

Resumen

La Biología Sintética de Plantas tiene como objetivo rediseñar las plantas para que adquieran características y funcionalidades novedosas a través de circuitos reguladores ortogonales. Para lograr este objetivo, se deben desarrollar nuevas herramientas moleculares con la capacidad de interactuar con factores endógenos de manera potente y específica. CRISPR/Cas9 surgió como una herramienta prometedora que combina la capacidad personalizable de unión al DNA, a través de la versión catalíticamente inactivada de la proteína Cas9 (dCas9), con la posibilidad de anclar dominios autónomos de activación transcripcional (TADs) a su estructura para lograr una regulación específica de la expresión génica. Los activadores transcripcionales programables (PTAs) pueden actuar como procesadores específicos, ortogonales y versátiles para el desarrollo de nuevos circuitos genéticos en las plantas. En busca de dCas9-PTA optimizados, se llevó a cabo una evaluación combinatoria de diferentes arquitecturas dCas9 con un catálogo de varios TAD. La mejor herramienta resultante de esta comparación, denominada dCasEV2.1, se basa en la estrategia scRNA y la combinación de los dominios de activación EDLL y VPR con un bucle multiplexable gRNA2.1, que es una versión mutada del gRNA2.0 descrito previamente. En este trabajo, el activador programable dCasEV2.1 demostró ser una herramienta potente y específica, logrando tasas de activación más altas que otras estrategias dCas9 disponibles en plantas. Se observaron tasas de activación sin precedentes dirigidas a genes endógenos en *N. benthamiana*, acompañadas de una estricta especificidad en todo el genoma, lo que hace que esta herramienta sea adecuada para la regulación estricta de redes reguladoras complejas. Como prueba de concepto, se diseñaron cuatro programas de activación para distintas ramas de la ruta de los flavonoides, buscando obtener enriquecimientos metabólicos específicos en hojas de *N. benthamiana*. El análisis metabólico de las hojas metabólicamente reprogramadas mediante dCasEV2.1 reveló un enriquecimiento selectivo de los metabolitos diana y sus derivados glicosilados, que se correlacionaron con el programa de activación empleado. Estos resultados demuestran que dCasEV2.1 es una herramienta eficaz para la ingeniería metabólica y un componente clave en los circuitos genéticos destinados a reprogramar los flujos metabólicos. Finalmente, basándonos en dCasEV2.1, desarrollamos un sistema optimizado de regulación de genes

inducidos por virus (VIGR) que utiliza un vector Potato Virus X (PVX) para el suministro de los programas de activación CRISPR codificados con gRNA. Este enfoque permite controlar el transcriptoma de la planta a través de una aplicación sistémica basada en aerosol de componentes CRISPR a plantas adultas. El nuevo sistema PVX-VIGR produjo una fuerte activación transcripcional en varios genes diana endógenos, incluidos tres factores de transcripción MYB-like seleccionados. Las activaciones específicas de MYB condujeron a perfiles metabólicos distintivos, demostrando que las aplicaciones potenciales de la herramienta dCasEV2.1 en plantas incluyen la obtención de perfiles metabólicos personalizados utilizando un suministro basado en aerosol de instrucciones de reprogramación transcripcional codificadas por gRNA. En resumen, esta tesis proporciona herramientas novedosas para la activación transcripcional fuerte, ortogonal y programable en plantas, con una caja de herramientas ampliada para el suministro de los programas de activación.