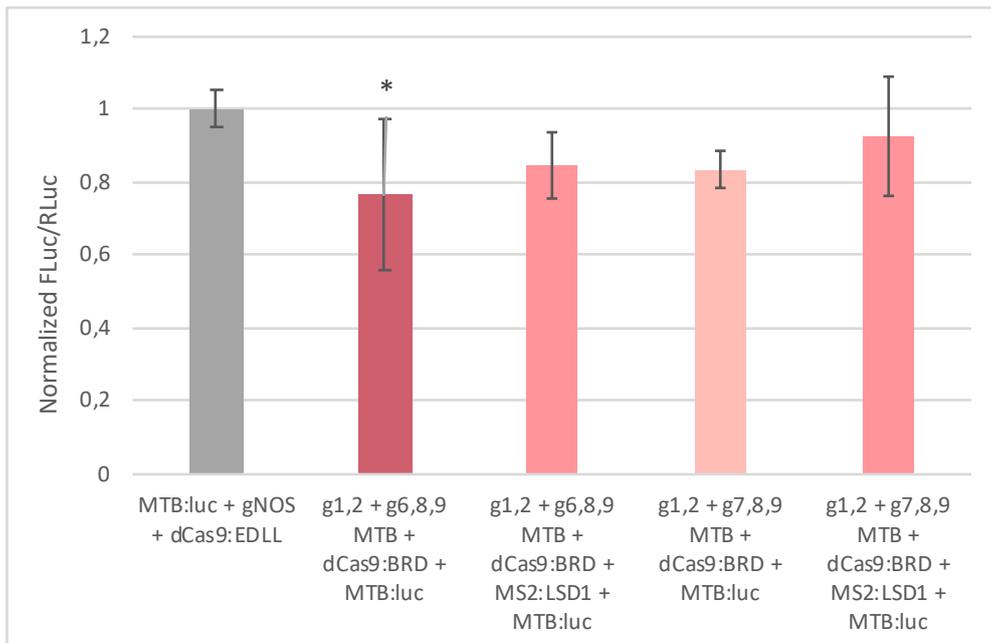


Figura 15. Gráfica del estudio del efecto de los nuevos guías diseñados para la estrategia de multiplexado junto con los guías utilizados para represión (1 y 2) sobre el promotor MTB en plantas WT. Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control, que se muestra en la columna de la izquierda, de color gris (t de Student, α : 0,05).

La única represión significativa que se consiguió fue la de la combinación de los guías 1 y 2 junto con la construcción de multiplexado de los guías 6, 8 y 9 y el dominio BRD fusionado a dCas9.

4.4. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN EN LÍNEAS REPORTERAS ESTABLES DE *NICOTIANA BENTHAMIANA*

Paralelamente a los ensayos realizados en plantas WT se realizaron ensayos en plantas con la construcción reportera incorporada de forma estable. Para éstos se partió de dos líneas de plantas transgénicas, las líneas 3 y 5. Tras realizar el análisis de poblaciones (apartado 4.2), se escogieron dos sublíneas de cada, las dos con mejores resultados en el recuento, y se realizó un ensayo de luciferasa para comprobar que expresaran los genes luciferasa (regulado bajo el promotor MTB) y renilla (regulado bajo el promotor 35S).

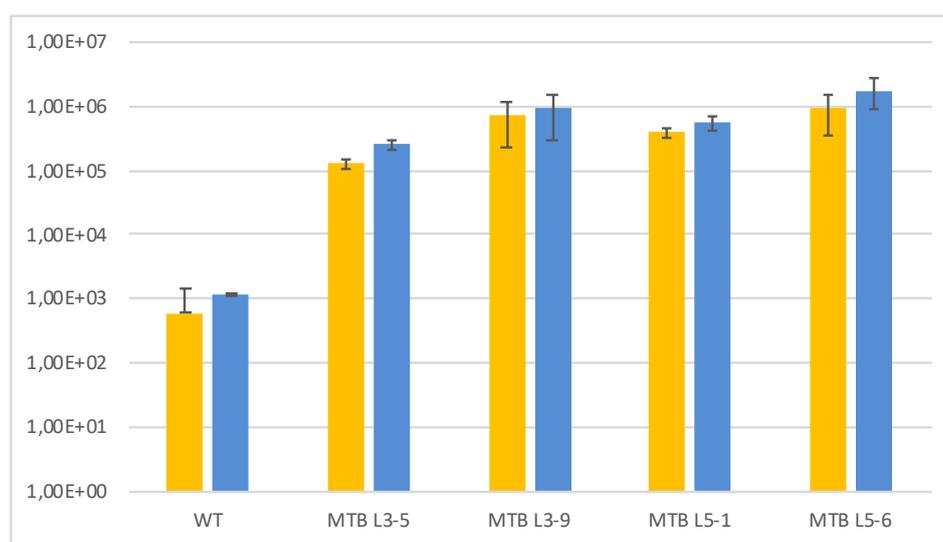


Figura 16. Gráfica que muestra los valores absolutos de niveles de expresión de luciferasa (a la izquierda, en color amarillo) y de renilla (a la derecha, en color azul). Los valores están expresados en escala logarítmica.

Se observó que todas las líneas mostraban expresión de ambos genes, por lo que tenían insertada en el genoma la construcción reportera.

4.4.1. Elección línea y estudio de dominios de activación y represión fusionados a dCas9

Para decidir cuál de las dos líneas utilizar para los ensayos se agroinfiltraron tres plantas de cada línea, una planta control, con el supresor de silenciamiento P19, un guía de otro promotor y dCas9 unida a un dominio de activación; otra planta con el dominio de activación VP64 y una tercera con el dominio de represión BRD.

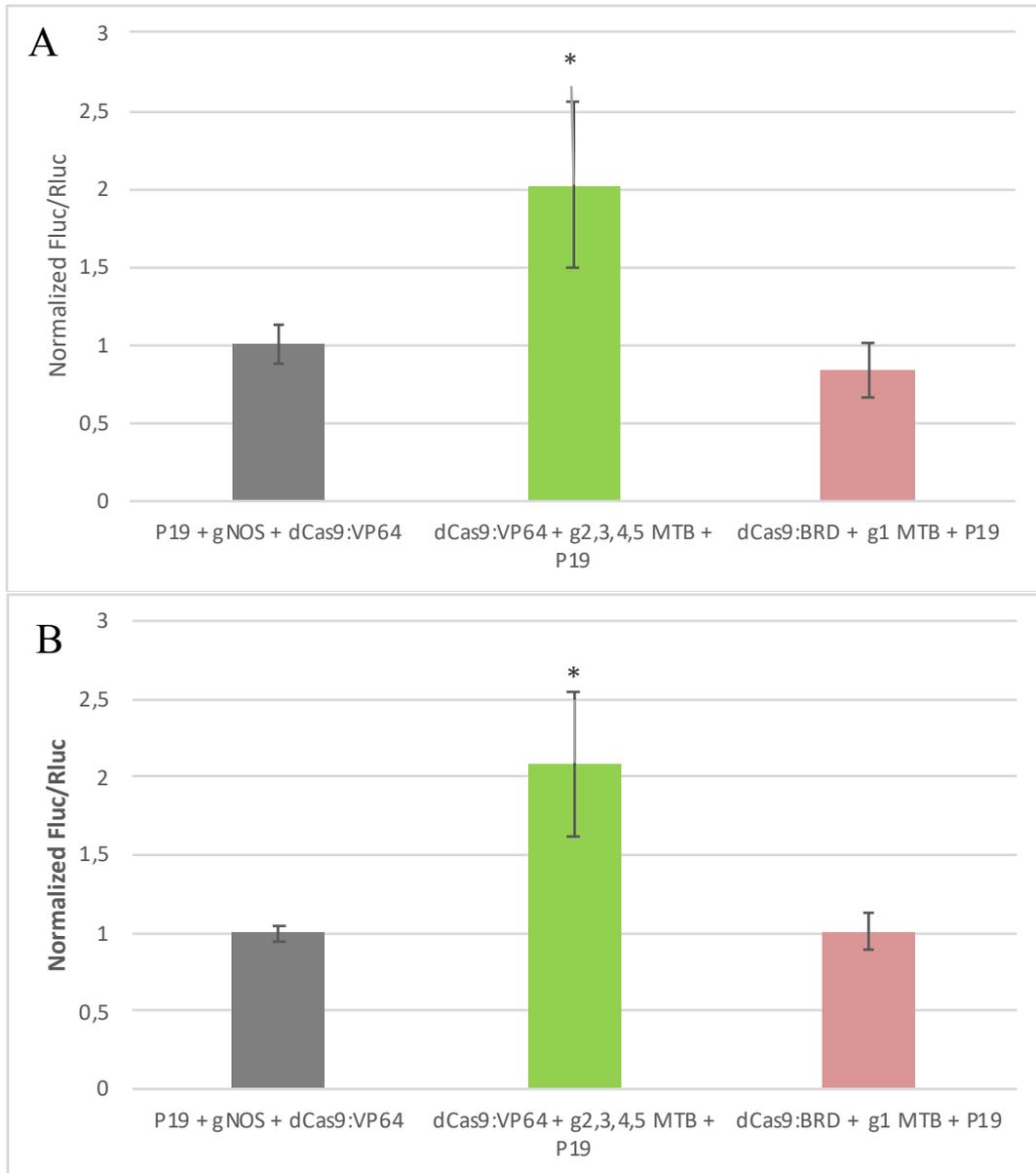


Figura 17. Gráficas del estudio del efecto de los dominios VP64 y BRD sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de las líneas reporteras estables 3-5 (A) y 5-1 (B). Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control, que se muestra en la columna de la izquierda, de color gris (t de Student, α : 0,05).

Únicamente se obtuvieron valores significativos en la activación, consiguiéndose unos niveles de expresión del 2X. Se pensó en utilizar más guías para represión, ya que en este ensayo sólo se había utilizado el guía 1 (-19 bp) por ser el más próximo a la caja TATA diseñado en ese momento.

Se repitió el ensayo, pero utilizando más guías para testar la represión. Se utilizaron los guías 1 (-19 bp), 2 (-98 bp) y 3 (-149 bp) junto con el dominio de represión BRD fusionado a dCas9. Para activación se utilizaron las mismas construcciones que en el ensayo anterior (Figura 17).

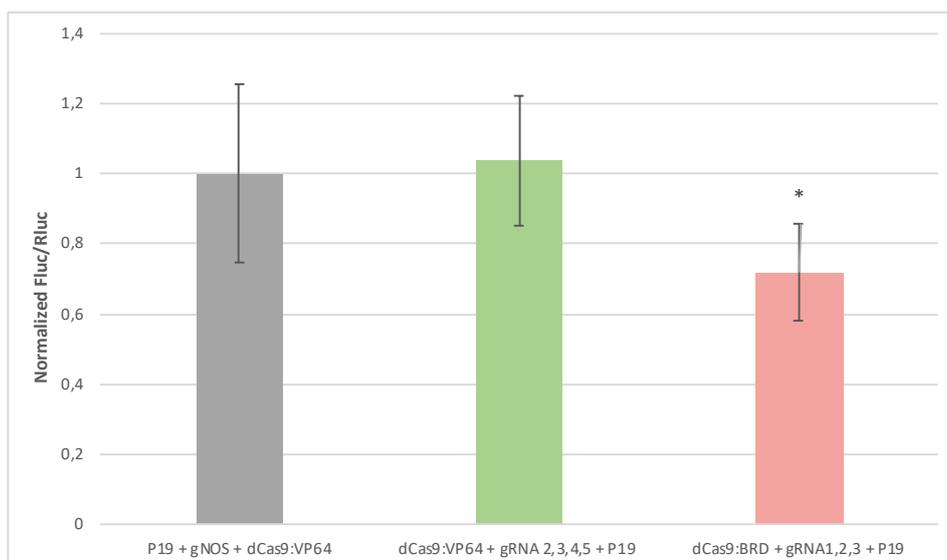


Figura 18. Gráfica del estudio del efecto de los dominios VP64 y BRD sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de la línea reportera estable 5-6. Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control, que se muestra en la columna de la izquierda, de color gris (t de Student, α : 0,05).

En este caso sí que se observó una represión significativa, por lo que se validó la hipótesis de que era necesaria la utilización de varios guías para conseguir represión. En este caso se consiguió una represión de aproximadamente un 30%. En cuanto a la activación, en este caso no se vio que fuera significativa. Se planteó la hipótesis de que la activación dependiera de las diferentes sublíneas, ya que en ensayos previos se había observado activación significativa tanto en la línea 5-1 como en la 3-5 (Figura 17).

A continuación, se probaron el dominio de activación VPR y el dominio de represión BRD, ambos fusionados a dCas9, en la línea transgénica 3-9. Se observó que en esta línea se conseguían unos resultados significativos tanto en activación como en represión.

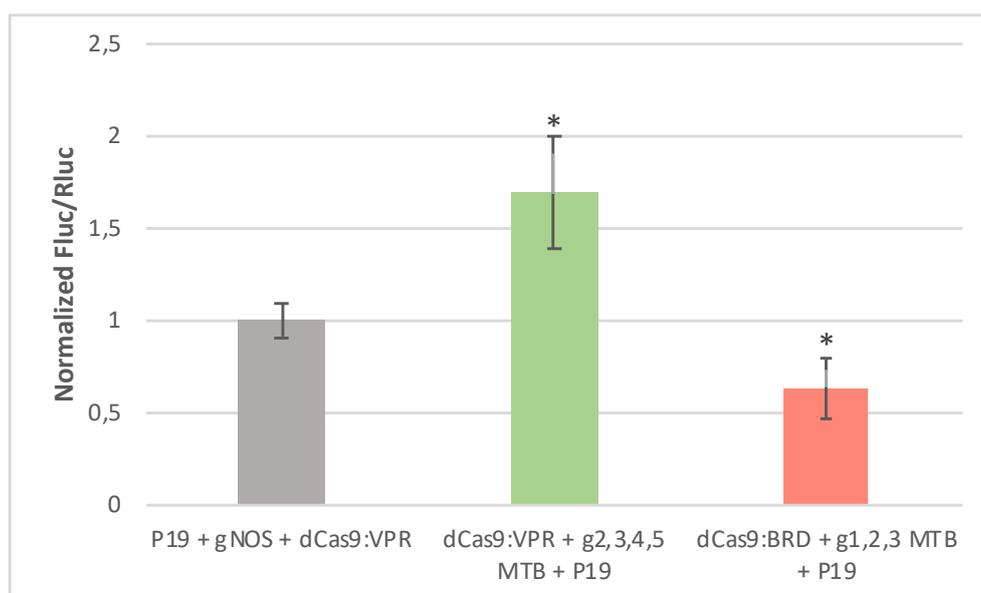


Figura 19. Gráfica del estudio del efecto de los dominios VPR y BRD sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de la línea reportera estable 3-9. Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control, que se muestra en la columna de la izquierda, de color gris (t de Student, α : 0,05).

Al haber observado represión significativa en ambas líneas, se decidió probar varios dominios de represión.

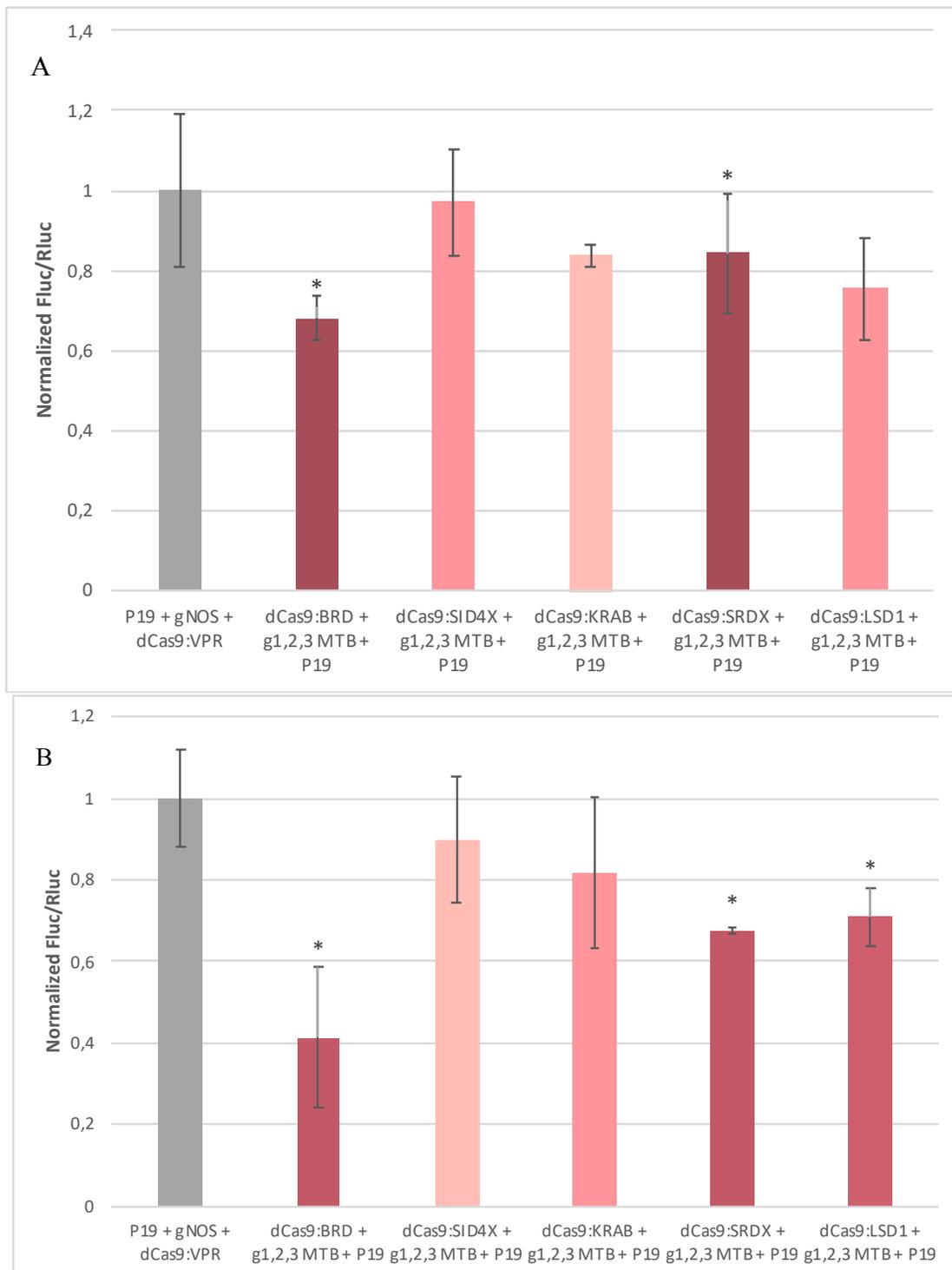


Figura 20. Gráficas del estudio del efecto de los dominios de represión BRD, SID4X, KRAB, SRDX y LSD1 sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de las líneas reporteras estables 3-9 (A) y 5-1 (B). Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control, que se muestra en la columna de la izquierda, de color gris (t de Student, α : 0,05).

Se obtuvieron represiones significativas con los dominios BRD y SRDX en ambas líneas, consiguiéndose además represión significativa con el dominio LSD1 en la línea 5-1. La mayor represión obtenida fue con el dominio BRD en esta línea, siendo de aproximadamente el 60%.

Tras la realización de los ensayos anteriores se decidió trabajar con la línea 3, ya que en esta línea se habían obtenido resultados significativos tanto en represión como en activación.

4.4.2. Estudio de dominios de activación utilizando la estrategia SAM

Al igual que en transitoria, al modificar los guías de ARN para el promotor MTB añadiendo dos copias del aptámero F6 de la proteína de la cápsula del virus MS2 para la realización de la estrategia SAM, se testaron diferentes combinaciones de dominios de activación para comprobar si la mejor combinación en expresión transitoria lo era también para modular la expresión en plantas transgénicas.

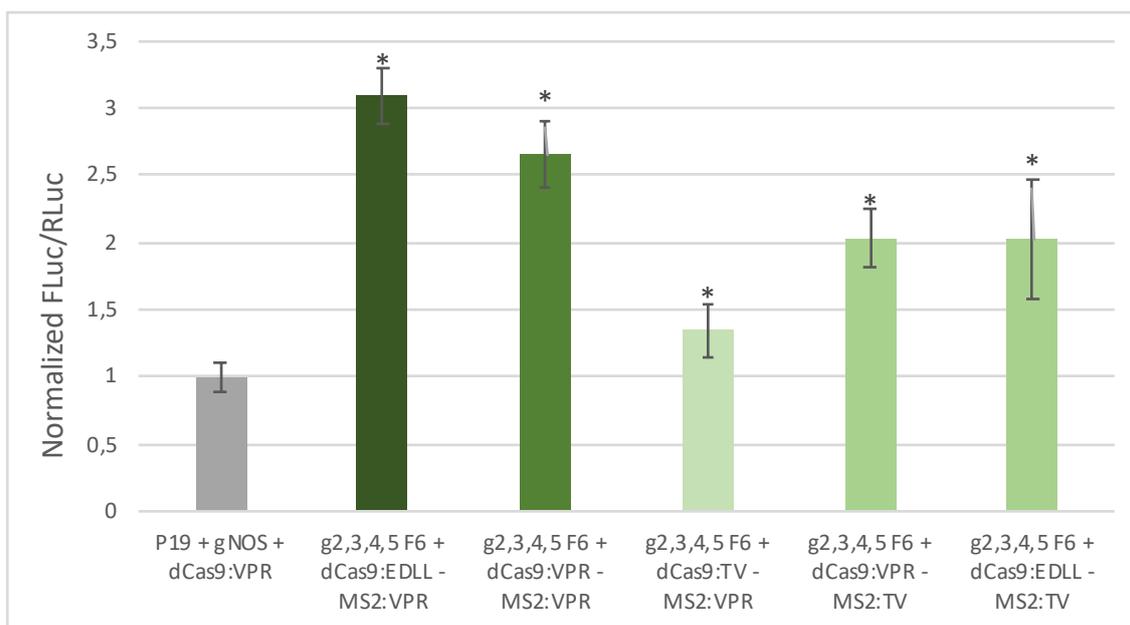


Figura 21. Gráfica del estudio de la combinación de dominios de activación, utilizando la estrategia SAM, sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de la línea reportera estable 3-9. Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control, que se muestra en la columna de la izquierda, de color gris (t de Student, α : 0,05).

Se observó que la misma combinación de dominios que conseguía una mayor activación en plantas WT también lo hacía en plantas transgénicas con la construcción reportera insertada. La combinación, por tanto, que se utilizó para ver el efecto de posición de los diferentes guías en la activación del promotor, fue el dominio EDLL fusionado a dCas9 junto con el dominio VPR fusionado a la proteína de la cápsula del virus MS2.

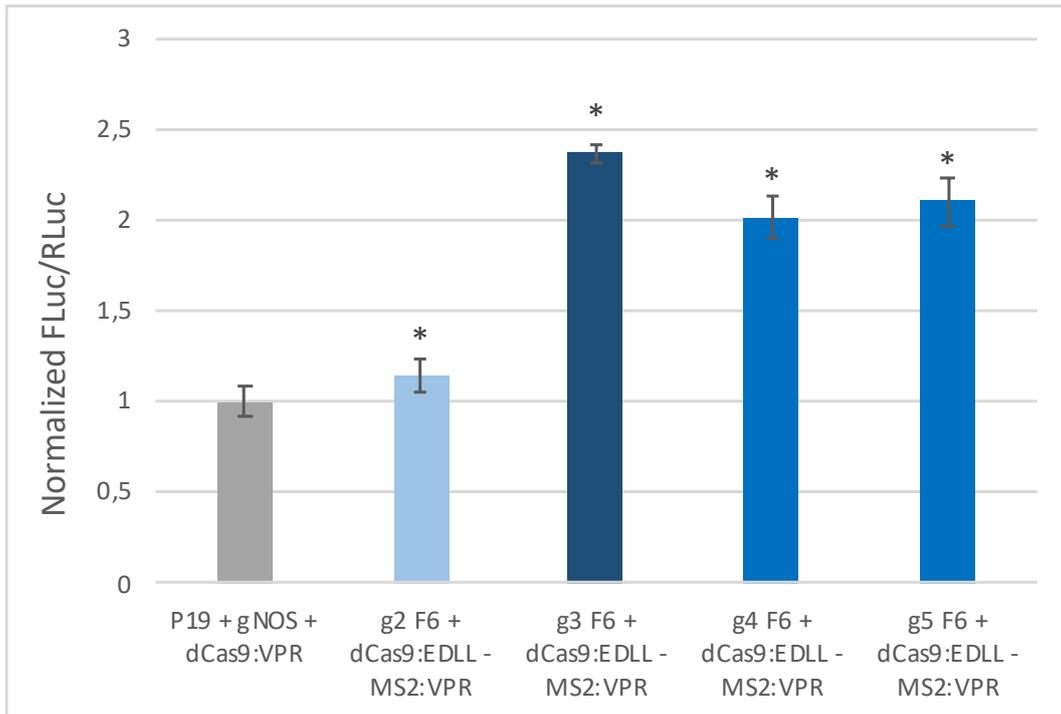


Figura 22. Gráfica del estudio del efecto de la posición de los diferentes guías de ARN modificados con el aptámero F6 de la proteína de la cápsula del virus MS2 diseñados sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de la línea reportera estable 3-9. Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control, que se muestra en la columna de la izquierda, de color gris (t de Student, α : 0,05).

De los resultados de este estudio se obtuvo que la mejor posición para activar era la posición del guía 3 (-148 bp), siendo la siguiente mejor posición la del guía 5 (-541 bp). Por tanto, tras haber realizado este ensayo de las posiciones de los guías tanto en plantas WT (Figura 11) como en líneas reporteras estables y haber obtenido que la posición del guía 3 era una buena posición para la activación, se determinó eliminar el guía 3 del conjunto de guías de ARN utilizado para represión.

4.4.3. Cinéticas

Al igual que en plantas WT, se realizó un ensayo para poder entender cómo cambiaban los niveles de proteína tras la infiltración según el tiempo. Para ello, se agroinfiltraron dos construcciones con dominios de represión junto los guías 1 y 2 y una combinación de dominios de activación y se recogió muestra a los 3, 5, 7 y 11 días post-infiltración.

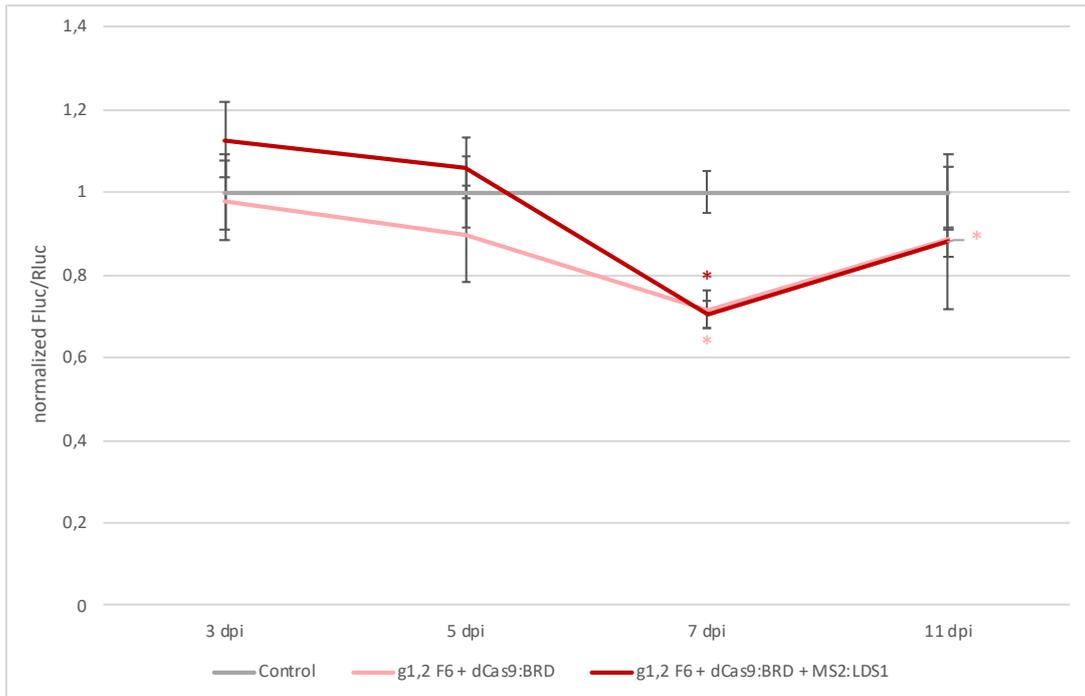


Figura 23. Gráfica que muestra la cinética obtenida a partir de muestras recolectadas a 3, 5, 7 y 11 dpi con dominios de represión sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de la línea reportera estable 3-9. Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control, que se muestra de color gris (t de Student, α : 0,05).

Se observaron represiones significativas a los 7 días post-infiltración, obteniendo una represión de un 30% tanto con el dominio BRD fusionado a dCas9 como con la misma construcción junto a LSD1 fusionado a la proteína de la cápsula del virus MS2.

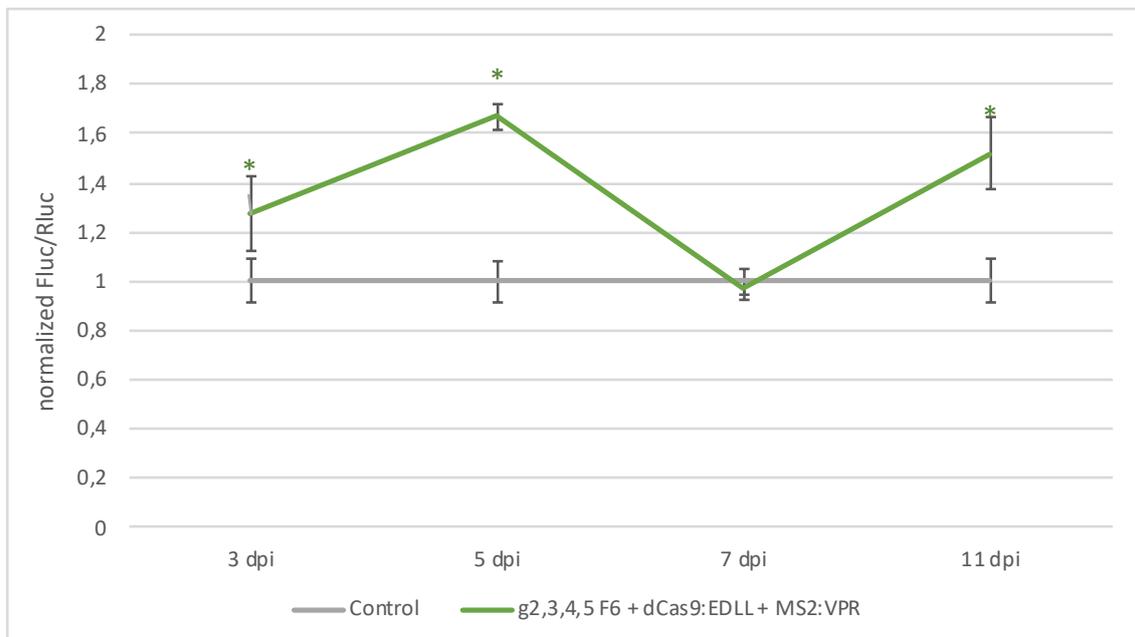


Figura 24. Gráfica que muestra la cinética obtenida a partir de muestras recolectadas a 3, 5, 7 y 11 dpi con la combinación de dominios de activación dCas9:EDLL y MS2:VPR sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de la línea reportera estable 3-9. Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control, que se muestra de color gris (t de Student, α : 0,05).

En cuanto a la activación, la mayor activación se observó a los 5 dpi, al igual que en transitoria, aunque se consiguieron valores muchos menores que en ésta, del 1,6X.

4.4.4. PCR cuantitativa (RT – qPCR)

Al observar diferencias significativas entre los resultados obtenidos en transitoria y los obtenidos en estable, sobre todo en cuanto a represión, se decidió hacer una PCR cuantitativa para poder observar los cambios a nivel de transcrito y compararlos con los cambios a nivel de proteína.

Con el dominio BRD fusionado a dCas9, con el que se había obtenido una represión del 70% en expresión transitoria (Figura 8) y un 35% en expresión estable (Figura 19) se agroinfiltró y se recogió muestra a 4 y 7 dpi.

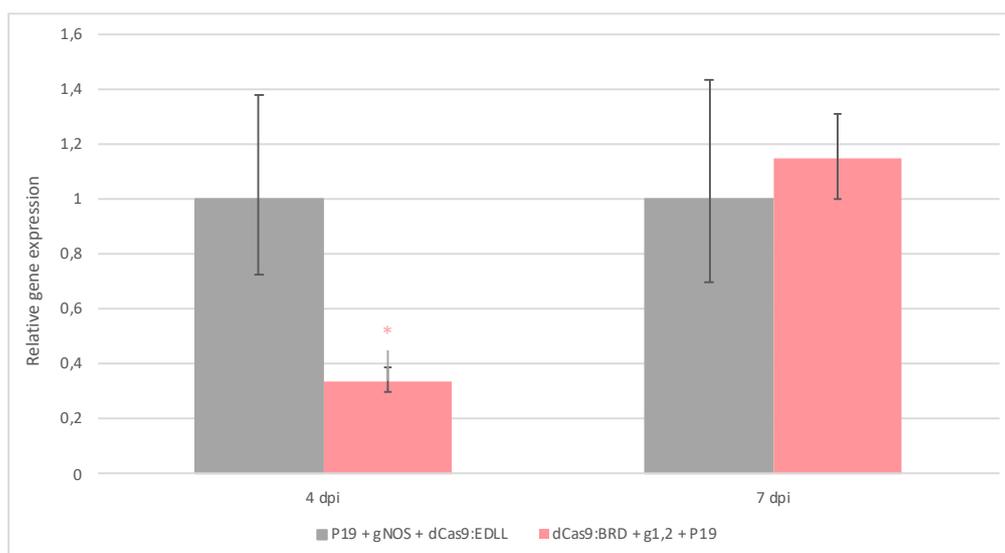


Figura 25. Gráfica que muestra los valores de cDNA obtenidos a partir de muestras recolectadas a 4 y 7 dpi con la construcción dCas9:BRD sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de la línea reportera estable 3-5. Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control, que se muestra en la columna de la izquierda, de color gris (t de Student, α : 0,05).

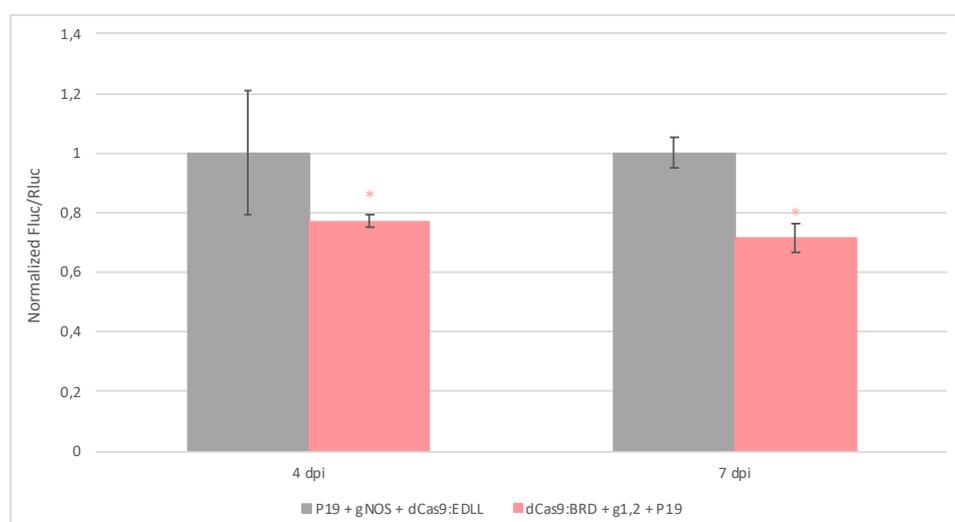


Figura 26. Gráfica que muestra los valores de luciferasa obtenidos a partir de muestras recolectadas a 4 y 7 dpi con la construcción dCas9:BRD sobre el promotor MTB en plantas transgénicas de la línea reportera estable 3-5. Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control, que se muestra en la columna de la izquierda, de color gris (t de Student, α : 0,05).

Al comparar ambas figuras se observa que la represión significativa a nivel de transcrito se observa a los 4 días post-infiltración, llegando a desaparecer el efecto de represión a los 7 dpi. En cambio, a nivel de proteína, cuando la represión es más significativa es a los 7 dpi.

4.5. COMPARACIÓN RESULTADOS EXPRESIÓN TRANSITORIA Y ESTABLE

Se realizó un ensayo para determinar las diferencias de expresión del gen luciferasa producidas entre las líneas reporteras transgénicas, en las que la construcción reportera está insertada de manera estable en el genoma, y las plantas WT en las que la construcción reportera se agroinfiltraba a una OD de 0,1.

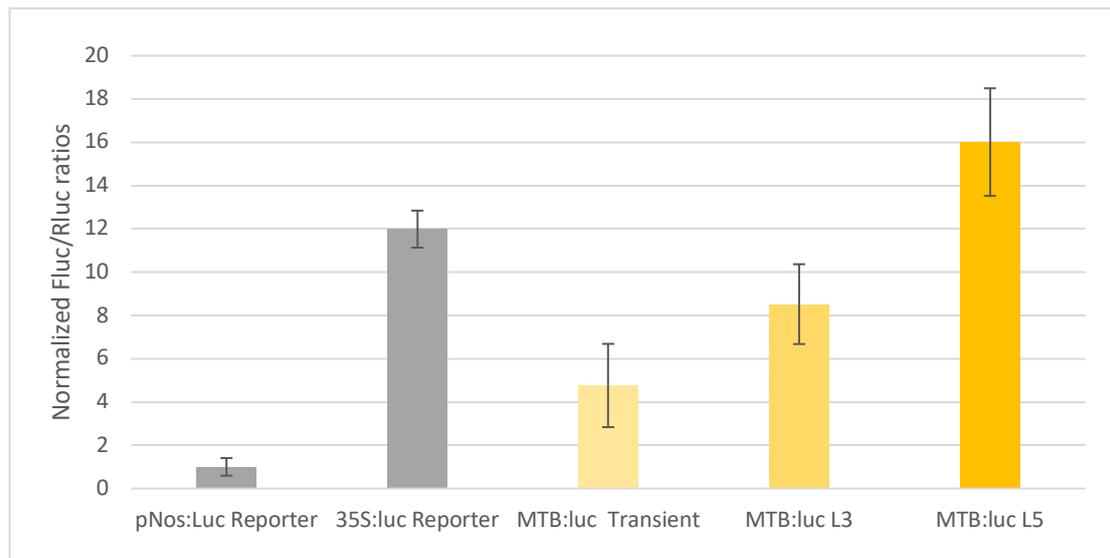


Figura 27. Gráfica que muestra los datos de expresión del gen luciferasa tanto infiltrada en una planta WT a una OD de 0,1 como en las diferentes líneas reporteras. A la izquierda, en gris se pueden observar los controles donde se ve la expresión del gen luciferasa bajo la regulación de los promotores NOS y 35S.

Tras observar las diferencias de expresión se decidió probar a activar la expresión del promotor MTB, mediante dos dominios de activación, VPR y TV fusionados a dCas9, junto con los guías utilizados para activación (2, 3, 4 y 5).

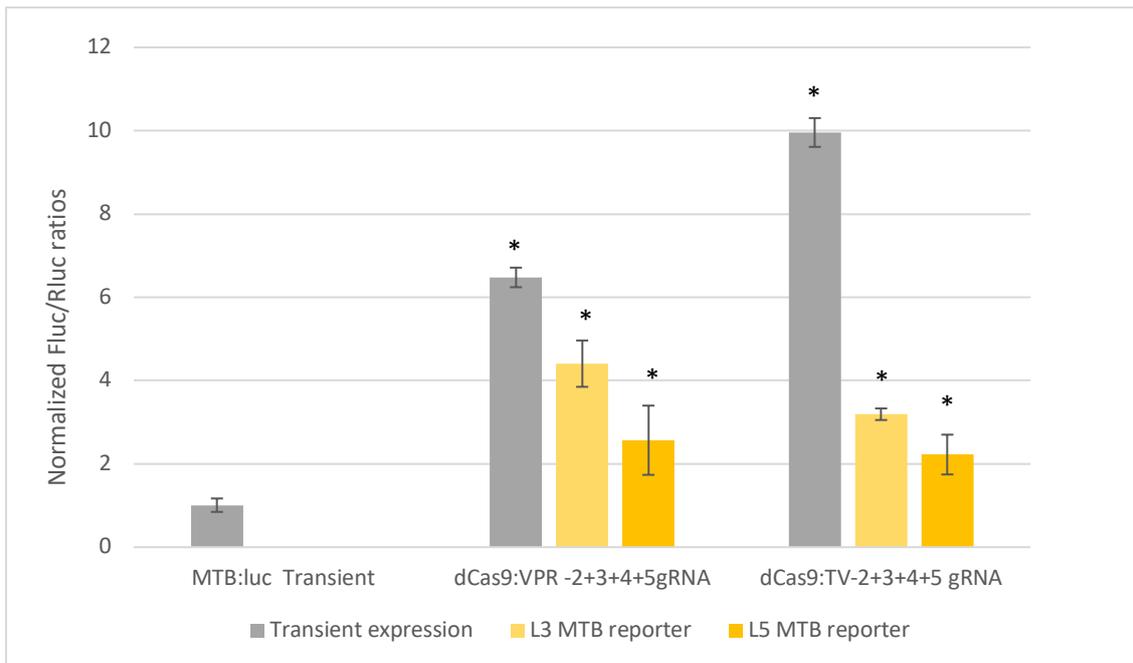


Figura 28. Gráfica que muestra las diferencias de expresión del gen luciferasa al activar el promotor MTB en planta WT con la construcción reportera infiltrada a una OD de 0,1 y en las diferentes líneas reporteras estables. Las columnas con asterisco (*) muestran valores significativamente diferentes del control (t de Student, α : 0,05).

Se observó que la mayor activación se conseguía en transitoria con el dominio TV fusionado a dCas9, llegándose a alcanzar niveles de expresión del 10X. Con el dominio VPR fusionado a dCas9 también se alcanzó la mayor activación en expresión transitoria, alcanzándose niveles del 6,5X aproximadamente.

Las siguientes activaciones más altas se obtuvieron en la línea reportera estable 3, alcanzándose niveles del 4X con el dominio VPR y del 3X con el dominio TV. Los niveles más bajos de activación se obtuvieron en la línea reportera estable 5, obteniéndose niveles de expresión de aproximadamente 2X con ambos dominios.

5. DISCUSIÓN

Al comparar los datos de los apartados 4.3 y 4.4, se observaron grandes diferencias entre los niveles de activación y represión obtenidos utilizando las mismas estrategias para la modulación.

En primer lugar, en cuanto a la activación, en transitoria se alcanzaron niveles de aproximadamente 23X (Figura 10). En cambio, en líneas reporteras estables sólo se obtuvo una activación del 3X (Figura 21). En trabajos previos en el laboratorio se habían conseguido buenos resultados de activación, por lo que planteó como hipótesis que la susceptibilidad de activación fuera dependiente de las diferentes sublíneas, por el efecto de la posición del gen y la actividad basal del promotor. Según esta hipótesis, si la sublínea ya tuviera mucha expresión basal de los genes luciferasa y renilla porque la construcción reportera se hubiera insertado en una zona del genoma con mucha expresión, la capacidad para aumentar la transcripción del gen luciferasa sería menor. Los datos que apoyan esta hipótesis están presentes en las Figuras 27 y 28 del apartado 4.5. Al comparar ambas figuras se pudo observar que la mayor activación se producía en expresión transitoria, es decir, en la que la construcción reportera había sido agroinfiltrada a una OD de 0,1. Ésta coincidía con la construcción con la que se obtenía menor actividad basal del promotor (Figura 27). La siguiente línea con la que se obtenía menor expresión basal era la línea 3, línea con la que se obtenía una menor activación que en transitoria. La línea 5 era la línea que presentaba una mayor expresión basal y, por tanto, una menor activación.

En cuanto a la represión, la mayor represión que se obtuvo a nivel de proteína en transitoria fue del 70% (Figura 8), con el dominio de represión BRD fusionado a dCas9. Sin embargo, en estable la mayor represión que se obtuvo fue en estable fue del 35% (Figura 19), utilizando la misma construcción. En cuanto al ensayo realizado de la PCR cuantitativa, se observó que, a nivel de transcrito, a los 4 días post-infiltración se obtuvieron unos niveles de represión del 60% (Figura 26), más cercanos a los niveles obtenidos a nivel de proteína en transitoria.

Por lo que respecta a la represión se plantearon dos hipótesis. En primer lugar y tras observar las Figuras 26 y 27, en las que se puede comparar la represión a nivel de transcrito y a nivel de proteína, se pensó que para observar represión quizá la recolección de muestra a los 5 días post-infiltración no era la óptima, ya que los valores de represión a nivel de proteína no se empiezan a observar hasta los 7 días post-infiltración, siendo quizá este el día óptimo para su recolección. Esta hipótesis se corrobora al observar las Figuras 12 y 24.

En segundo lugar, se planteó la hipótesis de que la imposibilidad obtener unos niveles de represión como los esperados podría ser debida a la actividad helicasa de la endonucleasa Cas9. Debido a esta actividad, para que los guías de ARN puedan hibridar con el ADN en el lugar correspondiente, Cas9 provoca una separación de la doble cadena de ADN. Al realizar esta separación, se pensó que la maquinaria de transcripción podría acceder más fácilmente, contrarrestando el efecto de los dominios de represión.

6. CONCLUSIONES

Tras la realización de este trabajo y el análisis de resultados se puede concluir que es necesario continuar el estudio de los mecanismos de regulación transcripción para poder comprender su funcionamiento y utilizarlos posteriormente en producción de metabolitos en plantas o *biopharming*.

En general, no se obtuvieron los resultados esperados, ya que el objetivo de este trabajo era conseguir resultados de activación y represión eficientes, sobre todo de esta última, en líneas reporteras estables.

En cuanto a la activación, se obtuvieron resultados positivos en expresión transitoria. Sin embargo, para la activación es necesario profundizar en la hipótesis de la influencia de la susceptibilidad de activación según la posición del gen en el genoma y la activación basal del promotor en esa zona, estudiándose otras líneas.

Por lo que respecta a la represión, en futuras investigaciones debería perseguirse una eficiencia de represión en estable similar a la de transitoria, buscando nuevas posiciones de los guías, utilizando diferentes combinaciones de dominios, etc.

En ambos casos, un posible abordaje para continuar el estudio podría ser la modulación de genes endógenos, para testar cómo afecta la posición de esos genes en el genoma a la susceptibilidad de modulación.

7. BIBLIOGRAFÍA

BORTESI, L. y FISCHER, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33(1), pp.41-52.

BRENNER, S., MILLER, J. y BROUGHTON, W. (2002). *Encyclopedia of genetics*. San Diego: Academic Press, pp.1678 - 1679.

CHAVEZ, A., SCHEIMAN, J., VORA, S., PRUITT, B., TUTTLE, M., P R IYER, E., LIN, S., KIANI, S., GUZMAN, C., WIEGAND, D., TER-OVANESYAN, D., BRAFF, J., DAVIDSOHN, N., HOUSDEN, B., PERRIMON, N., WEISS, R., AACH, J., COLLINS, J. y CHURCH, G. (2015). Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nature Methods*, 12(4), pp.326-328.

CHEN, Y., JIE, W., YAN, W., ZHOU, K. y XIAO, Y. (2012). Lysine-specific histone demethylase 1 (LSD1): A potential molecular target for tumor therapy. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 22(1), pp.53-59.

DELLAPENNA, D. (2001). Plant Metabolic Engineering. *Plant Physiology*, 125(1), pp.160-163.

EILERS, A., BILLIN, A., LIU, J. y AYER, D. (1999). A 13-Amino Acid Amphipathic α -Helix Is Required for the Functional Interaction between the Transcriptional Repressor Mad1 and mSin3A. *Journal of Biological Chemistry*, 274(46), pp.32750-32756.

GOLDEN BRAID 3.0. A Digital Toolbox for Plant Synthetic Biology [online], (2011). Disponible en: <https://gbccloning.upv.es/> [Consulta: 1 abril 2018].

GRÄSLUND, T., LI, X., MAGNENAT, L., POPKOV, M. y BARBAS, C. (2004). Exploring Strategies for the Design of Artificial Transcription Factors. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), pp.3707-3714.

HAGMANN, M., GEORGIEV, O. y SCHAFFNER, W. (1997). The VP16 Paradox: Herpes Simplex Virus VP16 contains a long-range activation domain but within the natural multiprotein complex activates only from promoter-proximal positions. *Journal of Virology*, 71(8), pp.5952-5962.

IKEDA, M. y OHME-TAKAGI, M. (2009). A Novel Group of Transcriptional Repressors in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 50(5), pp.970-975.

KAGALE, S. y ROZWADOWSKI, K. (2011). EAR motif-mediated transcriptional repression in plants. *Epigenetics*, 6(2), pp.141-146.

KEARNS, N., PHAM, H., TABAK, B., GENGA, R., SILVERSTEIN, N., GARBER, M. y MAEHR, R. (2015). Functional annotation of native enhancers with a Cas9–histone demethylase fusion. *Nature Methods*, 12(5), pp.401-403.

KIANI, S., CHAVEZ, A., TUTTLE, M., HALL, R., CHARI, R., TER-OVANESYAN, D., QIAN, J., PRUITT, B., BEAL, J., VORA, S., BUCHTHAL, J., KOWAL, E., EBRAHIMKHANI, M., COLLINS, J., WEISS, R. y CHURCH, G. (2015). Cas9 gRNA engineering for genome editing, activation and repression. *Nature Methods*, 12(11), pp.1051-1054.

KONERMANN, S., BRIGHAM, M., TREVINO, A., JOUNG, J., ABUDAYYEH, O., BARCENA, C., HSU, P., HABIB, N., GOOTENBERG, J., NISHIMASU, H., NUREKI, O. y

- ZHANG, F. (2014). Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 517(7536), pp.583-588.
- KROGAN, N. y LONG, J. (2009). Why so repressed? Turning off transcription during plant growth and development. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(5), pp.628-636.
- LI, J., NORVILLE, J., AACH, J., MCCORMACK, M., ZHANG, D., BUSH, J., CHURCH, G. y SHEEN, J. (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, 31(8), pp.688-691.
- LI, Z., ZHANG, D., XIONG, X., YAN, B., XIE, W., SHEEN, J. y LI, J. (2017). A potent Cas9-derived gene activator for plant and mammalian cells. *Nature Plants*, 3(12), pp.930-936.
- LIU, W. y STEWART, C. (2015). Plant synthetic biology. *Trends in Plant Science*, 20(5), pp.309-317.
- LIU, X., WU, S., XU, J., SUI, C. y WEI, J. (2017). Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(3), pp.292-302.
- LOWDER, L., ZHANG, D., BALTES, N., PAUL, J., TANG, X., ZHENG, X., VOYTAS, D., HSIEH, T., ZHANG, Y. y QI, Y. (2015). A CRISPR/Cas9 Toolbox for Multiplexed Plant Genome Editing and Transcriptional Regulation. *Plant Physiology*, 169(2), pp.971-985.
- MARGOLIN, J., FRIEDMAN, J., MEYER, W., VISSING, H., THIESEN, H. y RAUSCHER, F. (1994). Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(10), pp.4509-4513.
- MOJICA, F., DÍEZ-VILLASEÑOR, C., GARCÍA-MARTÍNEZ, J. y SORIA, E. (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), pp.174-182.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, NCBI (2018). Real-Time qRT-PCR [online]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/> [Consulta: 16 Mayo 2018]
- NEMHAUSER, J. y TORII, K. (2016). Plant synthetic biology for molecular engineering of signalling and development. *Nature Plants*, 2(3), p.16010.
- OBEMBE, O., POPOOLA, J., LEELAVATHI, S. y REDDY, S. (2011). Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances*, 29(2), pp.210-222.
- PARROTT, A., LAGO, H., ADAMS, C., ASHCROFT, A., STONEHOUSE, N. y STOCKLEY, P. (2000). RNA aptamers for the MS2 bacteriophage coat protein and the wild-type RNA operator have similar solution behaviour. *Nucleic Acids Research*, 28(2), pp.489-497.
- PIATEK, A., ALI, Z., BAAZIM, H., LI, L., ABULFARAJ, A., AL-SHAREEF, S., AOUIDA, M. y MAHFOUZ, M. (2014). RNA-guided transcriptional regulation in plant via synthetic dCas9-based transcription factors. *Plant Biotechnology Journal*, 13(4), pp.578-589.
- RAN, F., HSU, P., WRIGHT, J., AGARWALA, V., SCOTT, D. y ZHANG, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), pp.2281-2308.
- REVEL, H. y GEORGOPOULOS, C. (1969). Restriction of nonglycosylated T-even bacteriophages by prophage P1. *Virology*, 39(1), pp.1-17.

SCHIML, S., FAUSER, F. y PUCHTA, H. (2014). The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for plant gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in Arabidopsis resulting in heritable progeny. *The Plant Journal*, 80(6), pp.1139-1150.

STEGE, J., GUAN, X., HO, T., BEACHY, R. y BARBAS, C. (2002). Controlling gene expression in plants using synthetic zinc finger transcription factors. *The Plant Journal*, 32(6), pp.1077-1086.

SHAN, Q., WANG, Y., LI, J., ZHANG, Y., CHEN, K., LIANG, Z., ZHANG, K., LIU, J., XI, J. y QIU, J. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(8), pp. 686 – 688.

TATSIS, E. y O'CONNOR, S. (2016). New developments in engineering plant metabolic pathways. *Current Opinion in Biotechnology*, 42, pp.126-132.

THE JACKSON LABORATORY. (n.d.). Pros and cons of the ZFNs, TALENs and CRISPR/Cas. [online] Disponible en: <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2014/march/pros-and-cons-of-znfs-talens-and-crispr-cas#> [Consulta: 4 Abril 2018].

TIWARI, S., BELACHEW, A., MA, S., YOUNG, M., ADE, J., SHEN, Y., MARION, C., HOLTAN, H., BAILEY, A., STONE, J., EDWARDS, L., WALLACE, A., CANALES, R., ADAM, L., RATCLIFFE, O. y REPETTI, P. (2012). The EDLL motif: a potent plant transcriptional activation domain from AP2/ERF transcription factors. *The Plant Journal*, 70(5), pp.855-865.

UNIVERSITY OF LEICESTER (2018). *Recombinant DNA and genetic techniques* [online]. Disponible en: <https://www2.le.ac.uk/projects/vgec/highereducation/topics/recombinanttechniques> [Consulta: 22 Mayo 2018]

VALERO MARTÍNEZ, MC. (2016). Optimización de la técnica de Agroinfección para la producción de proteínas en plantas de *N. benthamiana*. Trabajo Final de Máster. Valencia: Universitat Politècnica de València.

VÁZQUEZ-VILAR, M., BERNABÉ-ORTS, J., FERNÁNDEZ-DEL-CARMEN, A., ZIARSOLO, P., BLANCA, J., GRANELL, A. y ORZÁEZ, D. (2016). A modular toolbox for gRNA–Cas9 genome engineering in plants based on the GoldenBraid standard. *Plant Methods*, 12(1).

VÁZQUEZ-VILAR, M., QUIJANO-RUBIO, A., FERNÁNDEZ-DEL-CARMEN, A., SARRION-PERDIGONES, A., OCHOA-FERNÁNDEZ, R., ZIARSOLO, P., BLANCA, J., GRANELL, A. y ORZÁEZ, D. (2017). GB3.0: a platform for plant bio-design that connects functional DNA elements with associated biological data. *Nucleic Acids Research*, p.1326.

WANG, S., SU, J., ZHANG, F. Y ZHUANG, X. (2016). An RNA-aptamer-based two-color CRISPR labeling system. *Scientific Reports*, 6(1).

WOOD, A., LO, T., ZEITLER, B., PICKLE, C., RALSTON, E., LEE, A., AMORA, R., MILLER, J., LEUNG, E., MENG, X., ZHANG, L., REBAR, E., GREGORY, P., URNOV, F. y MEYER, B. (2011). Targeted Genome Editing Across Species Using ZFNs and TALENs. *Science*, 333(6040), pp.307-307.

YING, Y., YANG, X., ZHAO, K., MAO, J., KUANG, Y., WANG, Z., SUN, R. y FEI, J. (2015). The Krüppel-associated box repressor domain induces reversible and irreversible regulation of

endogenous mouse genes by mediating different chromatin states. *Nucleic Acids Research*, 43(3), pp.1549-1561.

ZALATAN, J., LEE, M., ALMEIDA, R., GILBERT, L., WHITEHEAD, E., LA RUSSA, M., TSAI, J., WEISSMAN, J., DUEBER, J., QI, L. y LIM, W. (2015). Engineering Complex Synthetic Transcriptional Programs with CRISPR RNA Scaffolds. *Cell*, 160(1-2), pp.339-350.