



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y Celular de Plantas

Puesta a punto de un sistema de evolución dirigida en
plantas mediada por CRISPR.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Hoyas Sánchez, Eva

Tutor/a: Niñosles Rodenes, Regina

Director/a Experimental: VAZQUEZ VILAR, MARTA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

Puesta a punto de un sistema de evolución dirigida en planta mediada por CRISPR

Trabajo Fin de Máster

Realizado por: Eva Hoyas Sánchez

Dirigido por: Regina Niñoles Rodenes y Marta Vázquez Vilar

Valencia, enero de 2023

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a Fabrizio por ayudarme a coger las riendas de este proyecto y tenderme la mano siempre que le he necesitado. A mi tutora Regina, por ser un referente tanto personal como profesional, por acogerme en su laboratorio con los brazos abiertos y por el apoyo constante. A mi tutora Marta, por los conocimientos y la oportunidad de aprender de ella. A mis compis Dani, Jose, Sepideh y Pepe, por estar siempre ahí y hacerme sentir como en casa. Por último, agradecer a todos mis amigos y familia por el ánimo y cariño que me han dado durante todos estos años.

INDICE

1	Resumen.....	8
2	Abstract.....	9
3	Introducción.....	10
3.1	Mejora genética de plantas y técnicas de edición genética.....	10
3.2	Sistema CRISPR/Cas.....	11
3.2.1	Fundamentos y componentes.....	11
3.2.2	Aplicaciones del sistema CRISPR/Cas.....	13
3.3	Técnicas de “base-editing”.....	14
3.3.1	Fundamentos y componentes.....	14
3.3.2	Tipos de editores.....	15
3.3.3	Aplicaciones del base-editing.....	17
3.4	Clonaje modular para facilitar el ensamblaje de editores de bases.....	18
3.5	<i>Nicotiana benthamiana</i> como sistema modelo.....	19
4	Objetivos.....	20
5	Materiales y métodos.....	21
5.1	Material vegetal.....	21
5.2	Cultivo y manipulación de microorganismos.....	21
5.2.1	Cepas y condiciones de crecimiento.....	21
5.2.2	Medios de crecimiento de bacterias.....	21
5.2.3	Transformación de <i>Escherichia coli</i>	22
5.2.4	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
5.3	Manipulación y purificación de ácidos nucleicos.....	22
5.3.1	Extracción de DNA genómico.....	22
5.3.2	Extracción de DNA plasmídico.....	23
5.3.3	Digestión de DNA con enzimas de restricción.....	23
5.3.4	Electroforesis en gel de agarosa.....	23
5.3.5	Amplificación por PCR.....	23
5.3.6	Purificación del producto de PCR.....	24
5.3.7	Secuenciación Sanger.....	24
5.4	Ensamblaje mediante GoldenBraid (GB).....	25
5.4.1	Ensamblaje de gRNAs de Cas9.....	25
5.4.2	Ensamblaje de gRNAs de Cas12.....	26
5.4.3	Ensamblaje de módulos Cas.....	27
5.4.4	Ensamblaje binario.....	29
5.5	Ensayos de expresión transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i>	29

6	Resultados.....	30
6.1	Diseño y ensamblaje de construcciones CRISPR/Cas para base-editing.....	30
6.1.1	Diseño y ensamblaje de módulos Cas.....	31
6.1.2	Diseño y ensamblaje de los gRNAs.....	34
6.2	Ensayo de edición genética: expresión transitoria en <i>cis</i> vs en <i>trans</i>	36
6.2.1	Ensamblaje binario de las construcciones GB10-FT y GB11-FT.....	36
6.2.2	Comparativa de edición genética: expresión <i>cis</i> vs <i>trans</i>	37
6.3	Ensamblaje binario de las construcciones gRNA-Cas.....	38
6.4	Expresión transitoria de construcciones CRISPR/Cas y evaluación del nivel de editado de base mediante secuenciación Sanger.....	40
7	Discusión.....	43
8	Conclusiones.....	45
9	Referencias bibliográficas.....	46
10	Anexo I.....	51
11	Anexo II.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos utilizados para la suplementación de los medios de cultivo, así como su concentración final de uso.	21
Tabla 2. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR en este trabajo.....	24
Tabla 3. Protocolo de las reacciones de PCR realizadas durante este trabajo.	24
Tabla 4. Cebadores utilizados para la secuenciación del DNA genómico.	24
Tabla 5. Cebadores empleados para domesticar los gRNAs de Cas9 obtenidos en GB clonng.	25
Tabla 6. Protocolo de las reacciones de restricción-ligación de GB realizadas en este trabajo.	25
Tabla 7. Cebadores empleados para domesticar los gRNAs de Cas12 obtenidos en GB clonng.	27
Tabla 8. Piezas en pUPD2 preexistentes en la colección GB empleadas para el ensamblaje de diferentes módulos Cas en este trabajo. La categoría GB indica la posición que cada pieza ocupa dentro de la unidad transcripcional, y por tanto, determina los 4 nucleótidos por los que estará flanqueada dicha pieza.	28
Tabla 9. Ventanas de edición de los editores de base disponibles en bibliografía anterior (Z. Wang et al., 2021; Zong et al., 2018).	30
Tabla 10. Genes diana, secuencias diana, número de bases susceptibles de ser editadas por las deaminasas A3A/ABE8e, y eficiencia de "indels"/editado de los guías disponibles en bibliografía anterior. En rojo se muestra la PAM, y en verde los genes diana seleccionados para este trabajo.	31
Tabla 11. Construcciones finales de los módulos "single-base", "dual-base", "multi-base", y controles de edición.	33
Tabla 12. Construcciones finales de los gRNAs diseñados para Cas9.	35
Tabla 13. Construcciones finales de los gRNAs diseñados para Cas12.	35
Tabla 14. Construcciones finales de GB10-FT y GB11-FT en un solo vector.	36
Tabla 15. Construcciones finales de los módulos CRISPR/Cas9 en un solo vector.	39
Tabla 16. Construcciones finales de los módulos CRISPR/Cas12 en un solo vector.	39
Tabla 17. Construcciones CRISPR/Cas utilizadas en el experimento de expresión transitoria para evaluar el nivel de editado de base.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Corte del DNA guiado por el sistema CRISPR/Cas9 nativo (Bortesi & Fischer, 2015). .	11
Figura 2. Diferencia entre los sistemas CRISPR/Cas9 y CRISPR/Cas12 (Pickar-Oliver & Gersbach, 2019).	12
Figura 3. Corte del DNA guiado por el sistema CRISPR/Cas9 reprogramado (Bortesi & Fischer, 2015).	13
Figura 4. Single-base editors. A la izquierda CBE, a la derecha ABE (Zhu et al., 2020).	16
Figura 5. Diagrama de la tecnología GoldenBraid (Sarrion-Perdigones et al., 2013).....	18
Figura 6. Esquema mostrando el ensamblaje de los gRNAs de Cas9. Las letras en azul corresponden al sitio de reconocimiento de BsmBI/BsaI.	26
Figura 7. Esquema mostrando el ensamblaje de los gRNAs de Cas12. Las letras en azul corresponden al sitio de reconocimiento de BsaI.....	27
Figura 8. Esquema mostrando el ensamblaje multipartito para generar los módulos Cas. El componente UGI únicamente está presente en las construcciones que contengan la citidina deaminasa.	28
Figura 9. Esquema mostrando el ensamblaje binario de las construcciones Cas-gRNA.....	29
Figura 10. Gramática GoldenBraid seguida para el ensamblaje de los editores “single-base” ..	31
Figura 11. Gramática GoldenBraid seguida para el ensamblaje de los editores “dual-base”	32
Figura 12. Gramática GoldenBraid seguida para el ensamblaje de los editores “multi-base” ...	32
Figura 13. Gramática GoldenBraid seguida para el ensamblaje de los controles de edición.	33
Figura 14. Patrón de bandas generado mediante restricción enzimática de algunos módulos Cas in silico (izquierda) vs observado (derecha) con EcoRV.	34
Figura 15. Gramática GoldenBraid seguida para el ensamblaje de los gRNAs de Cas9.	35
Figura 16. Gramática GoldenBraid seguida para el ensamblaje de los gRNAs de Cas12.	35
Figura 17. Patrón de bandas generado mediante restricción enzimática con NdeI de las construcciones con los gRNAs in silico (izquierda) vs observado (derecha).	36
Figura 18. Patrón de bandas generado mediante restricción enzimática in silico (izquierda) vs observado (derecha) de las construcciones GB10-FT y GB11-FT con la enzima NdeI y NdeI+HindIII, respectivamente.	37
Figura 19. Diseño experimental de la expresión comparativa del sistema CRISPR en cis vs en trans.	37
Figura 20. Resultados de editado obtenidos para una expresión transitoria del sistema CRISPR/Cas en cis vs en trans.....	38

Figura 21. Patrón de bandas generado mediante restricción enzimática de algunos módulos CRISPR/Cas in silico (izquierda) vs observado (derecha) con BamHI+HindIII (GB6-FT) y NdeI (GB8-FT, GB8-PDST2, GB12-ETR, GB12-FT y GB13-PDST2).	40
Figura 22. Cambios de base producidos por GB1-PDS1. En los cromatogramas se muestra la secuencia diana de dCas12: a la izquierda la obtenida con el editor citidina deaminasa, y a la derecha la obtenida con el control negativo. Se muestra rodeada la zona de conversión de base.	42
Figura 23. Cambios de base producidos por GB9-ETR. En los cromatogramas se muestra la secuencia diana de nCas9: a la izquierda la obtenida con el editor citidina-adenina deaminasa, y a la derecha la obtenida con los dos controles negativos. Se muestra rodeada la zona de conversión de base.	42
Figura 24. GB2-ETR. En los cromatogramas se muestra la secuencia diana de la nCas9: a la izquierda la obtenida con el editor citidina deaminasa, y a la derecha la obtenida con los dos controles negativos.	51
Figura 25. GB4-ETR. En los cromatogramas se muestra la secuencia diana de la nCas9: a la izquierda la obtenida con el editor adenina deaminasa, y a la derecha la obtenida con los dos controles negativos.	51
Figura 26. GB8-ETR. En los cromatogramas se muestra la secuencia diana de la nCas9: a la izquierda la obtenida con el editor citidina-adenina deaminasa (UGI), y a la derecha la obtenida con los dos controles negativos.	52
Figura 27. GB3-PDS1. En los cromatogramas se muestra la secuencia diana de la dCas12: a la izquierda la obtenida con el editor adenina deaminasa, y a la derecha la obtenida con el control negativo.	52
Figura 28. GB6-PDS1. En los cromatogramas se muestra la secuencia diana de la dCas12: a la izquierda la obtenida con el editor citidina-adenina deaminasa (UGI), y a la derecha la obtenida con el control negativo.	53
Figura 29. GB7-PDS1. En los cromatogramas se muestra la secuencia diana de la dCas12: a la izquierda la obtenida con el editor citidina-adenina deaminasa, y a la derecha la obtenida con el control negativo.	53

1 Resumen.

La posibilidad de generar variantes proteicas artificiales es una estrategia que está revolucionando nuestra capacidad para desarrollar funciones nuevas o mejoradas para muchas aplicaciones en biología y biotecnología. En evolución dirigida, esta diversidad proteica generada artificialmente va ligada a la posterior selección de aquellas proteínas con mejores propiedades. Sin embargo, la mayoría de herramientas de mutagénesis para este propósito han sido desarrolladas hasta ahora para bacterias o levaduras, y no son fácilmente aplicables a plantas.

La tecnología CRISPR permite la edición genética en posiciones definidas de un genoma, gracias al reconocimiento de una secuencia concreta a través de un RNA guía. En plantas, los sistemas de reparación celulares hacen que esta herramienta haya podido ser utilizada ampliamente para generar inserciones y deleciones nucleotídicas, pero no cambios de base. Herramientas recientes derivadas de esta tecnología CRISPR permiten abordar ahora el reto de la evolución dirigida en plantas. Por ejemplo, la fusión de diferentes deaminasas a la nucleasa Cas9 o Cas12 permiten realizar sustituciones de un nucleótido en posiciones definidas del genoma. De este modo, se abre la puerta a la posibilidad de diseñar proteínas mejoradas y desarrollar plataformas de evolución dirigida, acelerando la mejora de rasgos agronómicos.

En este trabajo de Fin de Máster se plantea la puesta a punto de diversos editores CRISPR/Cas para el editado de base y la consecuente generación de nuevas variantes proteicas en planta. Como prueba de concepto, se plantea inicialmente producir las sustituciones nucleotídicas en genes diana como FT o ETR, ya que la eficiencia de sus guías ha sido previamente comprobada. La funcionalidad de cada sistema será estudiada mediante transformación transitoria en la planta *Nicotiana benthamiana* y su posterior secuenciación Sanger.

Este trabajo sienta las bases para el diseño de una plataforma de evolución dirigida que amplíe el espectro de variantes proteicas generadas y permita, por ejemplo, la obtención de cultivos no transgénicos resistentes a un herbicida al generar mutaciones en la diana proteica del mismo.

2 Abstract.

The possibility of generating artificial protein variants is a strategy that is revolutionising our ability to develop new or improved functions for many applications in biology and biotechnology. In directed evolution, this artificially generated protein diversity is linked to the subsequent selection of those proteins with the best properties. However, most mutagenesis tools for this purpose have been developed for bacteria or yeast so far, and are not easily applicable to plants.

CRISPR technology allows gene editing at defined positions in a genome, thanks to the recognition of a specific sequence through a RNA guide. In plants, cellular repair systems make it possible for this tool to be widely used to generate nucleotide insertions and deletions, but not base changes. Recent tools derived from this CRISPR technology now offer the opportunity to address the challenge of directed evolution in plants. For example, the fusion of different deaminases to the Cas9 or Cas12 nuclease allows single or multiple nucleotide substitutions at defined positions in the genome. This makes it possible to design improved proteins and to develop platforms for directed evolution, accelerating the improvement of agronomic traits.

In this Master's thesis, we propose to develop different CRISPR/Cas editors for base editing and the consequent generation of new protein variants in plants. As a proof of concept, it is proposed to initially produce nucleotide substitutions in target genes such as FT or ETR, since the efficiency of their guides has been previously proven. The functionality of each system will be tested by transient transformation in *Nicotiana benthamiana* and subsequent Sanger sequencing.

This work provides the basis for the design of a directed evolution platform that expands the range of protein variants generated and allows, for example, to produce non-transgenic crops that are resistant to herbicides.

3 Introducción.

3.1 Mejora genética de plantas y técnicas de edición genética.

Desde el inicio de la civilización, el ser humano ha tratado de mejorar las plantas con el fin de obtener un mayor rendimiento agrícola, una mayor calidad nutritiva de los cultivos, o una mayor resistencia a diversos factores abióticos y bióticos.

En las primeras etapas de la agricultura, se llevaron a cabo la selección y el desarrollo de aquellas variedades de cultivo que portaban rasgos de interés. Con el paso de los años y el avance del conocimiento científico, se pusieron a punto sistemas de mejora genética clásica, los cuales estaban basados en variaciones genéticas, tanto naturales como inducidas, que una vez identificadas debían ser seleccionadas y propagadas mediante cruces a la descendencia (Mohanta et al., 2017). A pesar de constituir un buen sistema de mejora, cabe destacar que presentaba ciertas limitaciones, pues se desconocía la ubicación de la mutación en el genoma, y la selección artificial de las plantas mejoradas requería mucho tiempo.

En las últimas décadas, el rápido crecimiento de la población mundial unido a la disminución de los recursos agrícolas ha propiciado la necesidad de crear métodos de mejora más eficientes y rápidos. Entre otras muchas herramientas de ingeniería genética, la comunidad científica ha desarrollado diferentes técnicas de edición genética como las meganucleasas, las nucleasas con dedos de zinc (ZFN), y las nucleasas efectoras tipo activador de transcripción (TALEN) (H. Zhang et al., 2017). Podríamos decir que todas ellas son herramientas de mutagénesis dirigida basadas en una proteína que se une al DNA y corta la secuencia diana en sitios específicos. De manera general, los cortes son reparados por la célula, sin embargo, en un pequeño porcentaje de los casos, las reparaciones se producen de forma errónea induciendo así un cambio en el genoma de la planta (Das et al., 2022). Las técnicas de mutagénesis dirigida son de gran interés, pues a diferencia de lo que ocurre por ejemplo con la inserción de T-DNA que genera mutaciones en zonas aleatorias del genoma, estas herramientas programables permiten dirigir la mutación a un sitio concreto del mismo.

Una de las primeras herramientas de mutagénesis dirigida descubiertas fueron las **meganucleasas**. Las meganucleasas son endonucleasas naturales con un sitio de reconocimiento muy amplio, pudiendo reconocer 18-30 pares de bases (Grizot et al., 2009). La mayor limitación de estas enzimas es que solo pueden ser diseñadas frente a regiones que contengan en el locus diana el sitio específico de corte del DNA, y al ser muy amplio, resulta poco probable.

Posteriormente, encontramos las **ZFNs**, que son nucleasas artificiales compuestas de dos dominios bien diferenciados: un dedo de zinc de unión al DNA capaz de reconocer 3-4 pares de bases, y un dominio de escisión inespecífico formado por una enzima FokI (Das et al., 2022).

Por último, cabe mencionar el sistema **TALENs**. Está formado por endonucleasas artificiales generadas mediante la fusión de un dominio de unión al DNA compuesto por varias subunidades TALE repetidas, y un dominio de escisión FokI. A diferencia de las meganucleasas y las ZFN, los TALENs se dirigen a un solo nucleótido, por lo que son mucho más precisos (Boch et al., 2009).

Si los comparamos con los métodos de mejora convencionales, estas herramientas de mutagénesis dirigida destacan por su versatilidad, rapidez y especificidad de acción (Ahmar et al., 2020). Sin embargo, hay que tener en cuenta que existe la posibilidad de que se produzcan cortes en sitios del genoma de manera no específica. Asimismo, son herramientas costosas, difíciles de diseñar y de administrar en las células debido al gran tamaño de las enzimas, lo que complica la posibilidad de generar múltiples cambios genéticos simultáneos (Gupta & Musunuru, 2014).

3.2 Sistema CRISPR/Cas.

3.2.1 Fundamentos y componentes.

CRISPR/Cas es actualmente la herramienta de mutagénesis dirigida más utilizada y estudiada por la comunidad científica. Su descubrimiento fue un avance muy significativo del siglo XX, ya que representa una herramienta totalmente distinta, y es que, a diferencia del mecanismo de acción guiado por una proteína en el que se basan las herramientas anteriores (meganucleasas, ZFNs y TALENs), la tecnología CRISPR/Cas se caracteriza por ser un sistema guiado por RNA. Esto facilita su reprogramación al no requerir el diseño de una nueva proteína para cada diana en el DNA. Debido a su versatilidad, sencillez, eficacia y aplicabilidad, CRISPR/Cas ha sido utilizado en numerosos campos de investigación como la biotecnología, ingeniería genética y biología fundamental (Gasiunas et al., 2012).

El sistema CRISPR/Cas fue descubierto en la especie bacteriana *Streptococcus pyogenes* (Chylinski et al., 2014). Sin embargo, estas repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) y las proteínas asociadas a CRISPR (Cas), las podemos encontrar tanto en bacterias como arqueas, constituyendo en ellas un sistema inmunitario adaptativo contra fagos y otros elementos genéticos extraños (Hille et al., 2018). Podríamos decir que CRISPR actúa a modo de librería conteniendo aquellos fragmentos de DNA de virus que han atacado a la bacteria. De este modo, dichos fragmentos de DNA son utilizados por la bacteria para reconocer y destruir el DNA extraño en nuevos ataques, y así protegerse (Mohanta et al., 2017).

Este complejo sistema inmunitario bacteriano está formado por varios componentes: el RNA CRISPR (crRNA, también llamado protoespaciador), el RNA transactivador (tracrRNA), y la nucleasa Cas9, como podemos observar en la *Figura 1*. Cuando se produce la entrada de DNA invasor en la célula, el sistema CRISPR/Cas se activa, la librería CRISPR se transcribe y se procesa generando pequeños crRNAs de interferencia de unos 40 nucleótidos de longitud. Este crRNA se va a combinar con el tracrRNA para estabilizar la estructura, activar y guiar a la nucleasa Cas9. Por último, el complejo proteico crRNA-tracrRNA-Cas9 generará un corte en las secuencias homólogas que encuentre en el DNA invasor, degradándolas. Para que todo esto ocurra, es crucial que exista un motivo adyacente al protoespaciador (PAM), es decir, una secuencia de 3-5 nucleótidos de longitud situada aguas abajo del DNA diana que va a ser reconocida por la nucleasa y que le va a permitir distinguir si el DNA es propio o invasor. La especificidad de la diana va a venir determinada por un segmento de 20 nucleótidos contenido en el crRNA (Bortesi & Fischer, 2015).

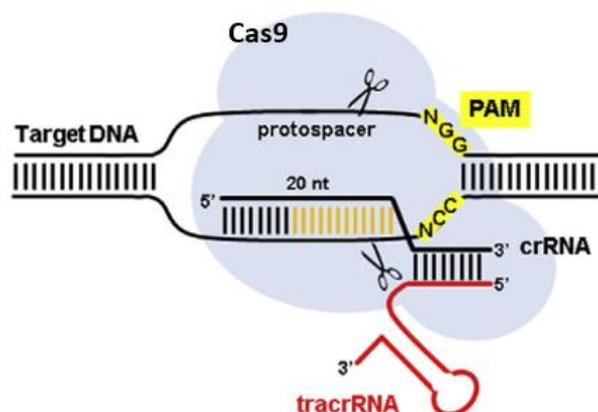


Figura 1. Corte del DNA guiado por el sistema CRISPR/Cas9 nativo (Bortesi & Fischer, 2015).

Se sabe que los genes que codifican para las nucleasas Cas están estrechamente ligados a los loci CRISPR, lo que refuerza la idea de que los crRNAs y las proteínas Cas actúan conjuntamente. Concretamente, se han identificado más de 45 familias de genes Cas, pero un organismo determinado solo posee un subconjunto de ellas (P Terns & M Terns, 2011).

El sistema CRISPR/Cas más caracterizado es el basado en la proteína **Cas9** encontrado en *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). La Cas9 presenta dos dominios nucleasa, HNH y RuvC, que cortan las dos cadenas del DNA (Figura 2). Como ya hemos comentado, dicha nucleasa requiere de dos moléculas de RNA para poder ejercer su función de corte: crRNA y tracrRNA. Previamente a la formación del complejo, el crRNA es procesado y posteriormente hibridado con el tracrRNA y la Cas9 mediante la acción de la RNasa III propia de la célula. Una vez el sistema es funcional, reconoce la PAM (5'-NGG-3' o 5'-NAG-3' en el caso de SpCas9) y genera un corte liberando fragmentos con extremos romos. Adicionalmente, es preferible que la secuencia reconocida por la endonucleasa sea rica en G en el extremo 3' (Paul & Montoya, 2020).

Ahora bien, también encontramos sistemas CRISPR basados en otras enzimas Cas, como por ejemplo la **Cas12a** (Cpf1) característica de la bacteria *Francisella novicida* o de *Lachnospiraceae bacterium* ND2006 (Paul & Montoya, 2020). Esta nucleasa presenta un único dominio catalítico RuvC-Nuc encargado de cortar la doble cadena de DNA (Figura 2). La principal particularidad de la Cas12a, a diferencia de lo que ocurría con la Cas9, es que no necesita de un tracrRNA ni de la RNasa III para ejercer su función. En este caso, la Cas12a procesa su propio crRNA gracias a su función RNasa sin necesidad de la maquinaria celular. El sistema CRISPR/Cas12a será funcional cuando se forme la unión crRNA-Cas, constituyendo un complejo más simple que el anterior. Una vez el sistema está activo, reconoce la PAM de 3-4 nucleótidos de longitud (5'-TTTV-3'), siendo preferible una secuencia rica en T en el extremo 5'. El corte generado por la Cas12a libera fragmentos con extremos cohesivos (Paul & Montoya, 2020).

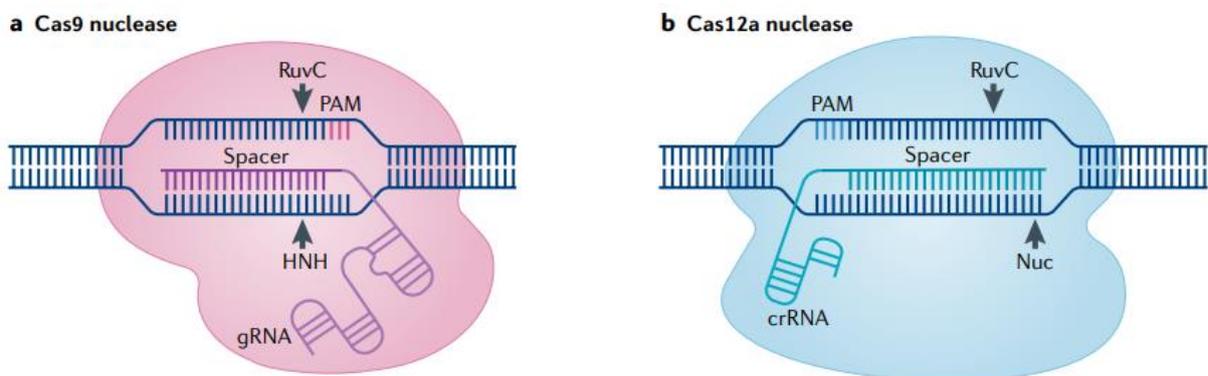


Figura 2. Diferencia entre los sistemas CRISPR/Cas9 y CRISPR/Cas12 (Pickar-Oliver & Gersbach, 2019).

A partir de estas proteínas Cas existentes se han logrado desarrollar versiones mutadas mejoradas, como por ejemplo la endonucleasa Cas12a termotolerante de *Lachnospiraceae bacterium* ND2006 (ttLbCas12a). Esta nucleasa presenta un único cambio aminoacídico que le confiere una alta actividad y eficiencia de corte a temperaturas de 22-28°C, temperaturas habituales de crecimiento de las plantas (Schindele & Puchta, 2020).

También encontramos versiones Cas con mutaciones en los dominios nucleasa catalíticos. En el caso de la Cas9, es posible inactivar uno de ellos produciendo una nickasa (nCas9) con un único sitio de corte, o bien podemos inactivar ambos y generar una versión completamente inactiva o *dead* (dCas9). Sin embargo, una mutación de este tipo en la Cas12 únicamente podría generar una versión inactiva o *dead* (dCas12) (Paul & Montoya, 2020).

Como vemos, y a pesar de que nuestros conocimientos son aún muy limitados, es evidente la enorme diversidad natural de los sistemas CRISPR/Cas. Esta gran variedad de enzimas, RNAs, secuencias PAM y mecanismos de acción, nos va a brindar la posibilidad de combinar y desarrollar múltiples herramientas de edición genética.

3.2.2 Aplicaciones del sistema CRISPR/Cas.

La revolución del sistema CRISPR/Cas se produjo cuando se demostró que la secuencia de DNA diana podía reprogramarse simplemente cambiando 20 nucleótidos en el crRNA. Fue en este momento, cuando pasó de ser un simple fenómeno biológico a ser una herramienta de ingeniería genética. Adicionalmente, se comprobó que era posible simplificar la herramienta reduciendo el número de componentes de tres a dos, con la unión del crRNA y el tracrRNA en un simple RNA guía (gRNA), como se muestra en la *Figura 3* (Jinek et al., 2012). Incluso, se demostró que se podían utilizar varios gRNAs para lograr una edición múltiple de alta eficiencia en diferentes loci simultáneamente (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013). Con todo ello, se confirmó que CRISPR/Cas podía llegar a ser una herramienta sencilla, barata y versátil para la edición del genoma.

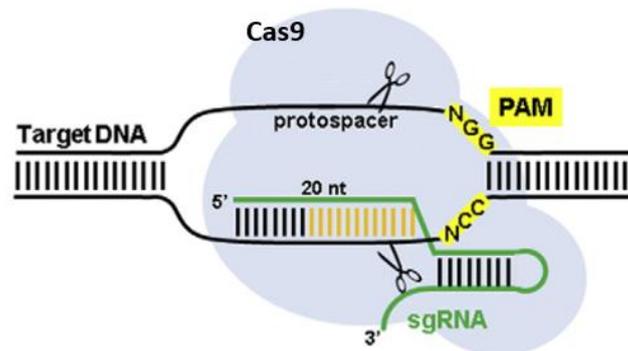


Figura 3. Corte del DNA guiado por el sistema CRISPR/Cas9 reprogramado (Bortesi & Fischer, 2015).

¿Cómo puede el sistema CRISPR/Cas llevar a cabo la edición genética? Fundamentalmente, porque esta herramienta tiene la capacidad de generar una rotura de doble cadena en un locus específico del genoma, sin embargo, depende por completo de la maquinaria de reparación del DNA de la célula para fijar esta lesión. Los mecanismos celulares pueden reparar la rotura por homología directa (HDR) o bien mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ). La reparación por HDR utiliza una plantilla de DNA homóloga para reparar la rotura. En lugar de permitir que la maquinaria de reparación tome como molde una hebra de DNA homólogo, podemos suministrar un molde de DNA exógeno con el fin de introducir nueva información o simplemente corregir la secuencia en un locus determinado del genoma del huésped. Por otro lado, en la reparación por NHEJ se produce la unión directa de los extremos cortados, siendo un mecanismo mucho más propenso a errores. Por esta razón, puede ser utilizado para producir inserciones o deleciones que causarán la interrupción de los genes (Paul & Montoya, 2020).

Entre las aplicaciones más destacables de este sistema encontramos la edición genética de plantas con el fin de mejorar el rendimiento y calidad de cultivos. Así, encontramos estudios enfocados a aumentar el tamaño y número de granos en cereales como el arroz y el trigo (Jiang et al., 2013; M. Li et al., 2016; J. Wang et al., 2018); otros investigadores tratan de conferir tolerancia a salinidad, sequía o calor a cultivos de arroz, soja, maíz y tomate (Bo et al., 2019; Corte et al., 2019; Lou et al., 2017); y numerosos trabajos demuestran la resistencia a virus que confiere CRISPR/Cas en plantas de tabaco, pepino, patata o algodón (Andersson et al., 2017; Chandrasekaran et al., 2016; Schaart et al., 2016; T. Zhang et al., 2018).

Sin duda, CRISPR constituye una herramienta de edición genética muy potente que abrirá nuevas vías para resolver problemas agrícolas e impulsar la producción de cultivos fundamentales para la alimentación humana.

A pesar de todas sus ventajas, el sistema CRISPR/Cas tiene como principal limitación la generación de mutaciones fuera de la secuencia diana. Por ello, los investigadores tratan de desarrollar varias estrategias para reducir los efectos no deseados, por ejemplo, optimizando la concentración y el diseño de los gRNAs. De hecho, es común utilizar varias herramientas computacionales para predecir las mutaciones “off-target” y poder evitarlas antes de poner en marcha el sistema de edición (Das et al., 2022).

Además de la edición del genoma, el sistema CRISPR/Cas puede ser utilizado para la regulación ectópica de la expresión génica. A través del control en la expresión génica podemos llegar a comprender la función de un gen, y también podemos diseñar nuevos circuitos de regulación para biología sintética (Bortesi & Fischer, 2015). La regulación de la expresión génica está mediada por la unión de factores de transcripción a sus promotores diana, y se ha descubierto que es posible llevar a cabo esta regulación mediante el uso de nucleasas desactivadas. La Cas9 catalíticamente inactiva (dCas9) es incapaz de cortar el DNA, pero puede unirse a sitios diana a través del gRNA (Gilbert et al., 2013; Maeder et al., 2013). De esta manera, la expresión de dCas9 fusionada a dominios de activación (TAL) o represión (SRDX) característicos de factores de transcripción, puede conducir a un control transcripcional de los genes diana (Bortesi & Fischer, 2015).

Asimismo, las nucleasas inactivas pueden utilizarse para transportar una carga específica a una región del genoma concreta (Bortesi & Fischer, 2015). Por ejemplo, la dCas9 puede ser fusionada con proteínas fluorescentes y puede utilizarse para visualizar la estructura y la dinámica de la cromatina (Anton et al., 2014). De hecho, se puede utilizar un enfoque similar para visualizar las modificaciones de las histonas o la metilación del DNA (Mohanta et al., 2017).

3.3 Técnicas de “base-editing”.

3.3.1 Fundamentos y componentes.

Numerosos estudios sobre rasgos agronómicos valiosos han revelado que muchos de estos están determinados por cambios de una sola base en los genes (J. Li et al., 2017a). Desafortunadamente, el sistema de mutagénesis CRISPR/Cas del que hemos hablado no puede utilizarse para llevar a cabo la conversión de una base a otra, sino que es un sistema más apropiado para la inserción o delección de información genética. De este problema, nace un nuevo enfoque CRISPR más preciso y estable para editar los genomas de los cultivos.

El “base-editing” o editado de base se ha considerado un enfoque alternativo, simple y eficiente para poder generar conversiones de nucleótidos sin la formación de la rotura en la doble cadena de DNA (J. Li et al., 2017b; Yin et al., 2017). Esta metodología supera algunas limitaciones de la herramienta CRISPR/Cas original, y se compone de una Cas inactiva (variantes de Cas9/Cas12, dCas, nCas) y un componente deaminasa que funciona convirtiendo una base en otra. Existen dos grupos de editores de bases: de DNA y de RNA (Azameti & Dauda, 2021). En este trabajo nos centraremos en los editores de DNA.

3.3.2 Tipos de editores.

3.3.2.1 “Single-base editors”.

Actualmente, existen dos editores de bases de DNA fundamentales: el editor de base de citosina (CBE), y el editor de base de adenina (ABE). Su esquema detallado se muestra en la *Figura 4*.

La primera generación de CBEs, se creó mediante la fusión de una citidina deaminasa al extremo N-terminal de la dCas9. Este editor de base da lugar a la deaminación de la citosina (C) para producir uracilo (U). Durante la replicación del DNA, el uracilo es leído como timina (T) por la DNA polimerasa, y en consecuencia, da lugar a la sustitución de un solo nucleótido de C·G a T·A (Komor et al., 2016). Sin embargo, la célula cuenta con un mecanismo de reparación (BER) capaz de revertir este cambio de T·A a C·G mediante la acción de las glicosilasas UNGs. Esto disminuye enormemente la eficacia del sistema de edición, por ello, los científicos han desarrollado una segunda generación de editores CBEs (Komor et al., 2016).

En la segunda generación de editores, se acopló un inhibidor de glicosilasas (UGI) al complejo CBE. La presencia del UGI minimiza la acción de las UNGs y facilita la conversión C·G a T·A. Tras esta mejora, surgieron terceras y cuartas generaciones de editores CBEs, todas ellas encaminadas a perfeccionar este sistema de edición (Kleinstiver et al., 2016; Komor et al., 2017; Mishra et al., 2020). Gracias a ello, hoy en día contamos con diversos editores de citosina mucho más eficientes que el original.

En este trabajo utilizaremos un editor de citosina basado en A3A-PBE, el cual ha sido diseñado recientemente mediante la fusión de la citidina deaminasa APOBEC3A humana y la nCas9 (Zong et al., 2018). El editor A3A-PBE presenta una ventana de edición de 17 nucleótidos, lo que significa que cuenta con una región bastante amplia de nucleótidos en la que la Cas funciona eficazmente. Ha sido probado en plantas como la colza, la patata, el arroz y el trigo (Cheng et al., 2021; Zong et al., 2018). Adicionalmente, fusionaremos la APOBEC3A a la nucleasa dCas12.

A diferencia del CBE, el ABE provoca el cambio de la adenina (A) en inosina (I). La inosina se lee como guanina (G) durante la replicación del ADN, creando la sustitución de A·T a G·C (Nishida et al., 2016). La primera generación de ABEs se desarrolló fusionando la adenina deaminasa a la nCas9 a través de un enlazador o XTEN. Con el tiempo, se realizaron varias mejoras y optimizaciones para aumentar la eficacia de edición. El uso de diferentes deaminasas mutadas, o el empleo de una longitud variable del XTEN, son algunas de las estrategias adoptadas para mejorar la eficiencia de edición de los ABEs. De hecho, se han llegado a desarrollar hasta siete generaciones de editores de adenina que han conseguido aumentar la eficiencia de editado hasta en un 50% (Azameti & Dauda, 2021).

En este trabajo utilizaremos un editor de adenina basado en el editor PTG-ABE8e, diseñado originalmente mediante la fusión de la adenina deaminasa TadA8e y la nCas9 y probado eficientemente en plantas de *Nicotiana benthamiana* (Z. Wang et al., 2021). En este caso, la ventana de edición es de 5 nucleótidos. Adicionalmente, fusionaremos la TadA8e a la nucleasa dCas12.

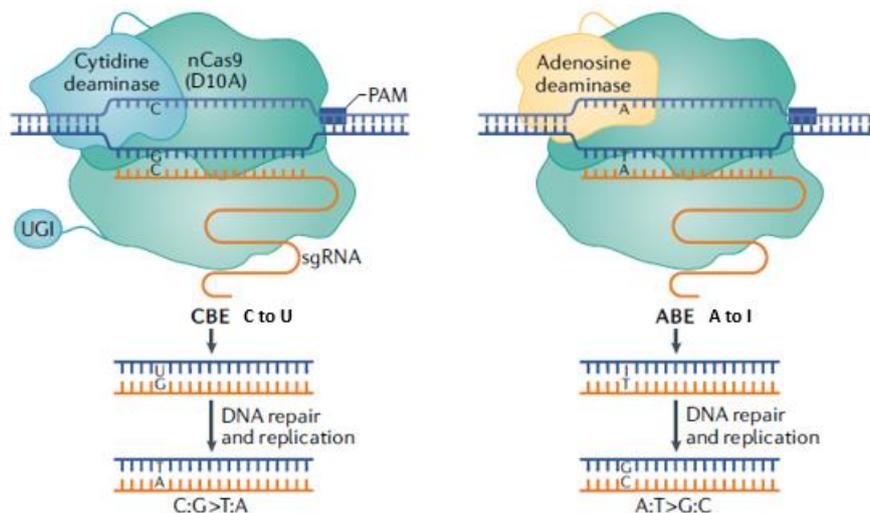


Figura 4. Single-base editors. A la izquierda CBE, a la derecha ABE (Zhu et al., 2020).

Aunque los CBEs y ABEs son utilizados ampliamente para inducir cambios de un solo nucleótido, su aplicación es limitada, pues solo pueden inducir la transición de bases. Con el fin de inducir la transversión de bases, diferentes grupos de investigación crearon los editores CGBE capaces de producir el cambio C→G. Estos editores se desarrollaron mediante la fusión de la nCas9 con una citidina deaminasa y una glicosilasa UNG. La citidina deaminasa produce la conversión de la citosina (C) en uracilo (U). La UNG detecta y elimina la U del DNA creando un sitio apurínico/apirimidínico (AP). Este sitio AP va a activar los mecanismos de reparación y replicación del DNA, que van a introducir una guanina (G), produciendo así el cambio de base (Azameti & Dauda, 2021). Recientemente, se ha visto que los CGBEs pueden inducir en menor proporción cambios C→T y C→A (Zhao et al., 2021).

Cabe mencionar que la conversión C→G, C→T y C→A puede ser generada también mediante un CBE que no contenga UGI, es decir, que no contenga inhibidores que inactiven las glicosilasas UNG. De esta manera, se produce la reparación del DNA y la inserción de la G por la acción de las glicosilasas propias de la célula.

3.3.2.2 “Dual-base editors”.

A pesar de que los editores “single-base” son innovadores y de gran utilidad, solo son capaces de crear transiciones de una única base, es decir, cambios de C·G a T·A o de A·T a G·C, lo cual limita el alcance de la edición. Fue entonces cuando la comunidad científica decidió crear editores de bases que poseyeran la capacidad de generar tanto sustituciones de base C→T como A→G de manera simultánea. Para ello, desarrollaron nuevos editores de base mediante la unión de la citidina y adenina deaminasa a la Cas inactiva.

El primer editor “dual-base” desarrollado fue denominado STEME, y era capaz de realizar simultáneamente el cambio C·G > T·A y A·T > G·C en plantas mediante el uso de un único sgRNA. STEME se generó mediante la fusión de la citidina deaminasa APOBEC3A, diferentes versiones de la adenosina deaminasa Tada, la nCas9 y el UGI (C. Li et al., 2020a).

Tras esta primera investigación, y análogamente a lo que ocurrió con los editores de una sola base, diferentes grupos se lanzaron a desarrollar nuevas herramientas de editado basadas en el editor “dual-base” original con diversas variaciones. De igual manera, en este trabajo decidimos combinar los editores de una sola base APOBEC3A y Tada8e para generar nuevas construcciones de modificación genética.

3.3.2.3 “Multi-base editors”.

La herramienta de editado que nos va a permitir inducir los cuatro tipos de conversiones comentadas hasta ahora de manera simultánea es el “multi-base” editor.

El editor “multi-base” desarrollado por la comunidad científica se denominó AGBE, y nació de la fusión de un CGBE y un ABE. El AGBE es capaz de inducir simultáneamente conversiones C→T, A→G, C→G y C→A, lo que amplía sustancialmente la diversidad de variantes generadas en una misma cadena de DNA diana (Liang et al., 2022).

El editado multi-base constituye una herramienta con gran potencial para realizar evolución dirigida gracias a la enorme diversidad de mutaciones que permite generar en una secuencia diana de interés. Sin embargo, es aún muy novedosa y requiere de una puesta a punto en los sistemas modelos vegetales. Por ello, en este trabajo decidimos generar construcciones AGBE y evaluar su nivel de editado de base en plantas.

3.3.3 Aplicaciones del base-editing.

El sistema de editado de base ya ha sido aplicado para la mejora genética de plantas. Entre los cultivos mejorados encontramos fundamentalmente la resistencia a herbicidas en trigo, tomate, arroz, sandía, etc (Azameti & Dauda, 2021). Asimismo, también se ha conseguido un mejor uso del nitrógeno en el arroz (Hu et al., 2015), o el retraso de la floración en *Arabidopsis thaliana* (Kang et al., 2018).

Sin embargo, las técnicas de editado de base no solo han revolucionado los actuales sistemas de mejora genética, sino que también han ayudado a desarrollar nuevas variedades de cultivo con rasgos deseables. Concretamente, se ha comprobado que los editores “dual-base” facilitan la evolución dirigida de proteínas endógenas de las plantas (Zhu et al., 2020).

La evolución dirigida constituye un poderoso método para modificar genes de interés con el fin de que adquieran propiedades mejoradas o novedosas. Aunque es cierto que existen varios sistemas de evolución dirigida, todo ellos han sido desarrollados para bacterias o levaduras, y no son fácilmente aplicables a plantas. Por tanto, es necesaria la creación de un método de evolución dirigida específico de plantas que permita la generación de múltiples mutaciones. A diferencia de la tecnología de mutagénesis basada en PCR propensa a introducir errores, el “base-editing” propone el uso de una biblioteca de gRNAs directamente sobre el genoma de la planta para introducir un alto grado de mutaciones en regiones concretas de genes de interés *in vivo* (Zhu et al., 2020).

Diversos estudios confirman la utilidad del editado de base en este campo. Por ejemplo, en 2020 un equipo de científicos realizó mutagénesis saturada en plantas de arroz mediante el uso de un “dual-base” STEME en la región de un gen implicado en la tolerancia a herbicidas. Las plantas mutantes generadas presentaban resistencia a diversos herbicidas. De esta manera, su cultivo permitiría el uso de herbicidas para el control de las malas hierbas con el consecuente aumento de la producción (C. Li et al., 2020b).

A pesar de que esta tecnología está aún poco estudiada, constituye una herramienta con gran potencial para acelerar la mejora de rasgos agronómicos en un futuro.

3.4 Clonaje modular para facilitar el ensamblaje de editores de bases.

El clonaje modular es una estrategia empleada en biología sintética que consiste en la fabricación de nuevas piezas de DNA a través de la combinación de módulos estándar prefabricados (Sarrion-Perdigones et al., 2013). En esta estrategia, los módulos o “partes” se ensamblan siguiendo una serie de reglas conocidas como “reglas de ensamblaje”. Este tipo de construcción genética a partir de módulos ofrece a los biólogos sintéticos una serie de ventajas como la velocidad, versatilidad, autonomía de laboratorio, potencial de combinación, y normalmente, menor coste (Ellis et al., 2011).

Entre las diversas estrategias posibles, el sistema de ensamblaje utilizado en este trabajo fue GoldenBraid. Se trata de un método descrito recientemente que está basado en un sistema anterior denominado GoldenGate (Sarrion-Perdigones et al., 2011a). Podemos afirmar que GoldenBraid es una de las pocas estrategias que permite a los biólogos generar ensamblajes reutilizables de manera simple, eficiente y sin cicatrices o con cicatrices benignas.

GoldenBraid nos permite crear módulos genéticos complejos a partir de piezas estandarizadas y reutilizables de DNA, mediante reacciones de restricción-ligación (Sarrion-Perdigones et al., 2011b). Estas reacciones están basadas en el uso de enzimas de restricción tipo IIS (BsmBI y BsaI) capaces de reconocer una secuencia determinada y cortar fuera de esta, dejando así extremos cohesivos de 4 nucleótidos. Dichos nucleótidos, que actúan a modo de un código de barras, se pueden combinar entre ellos generando construcciones multigénicas de mayor complejidad.

El clonaje GB, como se muestra en la *Figura 5*, comienza con la domesticación (Nivel 0), proceso que consiste en la adaptación de la secuencia de interés a la gramática de GB. Para ello, se incorporan sitios de clonaje BsmBI flanqueando la secuencia de interés, así como un overhang formado por 4 nucleótidos que van a identificar la pieza dentro de esta gramática GB. Igualmente, se debe eliminar cualquier región dentro de la secuencia de interés que pueda ser reconocida por enzimas de restricción fundamentales en la tecnología GoldenBraid (BsmBI, BsaI).

Una vez domesticadas las secuencias de interés y contenidas en el vector pUPD2, pueden ser utilizadas en un ensamblaje multipartito (Nivel 1), mediado por la enzima BsaI y la ligasa T4, para crear construcciones más complejas denominadas Unidades Transcripcionales (TUs). Las TUs están formadas por un promotor, un CDS y un terminador, todo ello contenido en un vector destino α . Para fusionar dos TUs recurrimos al ensamblaje binario (Nivel >1). Esta reacción mediada por BsmBI y T4 nos permite componer módulos genéticos en vectores Ω a partir de vectores α complementarios (Sarrion-Perdigones et al., 2013).

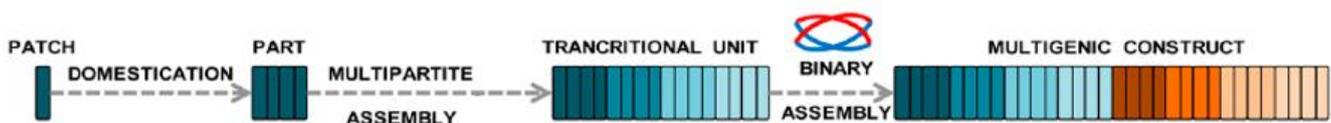


Figura 5. Diagrama de la tecnología GoldenBraid (Sarrion-Perdigones et al., 2013).

3.5 *Nicotiana benthamiana* como sistema modelo.

Nicotiana benthamiana (*N. benthamiana*) es una planta herbácea perteneciente a la familia de las solanáceas. Se trata de una especie única endémica de Australia, donde fue descubierta por primera vez por Benjamin Bynoe en 1837 (Goodin et al., 2008). En cuanto a su taxonomía, es considerada un antiguo alotetraploide formado a partir de progenitores diploides de la sección *Sylvestres* y *Noctiflorae*. Es por ello que presenta un genoma complejo formado por n=19 cromosomas (Knapp et al., 2004).

Hace una década, se empezó a considerar el valor de *N. benthamiana* como herramienta para los biólogos moleculares de plantas. Es especialmente útil en virología y en investigaciones huésped-patógeno, pues carece de sistema inmunitario y es susceptible de ser infectada por numerosos virus vegetales (Goodin et al., 2008).

Sin embargo, una de las características fundamentales que ha llevado a *N. benthamiana* a ser un magnífico sistema modelo, y por la cual se ha utilizado en este trabajo, es su capacidad para expresar rápidamente y en altas concentraciones transgenes contenidos en un T-DNA lanzado mediante agroinfiltración. La agroinfiltración es una técnica que se sirve normalmente de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* como vehículo para introducir el transgén en las células de la planta. La presencia en *N. benthamiana* de hojas grandes fácilmente infiltrables, posibilita la expresión transitoria y la producción de altas cantidades del transgén en tan solo 3-4 días (Bally et al., 2018).

Se ha probado en diversas ocasiones la alta eficiencia de transformación y co-transformación que presenta esta planta mediante agroinfiltración. Un parámetro importante a tener en cuenta es el número de copias de T-DNA que se introducen en cada célula vegetal, y está relacionado con la densidad celular de *A. tumefaciens* que se emplea en cada experimento. Con un valor de OD optimizado (generalmente OD=0.1), *Nicotiana benthamiana* puede ser transformada de manera eficiente ya sea con una o varias cepas bacterianas independientes (Vazquez-Vilar et al., 2017). A pesar de esto, agroinfiltrar la planta con diversos vectores simultáneamente puede ser más complejo, ya que no todas las células reciben el mismo número ni la misma proporción de T-DNAs. Por esta razón, será preferible la transformación con un solo vector en *cis* en aquellos experimentos más delicados, mientras que el uso de más de un vector en *trans* será viable en los demás casos.

Adicionalmente, esta planta destaca por su capacidad para ser utilizada como biofactoría, pudiendo expresarse y purificarse diversas sustancias biológicas de interés de manera sencilla y eficiente en ella (Goodin et al., 2008).

Por todo ello, *N.benthamiana* ofrece a los científicos una vía para responder a preguntas biológicas fundamentales, y también, una plataforma en la que producir moléculas de interés a gran escala.

4 Objetivos.

El presente Trabajo Fin de Máster tiene como objetivo general la puesta a punto de un sistema de evolución dirigida mediada por CRISPR en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

Para alcanzar dicho objetivo general, en este trabajo se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Diseñar el modo de ensamblar todos los elementos de DNA requeridos para la obtención de las construcciones CRISPR descritas, mediante la tecnología GoldenBraid.
- Comprobar la eficiencia de edición genética de las endonucleasas Cas9 y Cas12 en *Nicotiana benthamiana* en dos contextos diferentes: expresión transitoria en cis/expresión transitoria en trans.
- Evaluar la eficiencia de editado de base en *Nicotiana benthamiana* de las construcciones CRISPR “single-base”, “dual-base” y “multi-base” generadas.
- Comprobar si la secuenciación Sanger es una herramienta suficientemente potente para observar el editado de base mediante expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*.

5 Materiales y métodos.

5.1 Material vegetal.

En este trabajo se utilizaron plantas de *Nicotiana benthamiana* "LAB strain" de 4-5 semanas de edad, crecidas en cámaras de cultivo con un fotoperiodo de 16h de luz (24°C) y 8h de oscuridad (21°C).

5.2 Cultivo y manipulación de microorganismos.

5.2.1 Cepas y condiciones de crecimiento.

Todos los procesos de clonación y propagación de plásmidos fueron llevados a cabo empleando la cepa DH5 α de *Escherichia coli*. Dicha cepa presenta mutaciones que favorecen una mejor inserción del plásmido y permiten la detección de los transformantes que han incorporado el inserto en un medio suplementado con XGal e IPTG. Las condiciones de crecimiento establecidas para esta cepa fueron las siguientes: la incubación en medio sólido se realizó en placa en la cámara termostatzada a 37°C durante 16 h, mientras que la incubación en cultivo líquido tuvo lugar a 37°C en un agitador orbital a una velocidad de agitación de 225 rpm.

Por otro lado, para los experimentos de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*, se empleó la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*. Para su crecimiento en medio sólido se incubó en placa durante 2 días a 28°C. Para su crecimiento en medio líquido se incubó durante 24 h en un agitador orbital a 225 rpm a 28°C.

5.2.2 Medios de crecimiento de bacterias.

El crecimiento de *E. coli* y *A. tumefaciens* se realizó en medio de cultivo LB (Luria Bertani), un medio estándar para el crecimiento de bacterias compuesto por triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1% y H₂O, ajustado a un pH de 7. En el caso del cultivo sólido, se agregó agar bacteriológico al 2%. Previamente a su uso, el medio de crecimiento fue esterilizado.

En función de la cepa bacteriana en crecimiento, fue necesaria la adición de antibióticos y/o diferentes compuestos requeridos para la selección de los clones positivos. Los compuestos utilizados y las concentraciones finales a las que se añadieron se muestran en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Compuestos utilizados para la suplementación de los medios de cultivo, así como su concentración final de uso.

Compuesto	Concentración
XGal	40 mg/L
IPTG	0,5 mM
Cloranfenicol	34 mg/L
Kanamicina	50 mg/L
Espectinomicina	100 mg/L
Ampicilina	100 mg/L
Rifampicina	50 mg/L

5.2.3 Transformación de *Escherichia coli*.

Todas las construcciones generadas en este trabajo fueron introducidas en *E. coli* usando el kit de transformación *Mix & Go* (Zymo Research). Para ello, se tomó una alícuota de 80 µL de células quimiocompetentes, se añadieron 5 µL del producto de ligación y se dejó incubando durante 5 minutos en hielo. Pasado este tiempo, se agregaron 300 µL de LB y se incubó la mezcla durante 1 h 30 min en agitación a 37 °C. Posteriormente, se sembraron 100-150 µL de células en placas de LB suplementadas con XGal, ITPG y los antibióticos correspondientes para la selección.

Una vez comprobada la transformación de las bacterias de *E. coli* con el plásmido correcto, se almacenaron en forma de stock de glicerol (20% glicerol) a -80°C.

5.2.4 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

La transformación de la cepa EHA105 de *A. tumefaciens* se llevó a cabo por electroporación. Para ello, se tomó una alícuota de 40 µL de células electrocompetentes, se transfirió a la cubeta de electroporación, se añadió 1 µL de plásmido y se aplicó una corriente de 1440V. Seguidamente, se añadieron 500 µL de medio LB líquido para recuperar las células.

Previamente al sembrado en placa, se realizó un pre-cultivo de las células transformadas en medio líquido a 28°C en agitación durante 2 h. Por último, se sembraron 100-150 µL de células en placas de LB suplementadas con los antibióticos correspondientes para la selección.

Una vez comprobada la correcta transformación de las bacterias de *A. tumefaciens*, se almacenaron en forma de stock de glicerol (20% glicerol) a -80°C.

5.3 Manipulación y purificación de ácidos nucleicos.

5.3.1 Extracción de DNA genómico.

La extracción de DNA genómico se llevó a cabo a partir de hojas de *N. benthamiana* siguiendo un protocolo de extracción con CTAB. Se partió de 40 mg de material vegetal conservados en nitrógeno líquido, que seguidamente se trituraron en un homogeneizador durante 2 ciclos de 60 s. Al producto resultante se añadieron 300 µL de tampón CTAB (CTAB 2% (m/v), Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM pH 8, NaCl 1,4 M y PVP 1% (m/v)) y se incubó durante 20 minutos a 55°C.

Transcurrido este tiempo, se agregaron 300 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v), se mezcló en el vórtex y se centrifugó a 11.000 rpm durante 10 minutos. Se tomó la fase superior, se transfirió a un tubo limpio y se precipitó con 600 µL de isopropanol durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente durante 10 minutos a 13.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Seguidamente se añadieron 500 µL de EtOH 70% (p/v), se mezcló y se centrifugó durante 5 min a 13.000 rpm. Por último, se eliminó el EtOH y se resuspendió el precipitado en 40 µL de H₂O.

Una vez finalizado el protocolo, se midió la pureza y concentración del DNA genómico en el NanoDrop.

5.3.2 Extracción de DNA plasmídico.

Las extracciones plasmídicas a partir de cultivos líquidos bacterianos se realizaron empleando el kit *NZY Miniprep (NZYTech)* para *E. coli*, y el kit *QIAprep Spin Miniprep (Qiagen)* para *A. tumefaciens*, siguiendo las recomendaciones indicadas por la casa comercial. Una vez finalizado el protocolo a seguir, se midió la pureza y concentración de los plásmidos en el NanoDrop.

5.3.3 Digestión de DNA con enzimas de restricción.

Para comprobar el correcto ensamblaje de las construcciones, se realizaron ensayos de restricción del DNA plasmídico extraído.

En primer lugar, se simuló la digestión enzimática de las muestras *in silico* utilizando el software *Benchling* (<https://www.benchling.com/>). Esta plataforma muestra el patrón de bandas que se genera tras la digestión, por lo que permite una correcta elección de la enzima de restricción. De esta manera, se pudo seleccionar la enzima/enzimas que eran específicas del vector y también del inserto.

Para la reacción de restricción, se incubaron en un eppendorf 200 ng de DNA, 0,5 μL de enzima y 2 μL de tampón de la enzima correspondiente en un volumen final de 20 μL , en un termobloque a 37°C durante 1h 30 min.

5.3.4 Electroforesis en gel de agarosa.

La separación de los diferentes fragmentos de DNA obtenidos tras las digestiones se llevó a cabo empleando geles de agarosa. Los geles se prepararon con TAE 1X (40mM de Tris-acetato y 1mM de EDTA), 1% (v/v) de bromuro de etidio y 1,2% de agarosa. Como tampón de carga se utilizó el tampón *Gel Loading Dye, Purple 6X (New England BioLabs®)*. El marcador de peso molecular empleado para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados fue *Gene ruler kb Plus DNA Ladder (ThermoScientific®)*. Una vez transcurrida la electroforesis a un voltaje de 100V, se visualizaron los geles bajo luz UV en un transiluminador.

5.3.5 Amplificación por PCR.

Con el fin de amplificar la región editada del genoma de la planta, se llevó a cabo una PCR.

Para poder llevar a cabo la amplificación por PCR, previamente se diseñaron cebadores específicos flanqueantes a cada una de las dianas de los gRNAs empleando el programa *Primer3*. Preferiblemente, los cebadores deben tener una longitud de 18-22 nucleótidos, con un contenido en GC del 40-60% y con una T_m similar cercana a los 55°C. Las parejas de oligonucleótidos diseñadas generaron un amplicón de 400-900pb.

En todas las PCR realizadas en este trabajo se empleó la polimerasa MyTaq para asegurar una amplificación robusta. Cada pocillo contenía 100 ng de DNA genómico, 5 μL de tampón 5x, 0,5 μL de MyTaq, 1 μL de *primers* 10 μM , y H₂O hasta un volumen de reacción de 25 μL . Los cebadores empleados aparecen reflejados en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR en este trabajo.

Cebador	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	Temperatura anillamiento
PDS1 FW	CAGCGTTGATTATGCAAACCTCC	55	50
PDS1 RV	CTAACATGATTTACAGCTTTGGTAG	52	
ETR FW	TGCAGTTATGTTTCAGTGTCTGATTC	55,3	52
ETR RV	ATTCACGATCAAGCCGTGC	56,3	
FT FW	CTAGAAAACCTATGGCTATAAGGG	52,4	50
FT RV	GTTCTCGAGAGGTATAATATAGGC	52	

Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador *SimpliAmp* (Applied Biosystems). Las temperaturas y tiempos de reacción se muestran en la *Tabla 3*.

Tabla 3. Protocolo de las reacciones de PCR realizadas durante este trabajo.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	15 s	35
Anillamiento	Tm específica del primer	15 s	
Elongación	72	20 s	

5.3.6 Purificación del producto de PCR.

El producto de PCR obtenido se analizó previamente mediante electroforesis (ver apartado 5.3.4) para verificar que se amplificó el fragmento deseado. Una vez confirmado que el tamaño de banda era el esperado, se realizó una purificación empleando el kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel).

Una vez finalizado el protocolo a seguir, se midió la pureza y concentración del DNA amplificado en el NanoDrop.

5.3.7 Secuenciación Sanger.

La secuenciación de las muestras de DNA genómico extraídas de las hojas de *Nicotiana benthamiana*, fue realizada por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC). Los cebadores utilizados fueron sintetizados por la empresa *IDT_{TM}* y se muestran en la *Tabla 4*. El análisis posterior de las secuencias obtenidas se realizó utilizando diferentes programas y herramientas bioinformáticas, como *Synthego* (<https://ice.synthego.com/>) y *Benchling*.

Tabla 4. Cebadores utilizados para la secuenciación del DNA genómico.

Cebador	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)
PDS seq	GCAATGAACACCTCATCTGTCA	55,3
ETR seq	ATTCACGATCAAGCCGTGC	56,3
FT seq	CACAAGCACGCATAGAAC	51,5

5.4 Ensamblaje mediante GoldenBraid (GB).

5.4.1 Ensamblaje de gRNAs de Cas9.

El primer paso llevado a cabo para ensamblar los guías fue la **domesticación (Nivel 0)**, que como se ha comentado en el apartado 3.4, consiste en la adaptación de las secuencias de interés a la gramática GB y su posterior introducción en el vector pUPD2.

En primer lugar, se diseñó el dímero de oligonucleótidos que contiene la secuencia del protoespaciador específico de cada guía, utilizando la plataforma bioinformática de GoldenBraid (<https://gbcloning.upv.es/>). Esta web ofrece una herramienta que, en base a la secuencia introducida y al tipo de pieza GB deseada, proporciona los cebadores necesarios para proceder a la domesticación de la misma. Los cebadores fueron sintetizados por la empresa *IDTTM* y se muestran en la *Tabla 5*.

A continuación, se realizó el ensamblaje del dímero de *primers* junto con la señal de procesamiento Gly-tRNA y el scaffold de Cas9 contenidos en un vector pVD1 (GB2245), en un vector destino pUPD2. Para ello, se llevó a cabo una reacción de restricción-ligación con la enzima BsmBI y la ligasa T4 de acuerdo con el siguiente protocolo: 20 femtomoles de plásmido pUPD2, 0,6 µL de mezcla de cebadores (0,5 µM cada uno), 20 femtomoles de plásmido GB2245, BSA 0,1 mg/mL, tampón *T4 DNA Ligasa 10X*, 4U *T4 DNA Ligasa*, 8U *BsmBI* y H₂O hasta un volumen de 15 µL. Las reacciones se realizaron en el termociclador *SimpliAmp (Applied Biosystems)* siguiendo el programa que aparece reflejado en la *Tabla 6*.

Por último, se realizó el **ensamblaje multipartito (Nivel 1)** de los gRNAs con un promotor U626 (GB1001) en un vector destino α2 (GB0017). Así pues, se llevó a cabo una reacción de restricción-ligación con la enzima BsaI y la ligasa T4 de acuerdo con el siguiente protocolo: 20 femtomoles de cada pieza de nivel 0 clonada en pUPD2 (promotor y gRNA), 20 femtomoles de vector destino pDGB3-α2, tampón *T4 DNA Ligasa 10X*, 4U *T4 DNA Ligasa*, 8U *BsaI* y H₂O hasta un volumen de 15 µL. Las reacciones de restricción-ligación se llevaron a cabo en el termociclador siguiendo el programa que aparece reflejado en la *Tabla 6*.

En la *Figura 6* se muestra un esquema explicativo del ensamblaje de los gRNAs de Cas9.

Tabla 5. Cebadores empleados para domesticar los gRNAs de Cas9 obtenidos en GB cloning.

Nombre	Secuencia
FT FW	GTGCAGGCCAATAGATCTTGTA AAAA
FT RV	AAACTTTTACAAGATCTATTGGCCT
ETR FW	GTGCAA ACTGCACAAGA ACCCATCTATA
ETR RV	AAACTATAGATGGGTTCTTGTGCAGTTT
PDS-T2 FW	GTGCATGCAAATTGAGTTGGGAGTG
PDS-T2 RV	AAACCACTCCCAACTCAATTTGCAT

Tabla 6. Protocolo de las reacciones de restricción-ligación de GB realizadas en este trabajo.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
37	3 min	35-40
16	4 min	
50	10 min	1
80	10 min	1

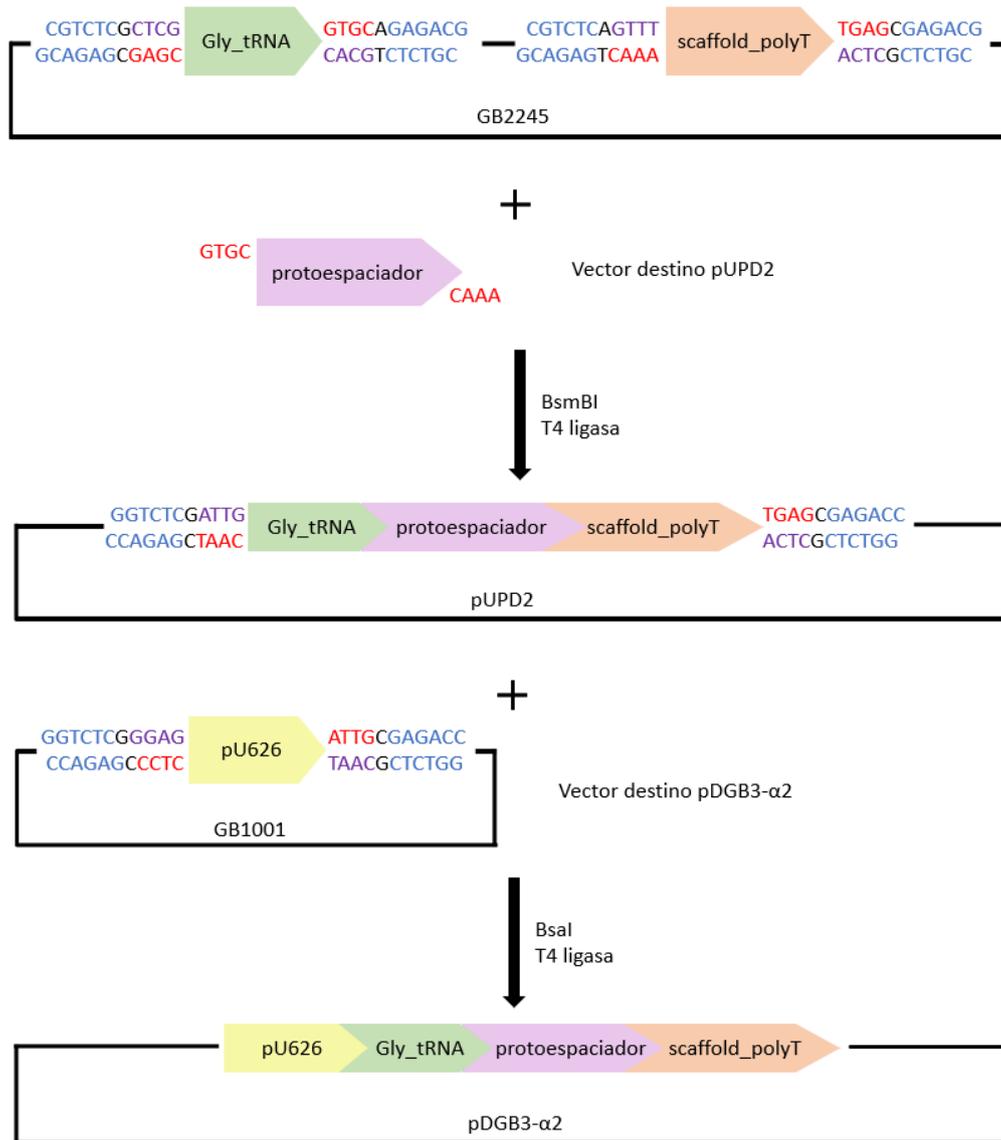


Figura 6. Esquema mostrando el ensamblaje de los gRNAs de Cas9. Las letras en azul corresponden al sitio de reconocimiento de BsmBI/BsaI.

5.4.2 Ensamblaje de gRNAs de Cas12.

Al igual que en el caso anterior, el primer paso llevado a cabo para ensamblar los guías de Cas12 fue la **domesticación (Nivel 0)**. Sin embargo, la domesticación de estos guías solo se realiza para adaptar las secuencias a la gramática GB y no requiere de la clonación en el vector pUPD2.

La obtención de los dímeros de *primers* específicos de cada guía, se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.4.1. Los cebadores obtenidos fueron sintetizados por la empresa IDT™ y se muestran en la *Tabla 7*.

En este caso, se realizó el **ensamblaje multipartito (Nivel 1)** de los gRNAs con un promotor U626:DR adaptado para la Cas12 (GB1443) y una señal de procesamiento HDV_polyT (GB1444), en un vector destino α2 (GB0017). Así pues, se llevó a cabo una reacción de restricción-ligación con la enzima BsaI y la ligasa T4 de acuerdo con el siguiente protocolo: 20 femtomoles de cada pieza de nivel 0 clonada en pUPD2 (promotor, HDV), 1 µL de mezcla de cebadores (0,5 µM cada uno), 20 femtomoles de vector destino pDGB3-α2, tampón *T4 DNA Ligasa 10X*, 4U *T4 DNA Ligasa*, 8U *BsaI* y H₂O hasta un volumen de 15 µL.

Al igual que en los casos anteriores, las reacciones de restricción-ligación se realizaron en el termociclador siguiendo el programa que aparece reflejado en la *Tabla 6*.

En la *Figura 7* se muestra un esquema explicativo del ensamblaje de los gRNAs de Cas12.

Tabla 7. Cebadores empleados para domesticar los gRNAs de Cas12 obtenidos en GB cloning.

Nombre	Secuencia
FT FW	AGATCAAGATCTATTGGCCTAAGA
FT RV	GGCCTCTTAGGCCAATAGATCTTG
NbPDS-1 FW	AGATTCATCCAGTCCTTAACACTTAAA
NbPDS-1 RV	GGCCTTTAAGTGTTAAGGACTGGATGA

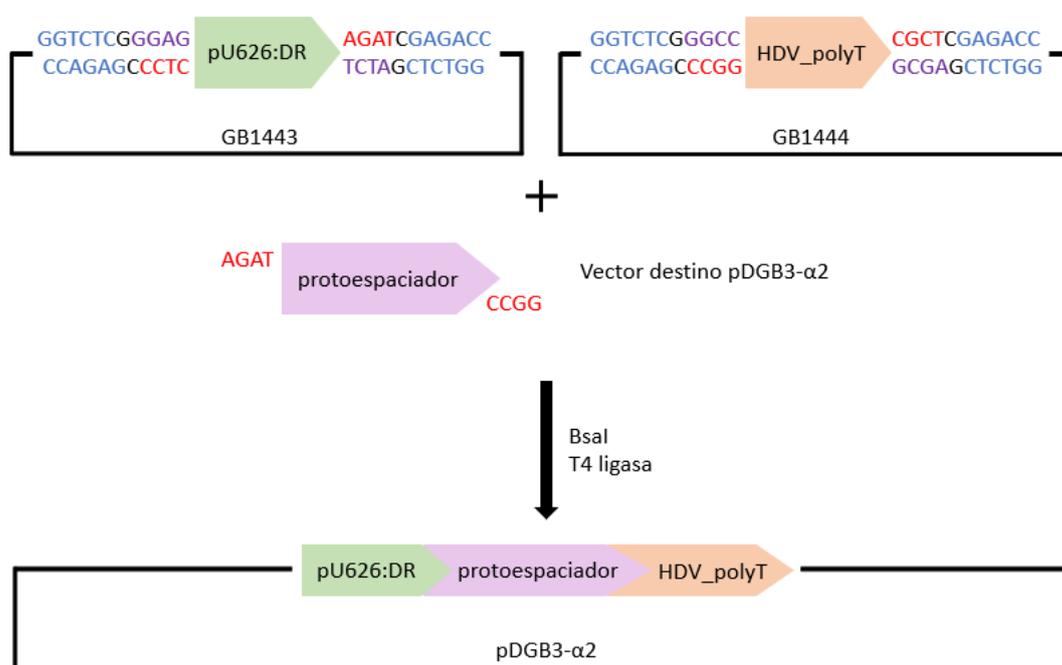


Figura 7. Esquema mostrando el ensamblaje de los gRNAs de Cas12. Las letras en azul corresponden al sitio de reconocimiento de BsaI.

5.4.3 Ensamblaje de módulos Cas.

El primer paso llevado a cabo para generar las construcciones Cas fue el **ensamblaje multipartito (Nivel 1)**, el cual nos permite obtener unidades transcripcionales completas (promotor-CDS-terminador). En este caso, partimos de piezas en pUPD2 previamente desarrolladas y registradas en la colección GB (*Tabla 8*).

Para ello, se realizó el ensamblaje de estas piezas en el vector destino $\alpha 1$ siguiendo la reacción de restricción-ligación: 20 femtomoles de cada pieza de nivel 0 clonada en pUPD2 (promotor, deaminasa, Cas, UGI y terminador), 20 femtomoles de pDGB3- $\alpha 1$, tampón *T4 DNA Ligasa 10X*, 4U *T4 DNA Ligasa*, 8U *BsaI* y H₂O hasta un volumen de 15 μ L. Las reacciones de restricción-ligación se llevaron a cabo en el termociclador siguiendo el programa que aparece reflejado en la *Tabla 6*.

Tabla 8. Piezas en pUPD2 preexistentes en la colección GB empleadas para el ensamblaje de diferentes módulos Cas en este trabajo. La categoría GB indica la posición que cada pieza ocupa dentro de la unidad transcripcional, y por tanto, determina los 4 nucleótidos por los que estará flanqueada dicha pieza.

GoldenBraid ID	Descripción	Categoría GB
GB0552	35S	A1_B1
GB0030	35S	A1_B2
GB4425	APOBEC3A	B2
GB4424	APOBEC3A	B2a
GB4423	TadA8e	B2
GB4422	TadA8e	B2b
GB0575	Cas9	B3_B5
GB1693	nCas9	B3_B5
GB1692	nCas9	B3_B4
GB3876	Cas12	B3_B5
GB4420	dCas12	B3_B5
GB4089	dCas12	B3_B4
GB1820	UGI	B5
GB0037	Tnos	B6_C1
GB0015	pDGB3- α 1	vector

En la Figura 8 se muestra un esquema genérico que explica el ensamblaje de los módulos Cas.

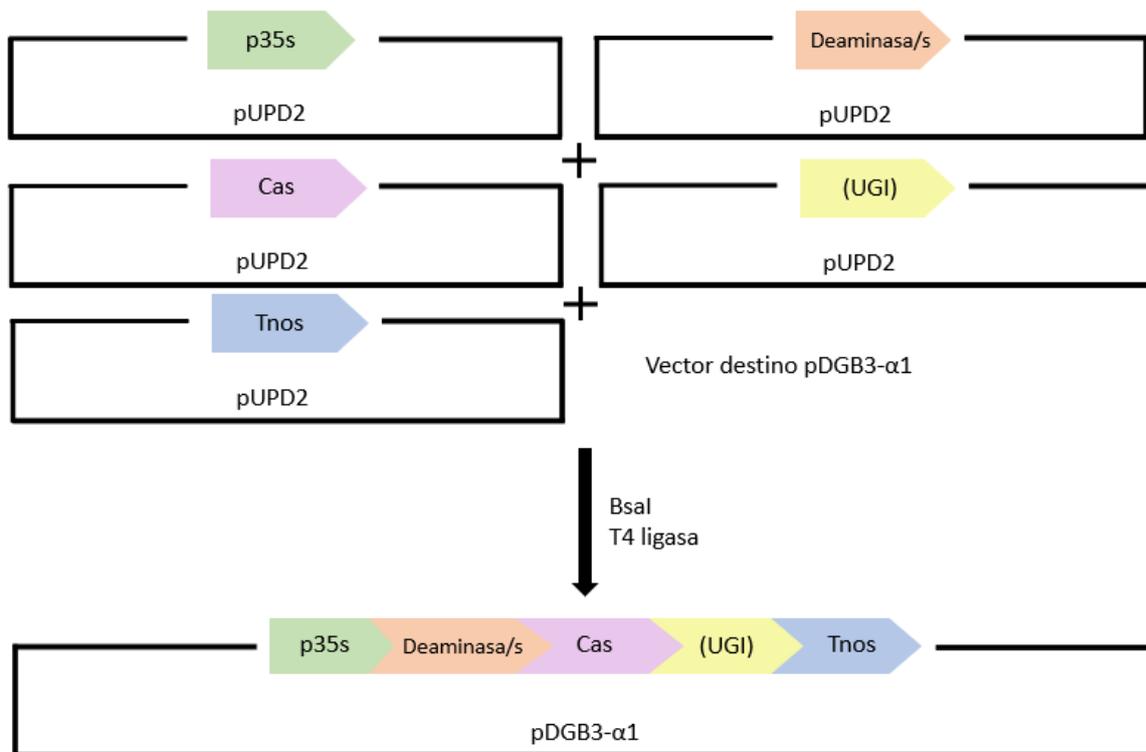


Figura 8. Esquema mostrando el ensamblaje multipartito para generar los módulos Cas. El componente UGI únicamente está presente en las construcciones que contengan la citidina deaminasa.

5.4.4 Ensamblaje binario.

Para el ensamblaje de dos unidades transcripcionales (módulos Cas y gRNAs) en el mismo vector destino $\Omega 1$, se llevó a cabo la siguiente reacción de restricción-ligación: 20 femtomoles de cada TU, 20 femtomoles del vector destino pDGB3- $\Omega 1$, BSA 0,1 mg/mL, tampón *T4 DNA Ligasa 10X*, 4U *T4 DNA Ligasa*, 8U *BsmBI* y H₂O hasta un volumen final de 15 μ L. El programa utilizado en el termociclador sigue el protocolo descrito en la *Tabla 6*.

En la *Figura 9* se muestra un esquema explicativo del ensamblaje binario de los gRNAs y los módulos Cas.

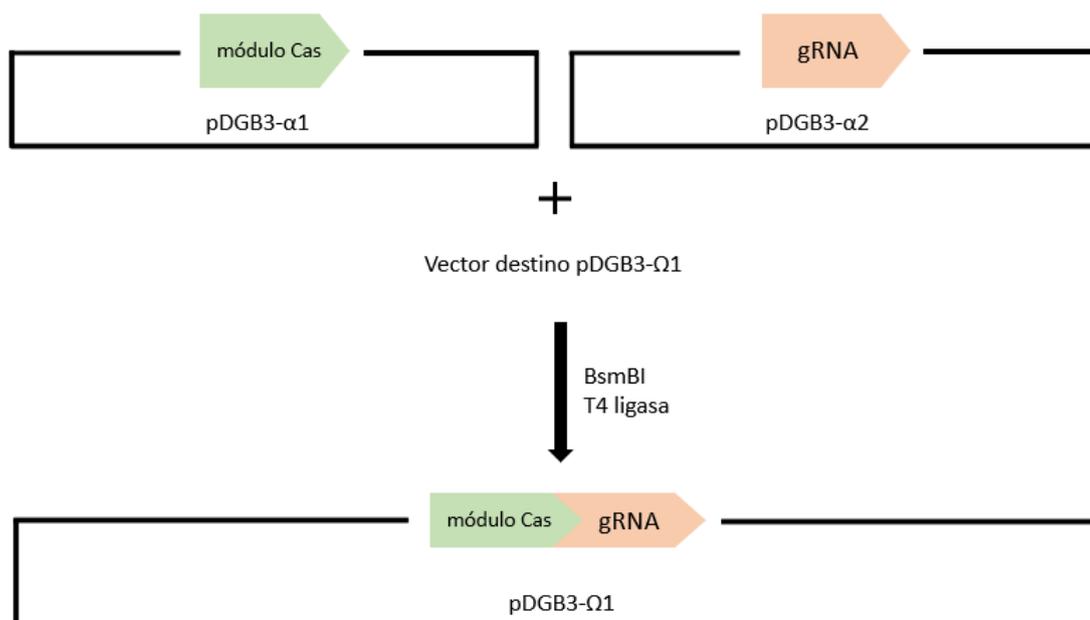


Figura 9. Esquema mostrando el ensamblaje binario de las construcciones Cas-gRNA.

5.5 Ensayos de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*.

La expresión transitoria de las construcciones generadas en este trabajo se llevó a cabo mediante la agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*. En primer lugar, se prepararon los cultivos de *A. tumefaciens* inoculando a 5 ml de LB líquido suplementado con los antibióticos correspondientes 15 μ L de un cultivo bacteriano saturado. Una vez transcurridas 24 h de incubación a 28°C, los cultivos se centrifugaron a 4000rpm durante 15 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 10 ml de solución de agroinfiltración (10 mM MES, 10 mM MgCl₂, 100 μ M acetosiringona en DMSO), y se llevó a una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0,2. Seguidamente, se incubaron durante 2 h en un agitador horizontal a temperatura ambiente y en oscuridad.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a infiltrar una planta con cada construcción (tres hojas consecutivas por planta) haciendo uso de una jeringuilla sin aguja. La recogida de muestras se realizó 4-5 días post-infiltración empleando un sacabocados (0,8 cm de diámetro). Se tomaron 2 discos por hoja y se mantuvieron a -80°C hasta la posterior extracción de DNA genómico.

6 Resultados.

6.1 Diseño y ensamblaje de construcciones CRISPR/Cas para base-editing.

Con el objetivo de generar un amplio abanico de construcciones CRISPR/Cas para editado de base, se realizó una búsqueda bibliográfica de los editores, los guías y las endonucleasas probadas hasta la fecha que mostraban buena eficiencia, tanto de “indels” como de editado de base.

En cuanto a las endonucleasas, decidimos utilizar la Cas9 de *Streptococcus pyogenes* y sus variantes inactivas nCas9 y dCas9. Adicionalmente, seleccionamos la endonucleasa Cas12a termotolerante de *Lachnospiraceae bacterium* ND2006, así como su variante inactiva dCas12a (generada previamente en el laboratorio de D. Orzaez, IBMCP).

Por otro lado, escogimos aquellos editores de base que presentaban buenas características en base a la bibliografía anterior. Entre nuestras opciones se encontraban los editores basados en la citidina deaminasa APOBEC1 (PBE) y APOBEC3A (A3A-PBE); y los editores basados en la adenina deaminasa ecTadA (PTG-ABE7.10) y TadA8e (PTG-ABE8e). En la *Tabla 9* se muestra la ventana de edición de los editores mencionados. Finalmente, seleccionamos las deaminasas APOBEC3A y TadA8e debido al mayor rango de nucleótidos editables y a la mejor eficiencia probada en planta que presentan (Z. Wang et al., 2021; Zong et al., 2018).

Tabla 9. Ventanas de edición de los editores de base disponibles en bibliografía anterior (Z. Wang et al., 2021; Zong et al., 2018).

Editor	Ventana de edición
PBE	7 nucleótidos
A3A-PBE	17 nucleótidos
PTG-ABE7.10	4 nucleótidos
PTG-ABE8e	5 nucleótidos

De igual manera, decidimos seleccionar guías diseñados frente a tres genes bien estudiados por diversos grupos de investigación: FLOWERING LOCUS T (**FT**) (Bernabé-Orts et al., 2019), PHYTOENE DESATURASE (**PDS**) (Hsu et al., 2021; Z. Wang et al., 2021) y ETHYLENE RECEPTOR SENSOR (**ETR**) (Hsu et al., 2021). Estos guías fueron escogidos en función de la eficiencia de editado y del número de nucleótidos susceptibles de ser cambiados por los editores de bases. En la *Tabla 10* se muestran las diversas secuencias dianas disponibles en bibliografía anterior, así como el número de bases susceptibles de ser cambiadas en cada una de ellas, y su eficiencia de generación de “indels” y de editado de base probada.

Tabla 10. Genes y secuencias diana, número de bases susceptibles de ser editadas por las deaminasas A3A/ABE8e, y eficiencia de "indels"/editado de base de los guías disponibles en bibliografía anterior. En rojo se muestra la PAM, y en verde los genes diana seleccionados para este trabajo.

	Gen diana	Secuencia diana	A3A (C → T)	ABE8e (A → G)	Eficiencia "indels"	Eficiencia editado de base	Referencia
nCas9	FT	GGc ^{ve} aaTAGATCTTGTA ^{ve} AAA ^{ve} GGG	2	2	10%		(Bernabé-Orts et al., 2019)
	XT2A	G ^{ve} aaaTTGGG ^{ve} AAAA ^{ve} ACTAG ^{ve} TGG	0	2	5,5%		(Bernabé-Orts et al., 2019)
	NbPDS-1.2	TTGcGaTGcCTAACAAGCCAG ^{ve} GGG	2	1	70%		(Hsu et al., 2021)
	NbETR1-1	aacTGcacaAGA ^{ve} CCCATCTATAT ^{ve} TGG	3	4		40%	(Hsu et al., 2021)
	PDS-T2	TGc ^{ve} aaaTTGAGTTGGGAGT ^{ve} GAGG	1	3		22,89%	(Z. Wang et al., 2021)
dCas12	TFL1	TTTAACTGTGGGACTGAATGaaTc	1	2	27,9%		(Bernabé-Orts et al., 2019)
	FT	TTTACAAGATCTATTGGccTaaGa	2	3	23%		(Bernabé-Orts et al., 2019)
	XT2A	TTTATCCACTAGTTTTT ^{ve} cccaaT	3	2	6,5%		(Bernabé-Orts et al., 2019)
	XT2B	TTTTGCTCTGATTGCACaAaTGGaa	1	3	0%		(Bernabé-Orts et al., 2019)
	NbPDS-1	TTTCTCATCCAGTCCTT ^{ve} AaacTTaaac	3	5	30%		(Hsu et al., 2021)
	NbPDS-2	TTTGACATGGCAATGAA ^{ve} accTcaTcTG	5	2	0%		(Hsu et al., 2021)

6.1.1 Diseño y ensamblaje de módulos Cas.

En este trabajo se generaron un total de trece módulos Cas: cuatro de ellos diseñados para producir editado "single-base", dos diseñados para producir editado "dual-base", otros dos diseñados para producir editado "multi-base", y finalmente cinco que actúan como controles de edición positivos o negativos.

Los módulos "single-base" se componen de un promotor 35s, un editor de base (citidina deaminasa APOBEC3A o adenina deaminasa TadA8e), una endonucleasa inactiva (nCas9 o dCas12), el UGI en el caso de utilizar una citidina deaminasa como editor, y un terminador Tnos. En la Figura 10 se muestra la posición escogida para cada componente dentro de la gramática GoldenBraid.

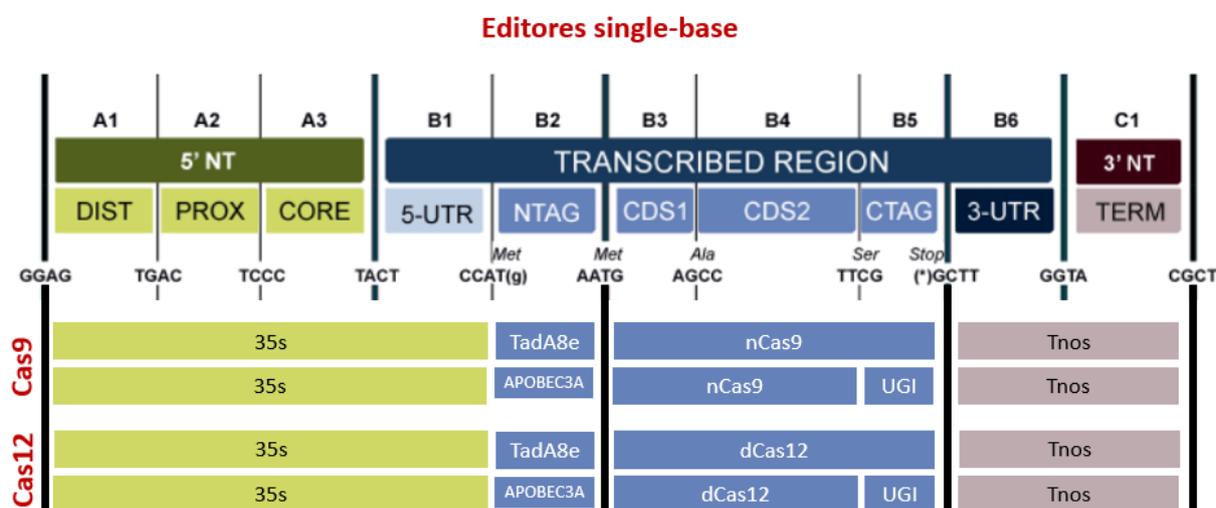


Figura 10. Gramática GoldenBraid seguida para el ensamblaje de los editores "single-base".

Los módulos “dual-base” se componen de un promotor 35s, ambos editores de bases APOBEC3A-TadA8e, una endonucleasa inactiva (nCas9 o dCas12), el UGI, y un terminador Tnos. En la *Figura 11* se muestra la posición escogida para cada componente dentro de la gramática GoldenBraid.

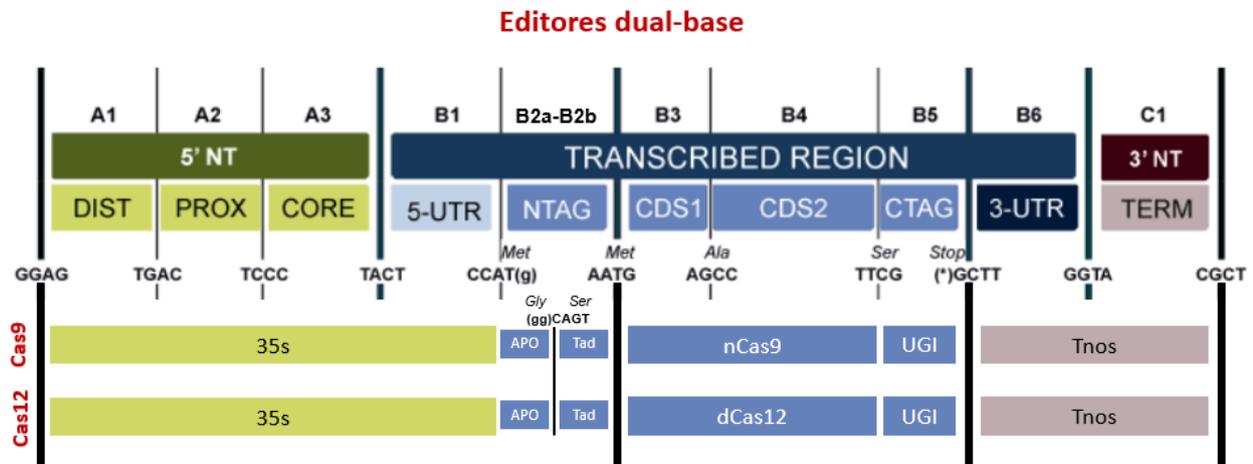


Figura 11. Gramática GoldenBraid seguida para el ensamblaje de los editores “dual-base”.

En cuanto a los módulos “multi-base”, están compuestos por un promotor 35s, ambos editores de bases APOBEC3A-TadA8e, una endonucleasa inactiva (nCas9 o dCas12), y un terminador Tnos. En la *Figura 12* se muestra la posición escogida para cada componente dentro de la gramática GoldenBraid. Tal como se comentó en la Introducción, se pueden inducir los cambios C→T, A→G, C→G Y C→A en ausencia del componente UNG, produciéndose la reparación del DNA mediante la acción de las glicosilasas propias de la célula.

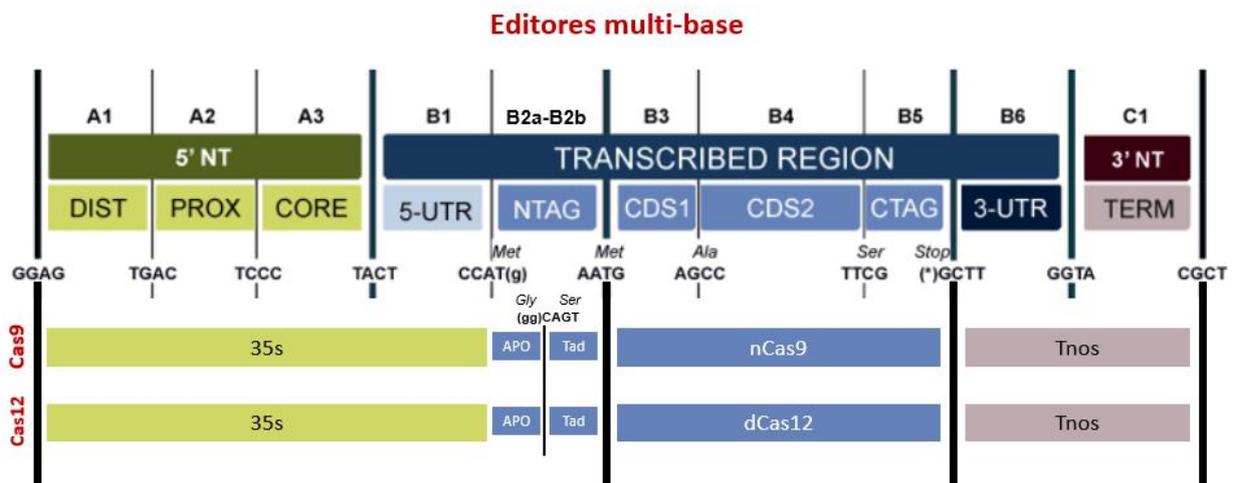


Figura 12. Gramática GoldenBraid seguida para el ensamblaje de los editores “multi-base”.

Adicionalmente, generamos módulos “controles” para la edición. Estas construcciones se componen de un promotor 35s, la endonucleasa Cas9/Cas12 en el caso de ser un control positivo o la nCas9/dCas9/dCas12 en el caso de ser un control negativo, y un terminador Tnos. En la *Figura 13* se muestra la posición escogida para cada componente dentro de la gramática GoldenBraid.

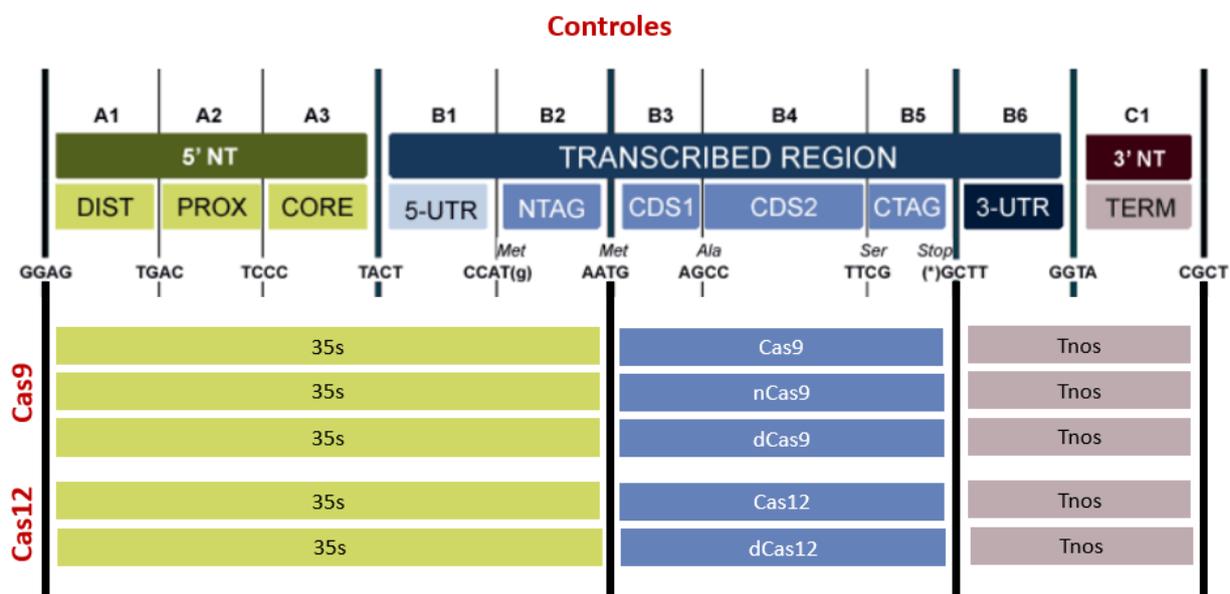


Figura 13. Gramática GoldenBraid seguida para el ensamblaje de los controles de edición.

Las trece construcciones finales se ensamblaron siguiendo el protocolo detallado en el apartado 5.4.3, y aparecen reflejadas en la *Tabla 11*.

Tabla 11. Construcciones finales de los módulos “single-base”, “dual-base”, “multi-base”, y controles de edición.

Nombre	Vector	Descripción
GB1	pDGB3-α1	35s:APOBEC3A:dCas12a:UGI:Tnos
GB2	pDGB3-α1	35s:APOBEC3A:nCas9:UGI:Tnos
GB3	pDGB3-α1	35s:TadA8e:dCas12a:Tnos
GB4	pDGB3-α1	35s:TadA8e:nCas9:Tnos
GB5	pDGB3-α1	35s:dCas12a:Tnos
GB6	pDGB3-α1	35s:APOBEC3A:TadA8e:dCas12a:UGI:Tnos
GB7	pDGB3-α1	35s:APOBEC3A:TadA8e:dCas12a:Tnos
GB8	pDGB3-α1	35s:APOBEC3A:TadA8e:nCas9:UGI:Tnos
GB9	pDGB3-α1	35s:APOBEC3A:TadA8e:nCas9:Tnos
GB10	pDGB3-α1	35s:Cas9:Tnos
GB11	pDGB3-α1	35s:Cas12:Tnos
GB12	pDGB3-α1	35s:dCas9:Tnos
GB13	pDGB3-α1	35s:nCas9:Tnos

Cabe destacar que los módulos Cas están contenidos en el vector destino pDGB3- α 1, el cual es compatible con pDGB3- α 2. Esto posibilita, si fuese necesario, un futuro ensamblaje binario de las construcciones contenidas en ambos plásmidos en el vector destino pDGB3- Ω 1.

Una vez ensamblados los módulos Cas, se introdujeron en *E. coli* y se validaron mediante digestión enzimática y electroforesis, como se detalla en el apartado 5.2.3, 5.3.2, 5.3.3 y 5.3.4. A modo de ejemplo, en la *Figura 14* se muestran los patrones de bandas generados tras la digestión de los módulos GB1, GB2, GB3, GB4, GB5 y GB6 *in silico* vs los observados con la enzima EcoRV.

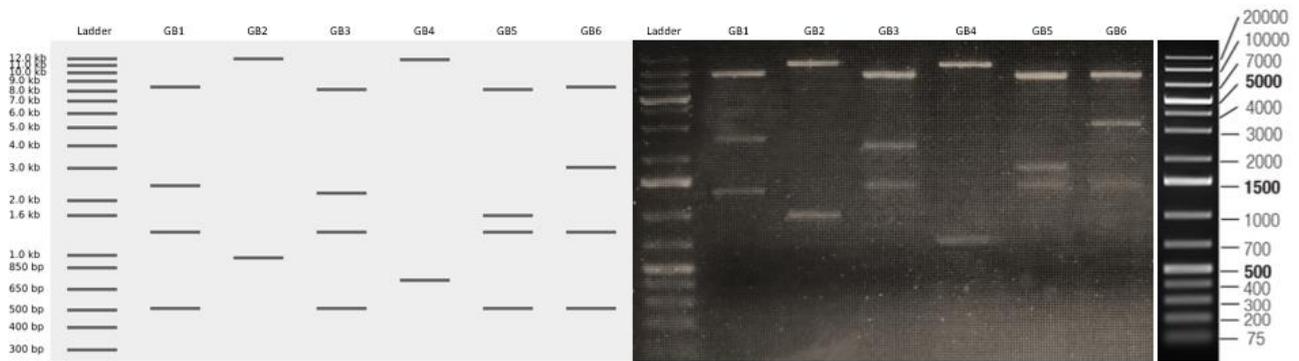


Figura 14. Patrón de bandas generado mediante restricción enzimática de algunos módulos Cas in silico (izquierda) vs observado (derecha) con EcoRV.

6.1.2 Diseño y ensamblaje de los gRNAs.

En este trabajo se emplearon un total de cinco RNA guías basados en diseños previos publicados en la bibliografía. Tres de ellos dirigen a la endonucleasa Cas9, nCas9 o dCas9 a los genes FT, ETR y PDS-T2; mientras que los dos restantes guían a la endonucleasa Cas12 o dCas12 a las dianas ubicadas en los genes FT y PDS-1.

Para llevar a cabo las construcciones de los guías, se ideó en primer lugar, en qué posición del ensamblaje final se colocaría cada pieza. De hecho, determinar la categoría GB de cada componente es fundamental para que las reacciones de restricción-ligación se realicen correctamente y se pueda obtener una construcción con los diferentes elementos en el orden deseado.

Cada guía diseñado para la Cas9 se compone de un promotor U626, un Gly-tRNA, el protoespaciador o secuencia diana, un scaffold y una cola polyT. En la *Figura 15* se muestra la posición que se decidió emplear para cada componente en la gramática GoldenBraid. Las tres construcciones finales de los guías se ensamblaron siguiendo el protocolo detallado en el apartado 5.4.1, y aparecen reflejadas en la *Tabla 12*.

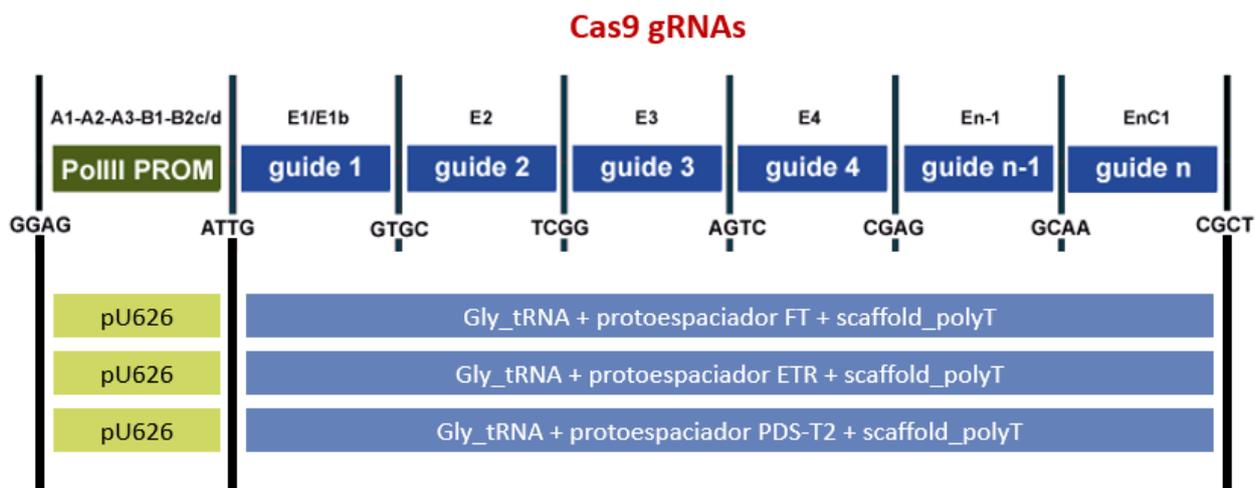


Figura 15. Gramática GoldenBraid seguida para el ensamblaje de los gRNAs de Cas9.

Tabla 12. Construcciones finales de los gRNAs diseñados para Cas9.

Nombre	Vector	Descripción
FT (Cas9)	pDGB3- α 2	pU626:gFT
ETR	pDGB3- α 2	pU626:gETR
PDST2	pDGB3- α 2	pU626:gPDST2

En el caso de los guías diseñados para la Cas12, están formados por un promotor U626 adaptado que contiene el scaffold (DR), el protoespaciador o secuencia diana, una señal de procesamiento HDV y una cola polyT. En la *Figura 16* se muestra un esquema de la posición que se decidió emplear para cada componente dentro de la gramática GoldenBraid. Las dos construcciones finales de los guías se ensamblaron siguiendo el protocolo detallado en el apartado 5.4.2, y aparecen reflejadas en la *Tabla 13*.

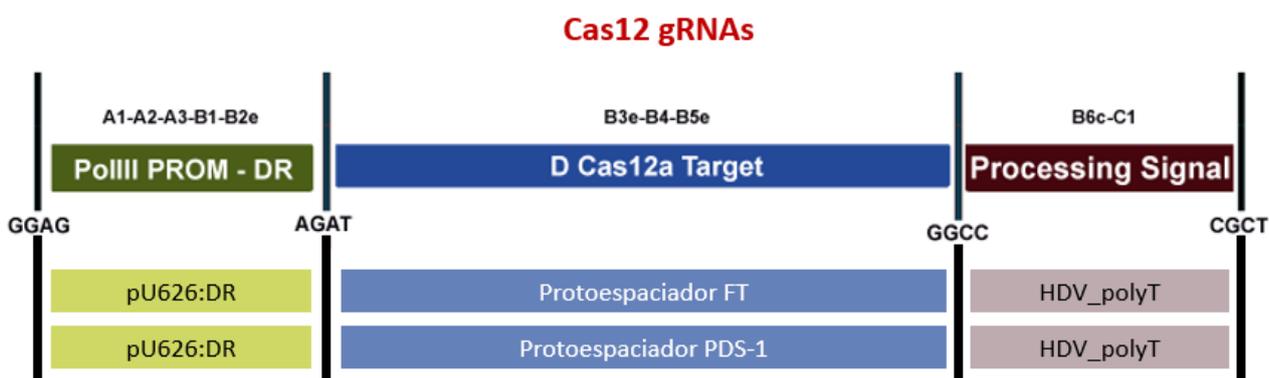


Figura 16. Gramática GoldenBraid seguida para el ensamblaje de los gRNAs de Cas12.

Tabla 13. Construcciones finales de los gRNAs diseñados para Cas12.

Nombre	Vector	Descripción
FT (Cas12)	pDGB3- α 2	pU626:gFT:HDV
PDS1	pDGB3- α 2	pU626:gPDS1:HDV

Es importante destacar que los guías están contenidos en el vector destino pDGB3- α 2, el cual es compatible con pDGB3- α 1. Como ya hemos comentado, esto posibilita un futuro ensamblaje binario de las construcciones contenidas en ambos plásmidos en el vector destino pDGB3- Ω 1.

Una vez ensamblados los gRNAs, se introdujeron en *E. coli* y se validaron mediante digestión enzimática y electroforesis, como se detalla en el apartado 5.2.3, 5.3.2, 5.3.3 y 5.3.4. En la *Figura 17* se muestran los patrones de bandas generados tras la digestión de los guías *in silico* (empleando el software *Benchling*) vs los observados con la enzima *NdeI*.

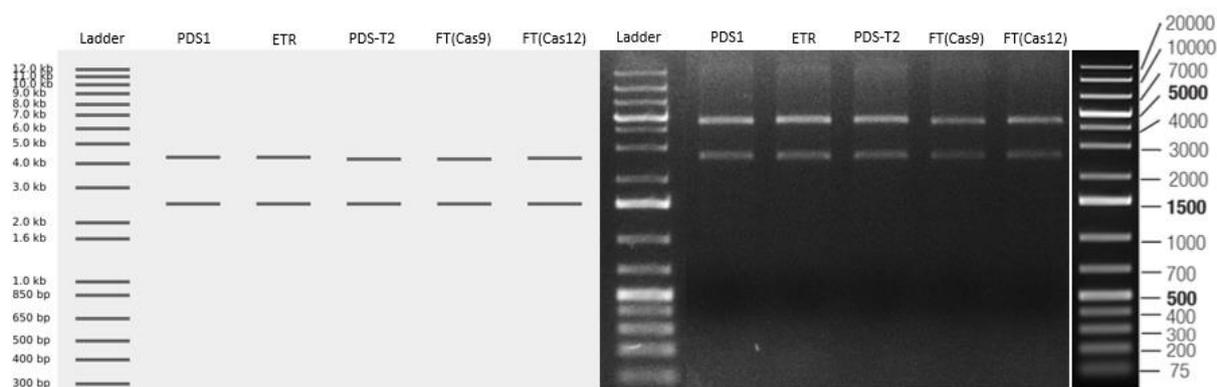


Figura 17. Patrón de bandas generado mediante restricción enzimática con NdeI de las construcciones con los gRNAs in silico (izquierda) vs observado (derecha).

6.2 Ensayo de edición genética: expresión transitoria en *cis* vs en *trans*.

6.2.1 Ensamblaje binario de las construcciones GB10-FT y GB11-FT.

Para comprobar si la eficiencia del sistema CRISPR/Cas mejora al expresar todos sus componentes (módulo Cas y gRNA) en un único vector, decidimos obtener dos construcciones adicionales que incluyeran las Cas control (Cas9 o Cas12) junto con el guía FT en el vector destino pDGB3- Ω 1.

Las dos construcciones finales se obtuvieron mediante el ensamblaje binario del módulo Cas (α 1) y el gRNA (α 2) siguiendo el protocolo detallado en el apartado 5.4.4, y aparecen reflejadas en la *Tabla 14*.

Tabla 14. Construcciones finales de GB10-FT y GB11-FT en un solo vector.

Nombre	Vector	Descripción
GB10-FT	pDGB3- Ω 1	35s:Cas9:Tnos-pU626:gFT
GB11-FT	pDGB3- Ω 1	35s:Cas12:Tnos-pU626:gFT:HDV

Una vez ensambladas las construcciones en el vector omega, se introdujeron en *E. coli* y se validaron mediante digestión enzimática y electroforesis, como se detalla en el apartado 5.2.3, 5.3.2, 5.3.3 y 5.3.4. En la *Figura 18* se muestran los patrones de bandas generados tras la digestión de los constructos *in silico* vs los observados con la enzima *NdeI* para GB10-FT, y *NdeI*+*HindIII* para GB11-FT.

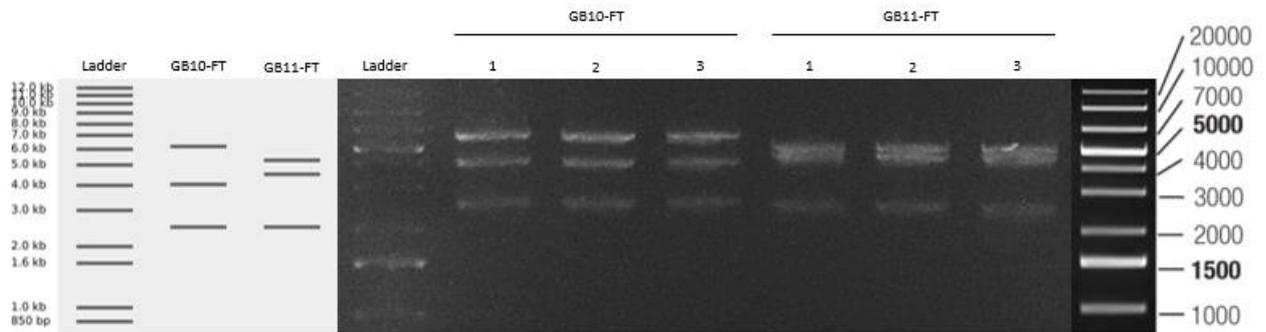


Figura 18. Patrón de bandas generado mediante restricción enzimática *in silico* (izquierda) vs observado (derecha) de las construcciones GB10-FT y GB11-FT con la enzima NdeI y NdeI+HindIII, respectivamente.

6.2.2 Comparativa de edición genética: expresión *cis* vs *trans*.

Con el fin de determinar qué sistema de expresión es más eficiente en la planta, decidimos llevar a cabo la expresión comparativa de los elementos de edición en *cis* vs en *trans*. Para realizar esta prueba escogimos los controles de edición positivos GB10 y GB11 ya que actúan generando “indels” en la secuencia diana, algo que ocurre con mayor frecuencia que los cambios de base y por tanto los resultados obtenidos son fácilmente visualizables. Además, asumimos que estos resultados son extrapolables a nuestros editores de bases.

A nivel experimental, se realizaron dos tipos de agroinfiltraciones en *Nicotiana benthamiana*. Por un lado, se infiltró con una mezcla de las construcciones que contenían los controles de edición positivos Cas9 (GB10) o Cas12 (GB11) (en un vector $\alpha 1$), junto con los módulos que contenían el RNA guía dirigido al gen FT para cada una de las endonucleasas (en un vector $\alpha 2$). Por otro lado, se infiltraron las construcciones GB10-FT y GB11-FT que contenían el correspondiente guía de FT y la endonucleasa en un solo vector omega (Figura 19).

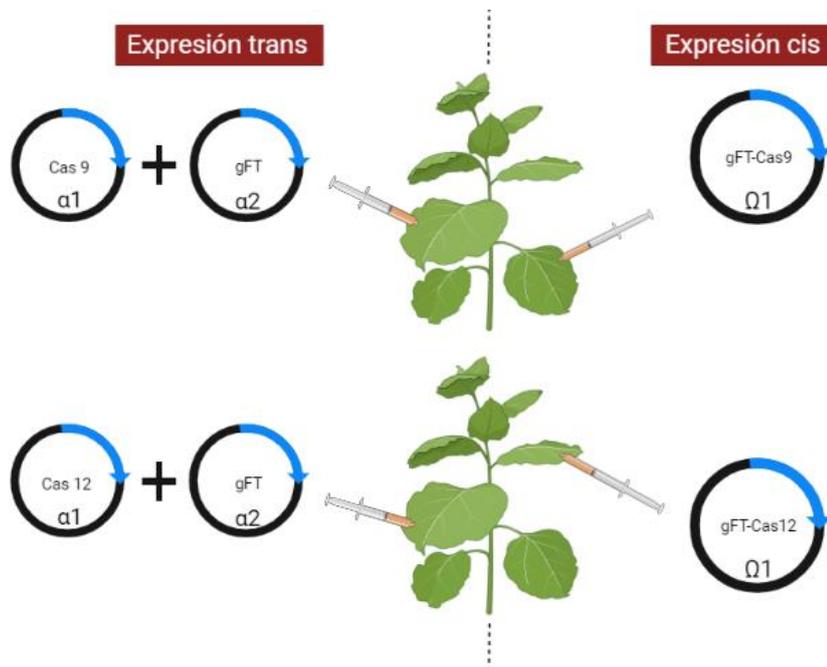


Figura 19. Diseño experimental de la expresión comparativa del sistema CRISPR en *cis* vs *trans*.

Siguiendo el protocolo detallado en los apartados 5.3.1, 5.3.5, 5.3.7 y 5.5, se tomaron muestras de las hojas agroinfiltradas, se extrajo el DNA genómico, y se amplificó la zona diana del gen FT por PCR. Finalmente se secuenció por Sanger la región amplificada y los datos obtenidos se analizaron mediante la herramienta bioinformática *Synthego*.

En la *Figura 20* se muestran los resultados obtenidos en la comparativa del sistema CRISPR en cis vs en trans. En ambos casos (Cas9, Cas12) se obtuvo una mayor eficiencia de editado en las muestras de *N. benthamiana* infiltradas con las construcciones expresadas en cis, ya que como vemos el porcentaje de indels es más alto (siendo del 5,6% para la Cas9 y del 56,3% para la Cas12). Estos resultados son significativos únicamente para la endonucleasa Cas12 ($p=0,006$). Sin embargo, la Cas9 también muestra niveles ligeramente más altos de editado expresándose en un solo vector. Cabe destacar que no se aprecia gran variabilidad de expresión entre hojas.

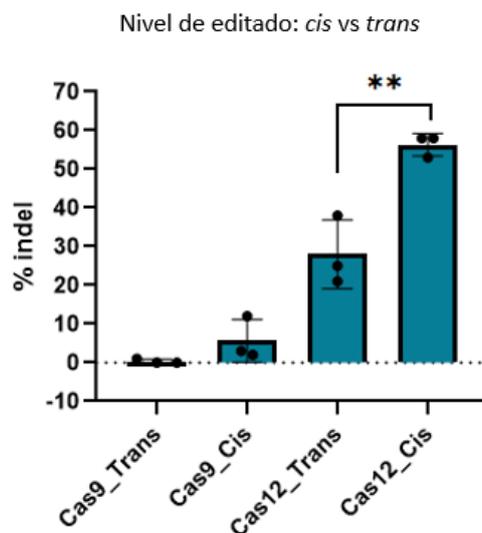


Figura 20. Resultados de editado obtenidos para una expresión transitoria del sistema CRISPR/Cas en cis vs en trans.

6.3 Ensamblaje binario de las construcciones gRNA-Cas.

Basándonos en los resultados obtenidos en el apartado 6.2, decidimos ensamblar los módulos que contenían los gRNAs y los módulos que contenían las Cas en un solo vector, asegurando así una mejor expresión de la construcción CRISPR/Cas. Para ello, llevamos a cabo el ensamblaje binario de los gRNAs ($\alpha 2$) y las Cas ($\alpha 1$) en un único vector ($\Omega 1$) siguiendo el procedimiento explicado en el apartado 5.4.4. Se generaron un total de veinte construcciones CRISPR/Cas9, y once construcciones CRISPR/Cas12.

Las treinta y una construcciones finales aparecen reflejadas en la *Tabla 15* y *Tabla 16*.

Tabla 15. Construcciones finales de los módulos CRISPR/Cas9 en un solo vector.

Nombre	Vector	Descripción
GB2-FT	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:nCas9:UGI:Tnos-pU626:gFT
GB2-ETR	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:nCas9:UGI:Tnos-pU626:gETR
GB2-PDST2	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:nCas9:UGI:Tnos-pU626:gPDST2
GB4-FT	pDGB3-Ω1	35s:TadA8e:nCas9:Tnos-pU626:gFT
GB4-ETR	pDGB3-Ω1	35s:TadA8e:nCas9:Tnos-pU626:gETR
GB4-PDST2	pDGB3-Ω1	35s:TadA8e:nCas9:Tnos-pU626:gPDST2
GB8-FT	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:TadA8e:nCas9:UGI:Tnos-pU626:gFT
GB8-ETR	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:TadA8e:nCas9:UGI:Tnos-pU626:gETR
GB8-PDST2	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:TadA8e:nCas9:UGI:Tnos-pU626:gPDST2
GB9-FT	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:TadA8e:nCas9:Tnos-pU626:gFT
GB9-ETR	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:TadA8e:nCas9:Tnos-pU626:gETR
GB9-PDST2	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:TadA8e:nCas9:Tnos-pU626:gPDST2
GB10-ETR	pDGB3-Ω1	35s:Cas9:Tnos-pU626:gETR
GB10-PDST2	pDGB3-Ω1	35s:Cas9:Tnos-pU626:gPDST2
GB12-FT	pDGB3-Ω1	35s:dCas9:Tnos-pU626:gFT
GB12-ETR	pDGB3-Ω1	35s:dCas9:Tnos-pU626:gETR
GB12-PDST2	pDGB3-Ω1	35s:dCas9:Tnos-pU626:gPDST2
GB13-FT	pDGB3-Ω1	35s:nCas9:Tnos-pU626:gFT
GB13-ETR	pDGB3-Ω1	35s:nCas9:Tnos-pU626:gETR
GB13-PDST2	pDGB3-Ω1	35s:nCas9:Tnos-pU626:gPDST2

Tabla 16. Construcciones finales de los módulos CRISPR/Cas12 en un solo vector.

Nombre	Vector	Descripción
GB1-FT	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:dCas12a:UGI:Tnos-pU626:gFT:HDV
GB1-PDS1	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:dCas12a:UGI:Tnos-pU626:gPDS1:HDV
GB3-FT	pDGB3-Ω1	35s:TadA8e:dCas12a:Tnos-pU626:gFT:HDV
GB3-PDS1	pDGB3-Ω1	35s:TadA8e:dCas12a:Tnos-pU626:gPDS1:HDV
GB5-FT	pDGB3-Ω1	35s:dCas12a:Tnos-pU626:gFT:HDV
GB5-PDS1	pDGB3-Ω1	35s:dCas12a:Tnos-pU626:gPDS1:HDV
GB6-FT	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:TadA8e:dCas12a:UGI:Tnos-pU626:gFT:HDV
GB6-PDS1	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:TadA8e:dCas12a:UGI:Tnos-pU626:gPDS1:HDV
GB7-FT	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:TadA8e:dCas12a:Tnos-pU626:gFT:HDV
GB7-PDS1	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:TadA8e:dCas12a:Tnos-pU626:gPDS1:HDV
GB11-PDS1	pDGB3-Ω1	35s:Cas12:Tnos-pU626:gPDS1:HDV

Una vez ensambladas dichas construcciones, se introdujeron en *E. coli* y se validaron mediante digestión enzimática y electroforesis, como se detalla en el apartado 5.2.3, 5.3.2, 5.3.3 y 5.3.4. A modo de ejemplo, en la *Figura 21* se muestran los patrones de bandas generados tras la digestión de los módulos GB6-FT, GB8-FT, GB8-PDST2, GB12-ETR, GB12-FT y GB13-PDST2 *in silico* vs los observados con la enzima BamHI+HindIII para GB6-FT, y NdeI para el resto.

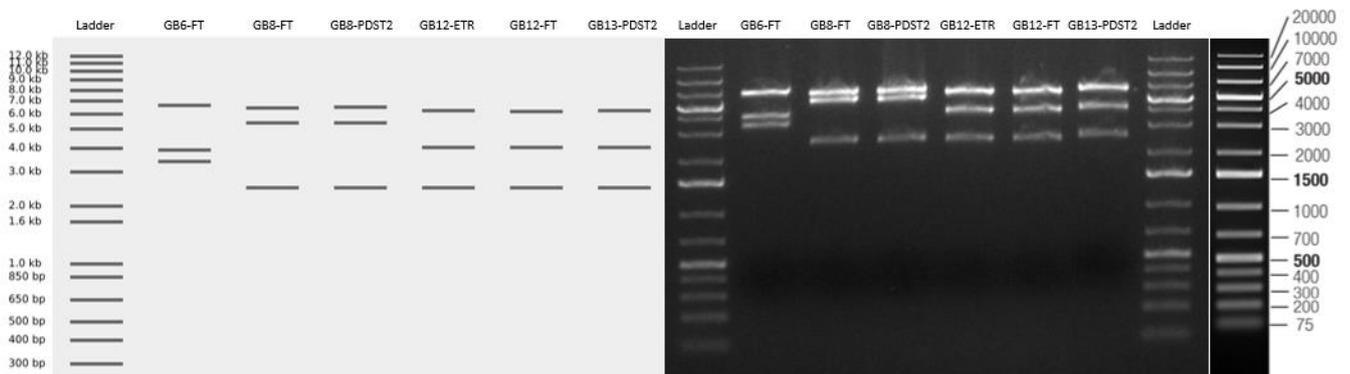


Figura 21. Patrón de bandas generado mediante restricción enzimática de algunos módulos CRISPR/Cas in silico (izquierda) vs observado (derecha) con BamHI+HindIII (GB6-FT) y NdeI (GB8-FT, GB8-PDST2, GB12-ETR, GB12-FT y GB13-PDST2).

6.4 Expresión transitoria de construcciones CRISPR/Cas y evaluación del nivel de editado de base mediante secuenciación Sanger.

En este experimento se pretendía evaluar, por medio de la expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*, el potencial de editado de base de las diferentes construcciones CRISPR/Cas generadas mediante ensamblaje GoldenBraid. Asimismo, se quería comprobar si la técnica de secuenciación Sanger era suficientemente potente para detectar el editado de bases en dichas plantas.

Para ello, a modo de prueba de concepto se expresaron de forma transitoria las siguientes construcciones:

- Construcciones CRISPR/nCas9 con el gen ETR como diana. Se escogieron dos construcciones “single-base”, una construcción “dual-base”, una construcción “multi-base”, un control de edición positivo y dos negativos.
- Construcciones CRISPR/dCas12 con el gen PDS1 como diana. Se escogieron dos construcciones “single-base”, una construcción “dual-base”, una construcción “multi-base”, un control de edición positivo y uno negativo.

Todas las construcciones utilizadas aparecen recogidas en la *Tabla 17*.

Tabla 17. Construcciones CRISPR/Cas utilizadas en el experimento de expresión transitoria para evaluar el nivel de editado de base.

		Nombre	Vector	Descripción	
Cas9	Single-base	GB2-ETR	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:nCas9:UGI:Tnos-pU626:gETR	
		GB4-ETR	pDGB3-Ω1	35s:TadA8e:nCas9:Tnos-pU626:gETR	
	Dual-base	GB8-ETR	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:TadA8e:nCas9:UGI:Tnos-pU626:gETR	
	Multi-base	GB9-ETR	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:TadA8e:nCas9:Tnos-pU626:gETR	
	Control -	Control +	GB10-ETR	pDGB3-Ω1	35s:Cas9:Tnos-pU626:gETR
		Control -	GB12-ETR	pDGB3-Ω1	35s:dCas9:Tnos-pU626:gETR
GB13-ETR			pDGB3-Ω1	35s:nCas9:Tnos-pU626:gETR	
Cas12	Single-base	GB1-PDS1	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:dCas12a:UGI:Tnos-pU626:gPDS1:HDV	
		GB3-PDS1	pDGB3-Ω1	35s:TadA8e:dCas12a:Tnos-pU626:gPDS1:HDV	
	Dual-base	GB6-PDS1	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:TadA8e:dCas12a:UGI:Tnos-pU626:gPDS1:HDV	
	Multi-base	GB7-PDS1	pDGB3-Ω1	35s:APOBEC3A:TadA8e:dCas12a:Tnos-pU626:gPDS1:HDV	
	Control -	Control +	GB11-PDS1	pDGB3-Ω1	35s:Cas12:Tnos-pU626:gPDS1:HDV
		Control -	GB5-PDS1	pDGB3-Ω1	35s:dCas12a:Tnos-pU626:gPDS1:HDV

Siguiendo el protocolo detallado en los apartados 5.3.1, 5.3.5, 5.3.7 y 5.5, se tomaron muestras de las hojas agroinfiltradas, se extrajo el DNA genómico, y se amplificó la zona diana del gen ETR/PDS1 por PCR. Finalmente, se secuenciaron por Sanger y los datos obtenidos se analizaron mediante la herramienta bioinformática *Benchling*. Este software permite realizar el alineamiento de los cromatogramas de las secuencias editadas con la secuencia *wildtype*, y observar si se ha producido alguna conversión de base.

Para la mayoría de editores probados en este ensayo, las secuencias diana obtenidas fueron similares a las secuencias de los controles negativos y no se observó cambio de base ni “indel” (dichos cromatogramas aparecen recogidos en el *Anexo I*).

A pesar de ello, pudimos apreciar a niveles bajos un cambio de base producido por un editor “single-base” dirigido por la nucleasa Cas12, y otro producido por un editor “multi-base” y la nucleasa Cas9.

Como podemos observar en la *Figura 22*, se produjo un cambio de base C→T en los cromatogramas de las tres muestras infiltradas con la construcción “single-base” GB1-PDS1. A diferencia de lo que ocurre en las tres réplicas del control negativo GB5-PDS1, vemos cómo un pico rojo (T) se superpone al pico azul (C) en dos de las citosinas de la secuencia diana, indicando así el cambio de base.

Del mismo modo, en la *Figura 23* podemos apreciar un cambio de base muy leve A→G en los cromatogramas de las tres muestras infiltradas con la construcción “multi-base” GB9-ETR. A diferencia de lo que ocurre en los dos controles negativos GB12-ETR y GB13-ETR, vemos cómo un pico negro (G) se superpone al pico verde (A) en una de las adeninas de la secuencia diana, indicando así el cambio de base.

Debido a la baja eficiencia de editado de base obtenida, no se probó el resto de construcciones generadas en este trabajo.

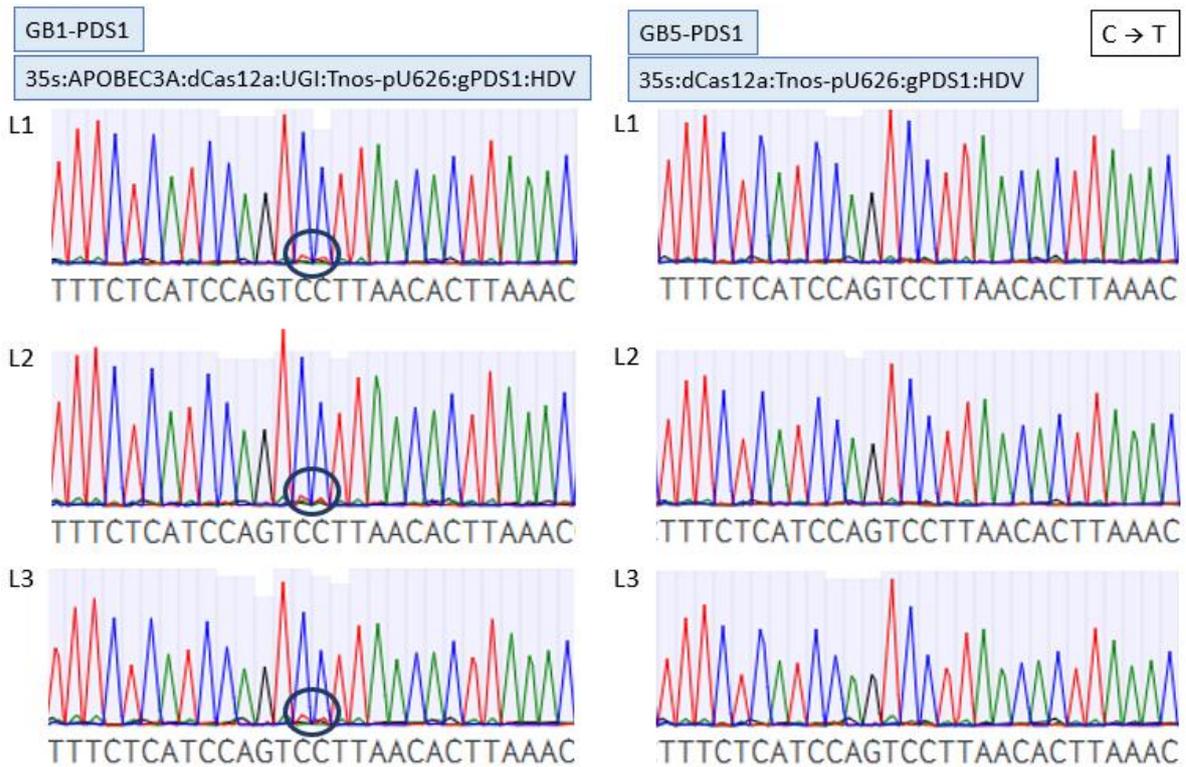


Figura 22. Cambios de base producidos por GB1-PDS1. En los cromatogramas se muestra la secuencia diana de dCas12: a la izquierda la obtenida con el editor citidina deaminasa, y a la derecha la obtenida con el control negativo. Se muestra rodeada la zona de conversión de base.

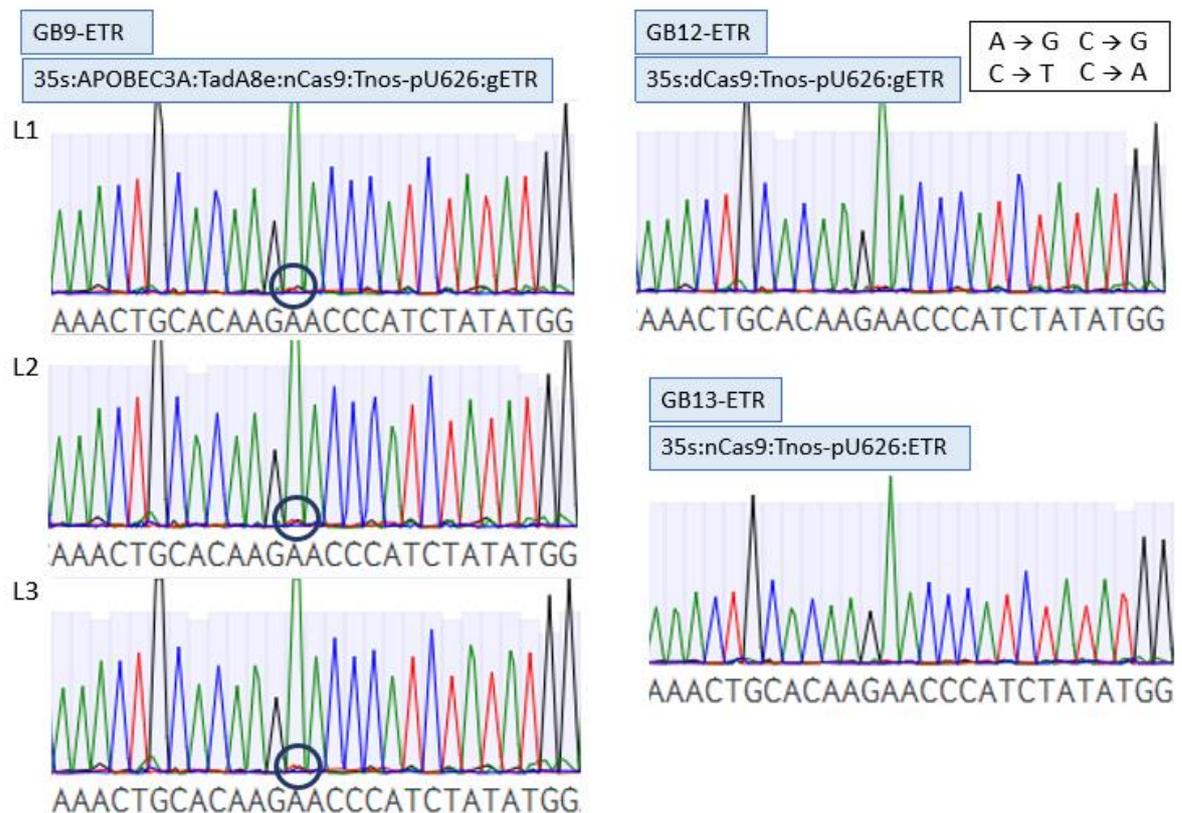


Figura 23. Cambios de base producidos por GB9-ETR. En los cromatogramas se muestra la secuencia diana de nCas9: a la izquierda la obtenida con el editor citidina-adenina deaminasa, y a la derecha la obtenida con los dos controles negativos. Se muestra rodeada la zona de conversión de base.

7 Discusión.

La evolución dirigida constituye un poderoso método para modificar genes de interés *in vivo* con el fin de que adquieran propiedades mejoradas o novedosas. Aunque es cierto que existen varios sistemas de evolución dirigida, todos ellos han sido desarrollados para bacterias o levaduras, y no son fácilmente aplicables a plantas. Sin embargo, recientemente se han generado herramientas derivadas de la tecnología CRISPR/Cas, como el “base-editing”, que nos permiten abordar este reto en plantas. El objetivo de este trabajo Fin de Máster fue la puesta a punto de un sistema de editado de base mediado por CRISPR en la planta *Nicotiana benthamiana*.

Los proyectos de ingeniería genética dependen en gran medida de la disponibilidad de sistemas de ensamblaje de DNA simples, rápidos y altamente eficientes. Entre las diversas estrategias posibles, el sistema de ensamblaje seleccionado para este proyecto fue GoldenBraid, un sistema modular ampliamente empleado por la comunidad científica de biotecnología de plantas. Al igual que otros sistemas modulares, GoldenBraid se caracteriza por su capacidad combinatorial. Gracias a ella, se pudieron generar las diversas construcciones CRISPR/Cas de “single-base”, “dual-base” y “multi-base” mediante la simple combinación de piezas de nivel 0 previamente generadas: las nucleasas (Cas9, nCas9, dCas9, Cas12, dCas12), las deaminasas (citidina y adenina deaminasa), y otros elementos incluyendo promotores y terminadores de la transcripción. Además, GoldenBraid sigue una metodología rápida y sencilla de modo que a nivel experimental no se presentaron grandes dificultades para generar las construcciones CRISPR/Cas deseadas. De hecho, la mayoría de plásmidos generados en este trabajo se ensamblaron correctamente en el primer intento. Asimismo, en casi todos los casos se observó que las dos colonias blancas escogidas por construcción contenían plásmidos correctamente clonados, mostrando así la gran eficiencia de ensamblaje del sistema. Todo ello demuestra que, haciendo uso de un sistema de ensamblaje de DNA modular y con un diseño previo adecuado, es posible generar módulos genéticos complejos para editado de base a partir de piezas estandarizadas de forma eficiente.

La evaluación de los editores de base CRISPR/Cas generados en este trabajo se realizó mediante expresión transitoria en *N. benthamiana*. Para expresión transitoria, la co-infiltración con diferentes cepas de *A. tumefaciens* ofrece muchas ventajas, incluyendo la posibilidad de generar plásmidos más simples y pequeños o la capacidad de optimizar la expresión de múltiples proteínas/componentes ajustando la proporción de las diferentes cepas en la suspensión de *Agrobacterium* (Spiegel et al., 2022). Sin embargo, los resultados obtenidos en el ensayo comparativo de la expresión de los elementos de edición en *cis* vs en *trans*, muestran que la eficacia de edición genética en *N. benthamiana* es significativamente mayor cuando la nucleasa y el guía forman parte del mismo vector que cuando ambos componentes se infiltran por separado (Figura 20). Estos resultados se ven apoyados por estudios previos en los que se ha confirmado que agroinfiltrar la planta con diversas cepas de *Agrobacterium* simultáneamente, especialmente cuando se utilizan ODs bajas, puede resultar menos eficiente ya que no todas las células reciben el mismo número ni la misma proporción de T-DNAs (Vazquez-Vilar et al., 2017). Por esta razón, decidimos llevar a cabo el ensamblaje binario de los gRNAs y las Cas en un único vector. Por otro lado, observamos que la eficiencia de editado es mayor en el sistema CRISPR/Cas12 que en el basado en Cas9. Al igual que en nuestro estudio, Bernabé-Orts et al. obtuvieron una mayor frecuencia de “indels” en siete de las ocho dianas estudiadas utilizando la LbCas12a en comparación con la SpCas9 (Bernabé-Orts et al., 2019). Además, se ha comprobado que la versión termotolerante de LbCas12a es de dos a siete veces más eficiente en el editado que la original (Schindele & Puchta, 2020). Estos trabajos previos respaldan los resultados de nuestro proyecto en el que hemos visto que la ttLbCas12a tiene la capacidad de generar niveles más altos de “indels” que la Cas9.

De manera general, no se apreciaron cambios de base significativos con seis de las ocho construcciones de “base-editing” expresadas de forma transitoria en *N. benthamiana*. A pesar de ello, sí detectamos cambios de base producidos a muy bajos niveles por un editor “single-base” dirigido por la nucleasa dCas12, y por un editor “multi-base” y la nucleasa nCas9. La baja eficiencia de editado de base puede ser debida a varias razones. Por un lado, en los ensayos de expresión transitoria solo se detectan los eventos de editado producidos durante los 4-5 días en los que el editor de bases se está expresando. Esto implica la existencia, en las muestras vegetales analizadas, de células en las que sí se ha expresado el editor y células en las que no, por consiguiente, la detección del editado de base va a ser menor. Debido a esto, es posible que la tecnología de “base-editing” requiera de una transformación estable en la que todas las células de la planta expresen el sistema CRISPR/Cas, y su posterior detección.

Por otro lado, la técnica de secuenciación Sanger no parece ser suficientemente sensible para detectar los cambios de bases producidos por estos editores, ya que, a diferencia de lo que ocurre con los “indels” generados por la Cas9 y Cas12, se dan en menor proporción. Asimismo, este tipo de secuenciación no parece indicada para la evaluación de cambios de bases debido al ruido de fondo que presentan los cromatogramas y a la confusión que puede conllevar la presencia de estos pequeños picos. Si bien en experimentos de “base-editing” previos se empleó la secuenciación Sanger para identificar los cambios de nucleótidos, posteriormente se llevó a cabo una secuenciación masiva para determinar de manera más precisa la eficiencia de editado (Liang et al., 2022; Z. Wang et al., 2021). Esto sugiere que el empleo de la secuenciación Sanger, aunque válida para obtener las primeras indicaciones de la funcionalidad de los editores, no es suficiente para obtener unos resultados consistentes de editado de base.

A la vista de nuestros resultados, en este trabajo Fin de Máster se proponen una serie de alternativas para tratar de mejorar la puesta a punto de los sistemas de editado de bases en *N. benthamiana*. Por un lado, con el objetivo de llevar a cabo una mejor evaluación de la funcionalidad de la herramienta, se podría realizar una transformación estable de *N. benthamiana*, seguida de un “screening” fenotípico sencillo, facilitando así la visualización del editado. Siguiendo con esta línea, una estrategia lógica sería el uso de la secuenciación masiva para detectar de manera más precisa las conversiones de base. En un principio, este trabajo iba dirigido a este tipo de secuenciación, concretamente al “amplicon sequencing” de *Illumina*, con el objetivo de esclarecer los resultados obtenidos mediante secuenciación Sanger. Sin embargo, y a pesar de iniciar el diseño de los cebadores y la creación de la librería, el limitado tiempo para la realización de este trabajo impidió finalizar el experimento. Por último, una posible estrategia a seguir para aumentar el número de conversiones de bases producidas en el genoma vegetal sería la optimización del diseño de los editores “multi-base” añadiendo el componente UNG, lo que favorecería los cambios de base de manera simultánea.

A pesar de la baja eficiencia de editado detectada en este estudio, el “base-editing” constituye una herramienta con gran potencial para desarrollar evolución dirigida *in vivo*. Entre las aplicaciones futuras de este sistema encontramos la resistencia a herbicidas, mejorar la resistencia a estreses bióticos y abióticos, reducir el consumo de agua y nitrógeno, mejorar la calidad y rendimiento de los cultivos, etc. Para conseguir estos objetivos, el sistema de editado podría ir dirigido a enzimas clave de procesos fundamentales como la rubisco (fotosíntesis), la ascorbato peroxidasa y la isopreno sintasa (tolerancia a estrés abiótico), etc (Butt et al., 2020). Todo ello, ofrece la posibilidad, por ejemplo, de obtener cultivos mejor adaptados al cambio climático que mejoren la seguridad alimentaria mundial.

8 Conclusiones.

- La técnica GoldenBraid ha permitido ensamblar de manera rápida y sencilla un total de treinta y tres construcciones CRISPR/Cas que podrán ser empleadas para el editado de base. Entre ellas, se encuentran diez editores “single-base”, cinco editores “dual-base”, cinco editores “multi-base” y trece controles.
- La eficacia de la edición genética (“indels”) obtenida mediante expresión transitoria de las construcciones CRISPR/Cas en *N. benthamiana*, es mayor cuando la nucleasa y el guía forman parte del mismo vector (en cis) que cuando ambos componentes se infiltran por separado.
- La prueba de concepto realizada empleando la dCas12 como nucleasa ha mostrado que el editor “single-base” basado en la citidina deaminasa es el único con el que se ha podido detectar el cambio de base C → T.
- La prueba de concepto realizada empleando la nCas9 como nucleasa ha mostrado que el editor “multi-base” es el único con el que se ha podido detectar el cambio de base A → G.
- La estrategia empleada en este trabajo, basada en la expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* seguida de la secuenciación Sanger, no posee suficiente “sensibilidad” para detectar los cambios de base producidos por la mayoría de editores de base generados, por lo que será necesario realizar una transformación estable de las plantas y/o secuenciación masiva.

9 Referencias bibliográficas.

- Ahmar, S., Saeed, S., Khan, M. H. U., Khan, S. U., Mora-Poblete, F., Kamran, M., Faheem, A., Maqsood, A., Rauf, M., Saleem, S., Hong, W. J., & Jung, K. H. (2020). A revolution toward gene-editing technology and its application to crop improvement. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(16), 1-28. <https://doi.org/10.3390/ijms21165665>
- Andersson, M., Turesson, H., Nicolia, A., Fält, A. S., Samuelsson, M., & Hofvander, P. (2017). Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Reports*, *36*(1), 117-128. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2062-3>
- Anton, T., Bultmann, S., Leonhardt, H., & Markaki, Y. (2014). Visualization of specific DNA sequences in living mouse embryonic stem cells with a programmable fluorescent CRISPR/Cas system. *Nucleus*, *5*(2), 163-172. <https://doi.org/10.4161/nucl.28488>
- Azameti, M. K., & Dauda, W. P. (2021). Base Editing in Plants: Applications, Challenges, and Future Prospects. *Frontiers in Plant Science*, *12*(July). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.664997>
- Bally, J., Jung, H., Mortimer, C., Naim, F., Philips, J. G., Hellens, R., Bombarely, A., Goodin, M. M., & Waterhouse, P. M. (2018). The rise and rise of *Nicotiana benthamiana*: A plant for all reasons. En *Annual Review of Phytopathology* (Vol. 56, pp. 405-426). <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-050141>
- Bernabé-Orts, J. M., Casas-Rodrigo, I., Minguet, E. G., Landolfi, V., Garcia-Carpintero, V., Gianoglio, S., Vázquez-Vilar, M., Granell, A., & Orzaez, D. (2019). Assessment of Cas12a-mediated gene editing efficiency in plants. *Plant Biotechnology Journal*, *17*(10), 1971-1984. <https://doi.org/10.1111/pbi.13113>
- Bo, W., Zhaohui, Z., Huanhuan, Z., Xia, W., Binglin, L., Lijia, Y., Xiangyan, H., Deshui, Y., Xuelian, Z., Chunguo, W., Wenqin, S., Chengbin, C., & Yong, Z. (2019). Targeted Mutagenesis of NAC Transcription Factor Gene, OsNAC041, Leading to Salt Sensitivity in Rice. *Rice Science*, *26*(2), 98-108. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2018.12.005>
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., & Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, *326*(5959), 1509-1512. <https://doi.org/10.1126/science.1178811>
- Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, *33*(1), 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>
- Butt, H., Zaidi, S. S. e. A., Hassan, N., & Mahfouz, M. (2020). CRISPR-Based Directed Evolution for Crop Improvement. *Trends in Biotechnology*, *38*(3), 236-240. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.08.001>
- Chandrasekaran, J., Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., Pearlsman, M., Sherman, A., Arazi, T., & Gal-On, A. (2016). Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Molecular Plant Pathology*, *17*(7), 1140-1153. <https://doi.org/10.1111/mpp.12375>
- Cheng, H., Hao, M., Ding, B., Mei, D., Wang, W., Wang, H., Zhou, R., Liu, J., Li, C., & Hu, Q. (2021). Base editing with high efficiency in allotetraploid oilseed rape by A3A-PBE system. *Plant Biotechnology Journal*, *19*(1), 87-97. <https://doi.org/10.1111/pbi.13444>

- Chylinski, K., Makarova, K. S., Charpentier, E., & Koonin, E. v. (2014). Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. En *Nucleic Acids Research* (Vol. 42, Issue 10, pp. 6091-6105). <https://doi.org/10.1093/nar/gku241>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Corte, L. E. D., Mahmoud, L. M., Moraes, T. S., Mou, Z., Grosser, J. W., & Dutt, M. (2019). Development of improved fruit, vegetable, and ornamental crops using the CRISPR/cas9 genome editing technique. En *Plants* (Vol. 8, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/plants8120601>
- Das, N., Ghosh Dhar, D., & Dhar, P. (2022). Editing the genome of common cereals (Rice and Wheat): techniques, applications, and industrial aspects. *Molecular Biology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07664-y>
- Ellis, T., Adie, T., & Baldwin, G. S. (2011). DNA assembly for synthetic biology: From parts to pathways and beyond. *Integrative Biology*, 3(2), 109-118. <https://doi.org/10.1039/c0ib00070a>
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(39). <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S., & Qi, L. S. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044>
- Goodin, M. M., Zaitlin, D., Naidu, R. A., & Lommel, S. A. (2008). *Nicotiana benthamiana*: Its history and future as a model for plant-pathogen interactions. En *Molecular Plant-Microbe Interactions* (Vol. 21, Issue 8, pp. 1015-1026). <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-8-1015>
- Grizot, S., Epinat, J. C., Thomas, S., Duclert, A., Rolland, S., Pâques, F., & Duchateau, P. (2009). Generation of redesigned homing endonucleases comprising DNA-binding domains derived from two different scaffolds. *Nucleic Acids Research*, 38(6), 2006-2018. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1171>
- Gupta, R. M., & Musunuru, K. (2014). Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *Journal of Clinical Investigation*, 124(10), 4154-4161. <https://doi.org/10.1172/JCI72992>
- Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovič, M., Ressel, S., & Charpentier, E. (2018). The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*, 172(6), 1239-1259. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.032>
- Hsu, C.-T., Lee, W.-C., Cheng, Y.-J., Yuan, Y.-H., Wu, F.-H., & Lin, C.-S. (2021). Genome Editing and Protoplast Regeneration to Study Plant-Pathogen Interactions in the Model Plant *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Genome Editing*, 2(January), 1-9. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2020.627803>

- Hu, B., Wang, W., Ou, S., Tang, J., Li, H., Che, R., Zhang, Z., Chai, X., Wang, H., Wang, Y., Liang, C., Liu, L., Piao, Z., Deng, Q., Deng, K., Xu, C., Liang, Y., Zhang, L., Li, L., & Chu, C. (2015). Variation in NRT1.1B contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies. *Nature Genetics*, 47(7), 834-838. <https://doi.org/10.1038/ng.3337>
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B., & Weeks, D. P. (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research*, 41(20). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt780>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kang, B. C., Yun, J. Y., Kim, S. T., Shin, Y. J., Ryu, J., Choi, M., Woo, J. W., & Kim, J. S. (2018). Precision genome engineering through adenine base editing in plants. *Nature Plants*, 4(7), 427-431. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0178-x>
- Kleinstiver, B. P., Pattanayak, V., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., Zheng, Z., & Joung, J. K. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. <https://doi.org/10.1038/nature16526>
- Knapp, S., Chase, M. W., & Clarkson, J. J. (2004). Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (Solanaceae). En *Taxon* (Vol. 53, Issue 1, pp. 73-82). International Association for Plant Taxonomy. <https://doi.org/10.2307/4135490>
- Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., & Liu, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533, 420-424. <https://doi.org/10.1038/nature17946>
- Komor, A. C., Zhao, K. T., Packer, M. S., Gaudelli, N. M., Waterbury, A. L., Koblan, L. W., Kim, Y. B., Badran, A. H., & Liu, D. R. (2017). Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. *Science Advances*, 3(8). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao4774>
- Li, C., Zhang, R., Meng, X., Chen, S., Zong, Y., Lu, C., Qiu, J. L., Chen, Y. H., Li, J., & Gao, C. (2020a). Targeted, random mutagenesis of plant genes with dual cytosine and adenine base editors. *Nature Biotechnology*, 38(7), 875-882. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0393-7>
- Li, C., Zhang, R., Meng, X., Chen, S., Zong, Y., Lu, C., Qiu, J. L., Chen, Y. H., Li, J., & Gao, C. (2020b). Targeted, random mutagenesis of plant genes with dual cytosine and adenine base editors. *Nature Biotechnology*, 38(7), 875-882. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0393-7>
- Li, J., Sun, Y., Du, J., Zhao, Y., & Xia, L. (2017a). Generation of Targeted Point Mutations in Rice by a Modified CRISPR/Cas9 System. En *Molecular Plant* (Vol. 10, Issue 3, pp. 526-529). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.12.001>
- Li, J., Sun, Y., Du, J., Zhao, Y., & Xia, L. (2017b). Generation of Targeted Point Mutations in Rice by a Modified CRISPR/Cas9 System. En *Molecular Plant* (Vol. 10, Issue 3, pp. 526-529). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.12.001>
- Li, M., Li, X., Zhou, Z., Wu, P., Fang, M., Pan, X., Lin, Q., Luo, W., Wu, G., & Li, H. (2016). Reassessment of the four yield-related genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in rice using a

- CRISPR/Cas9 system. *Frontiers in Plant Science*, 7(MAR2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00377>
- Liang, Y., Xie, J., Zhang, Q., Wang, X., Gou, S., Lin, L., Chen, T., Ge, W., Zhuang, Z., Lian, M., Chen, F., Li, N., Ouyang, Z., Lai, C., Liu, X., Li, L., Ye, Y., Wu, H., Wang, K., & Lai, L. (2022). AGBE: a dual deaminase-mediated base editor by fusing CGBE with ABE for creating a saturated mutant population with multiple editing patterns. *Nucleic Acids Research*, 50(9), 5384-5399. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac353>
- Lou, D., Wang, H., Liang, G., & Yu, D. (2017). OsSAPK2 confers abscisic acid sensitivity and tolerance to drought stress in rice. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00993>
- Maeder, M. L., Linder, S. J., Cascio, V. M., Fu, Y., Ho, Q. H., & Joung, J. K. (2013). CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nature Methods*, 10(10), 977-979. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2598>
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823-826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- Mishra, R., Joshi, R. K., & Zhao, K. (2020). Base editing in crops: current advances, limitations and future implications. En *Plant Biotechnology Journal* (Vol. 18, Issue 1, pp. 20-31). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/pbi.13225>
- Mohanta, T. K., Bashir, T., Hashem, A., Abd Allah, E. F., & Bae, H. (2017). Genome editing tools in plants. *Genes*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/genes8120399>
- Nishida, K., Arazoe, T., Yachie, N., Banno, S., Kakimoto, M., Tabata, M., Mochizuki, M., Miyabe, A., Araki, M., Hara, K. Y., Shimatani, Z., & Kondo, A. (2016). Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 353(6305). <https://doi.org/10.1126/science.aaf8729>
- P Terns, M., & M Terns, R. (2011). CRISPR-based adaptive immune systems. *Current Opinion in Microbiology*, 14, 321-327.
- Paul, B., & Montoya, G. (2020). CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications. *Biomedical Journal*, 43(1), 8-17. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2019.10.005>
- Sarrion-Perdigones, A., Falconi, E. E., Zandalinas, S. I., Juárez, P., Fernández-del-Carmen, A., Granell, A., & Orzaez, D. (2011a). GoldenBraid: An iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLoS ONE*, 6(7), 21622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021622>
- Sarrion-Perdigones, A., Falconi, E. E., Zandalinas, S. I., Juárez, P., Fernández-del-Carmen, A., Granell, A., & Orzaez, D. (2011b). GoldenBraid: An iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLoS ONE*, 6(7), 21622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021622>
- Sarrion-Perdigones, A., Vazquez-Vilar, M., Palací, J., Castelijn, B., Forment, J., Ziarsolo, P., Blanca, J., Granell, A., & Orzaez, D. (2013). Goldenbraid 2.0: A comprehensive DNA assembly framework for plant synthetic biology. *Plant Physiology*, 162(3), 1618-1631. <https://doi.org/10.1104/pp.113.217661>

- Schaart, J. G., van de Wiel, C. C. M., Lotz, L. A. P., & Smulders, M. J. M. (2016). Opportunities for Products of New Plant Breeding Techniques. En *Trends in Plant Science* (Vol. 21, Issue 5, pp. 438-449). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.11.006>
- Schindele, P., & Puchta, H. (2020). Engineering CRISPR/LbCas12a for highly efficient, temperature-tolerant plant gene editing. *Plant Biotechnology Journal*, *18*(5), 1118-1120. <https://doi.org/10.1111/pbi.13275>
- Spiegel, H., Schillberg, S., & Nölke, G. (2022). Production of Recombinant Proteins by Agrobacterium-Mediated Transient Expression. *Methods in Molecular Biology*, *2480*, 89-102. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2241-4_6/FIGURES/4
- Vazquez-Vilar, M., Quijano-Rubio, A., Fernandez-Del-Carmen, A., Sarrion-Perdigones, A., Ochoa-Fernandez, R., Ziarsolo, P., Blanca, J., Granell, A., & Orzaez, D. (2017). GB3.0: a platform for plant bio-design that connects functional DNA elements with associated biological data. *Nucleic Acids Research*, *45*(4), 2196-2209. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1326>
- Wang, J., Cappa, J. J., Harris, J. P., Edger, P. P., Zhou, W., Pires, J. C., Adair, M., Unruh, S. A., Simmons, M. P., Schiavon, M., & Pilon-Smits, E. A. H. (2018). Transcriptome-wide comparison of selenium hyperaccumulator and nonaccumulator *Stanleya* species provides new insight into key processes mediating the hyperaccumulation syndrome. *Plant Biotechnology Journal*, *16*(9), 1582-1594. <https://doi.org/10.1111/pbi.12897>
- Wang, Z., Liu, X., Xie, X., Deng, L., Zheng, H., Pan, H., Li, D., Li, L., & Zhong, C. (2021). Abe8e with polycistronic trna-grna expression cassette significantly improves adenine base editing efficiency in *Nicotiana benthamiana*. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(11), 5663. <https://doi.org/10.3390/ijms22115663>
- Yin, K., Gao, C., & Qiu, J. L. (2017). Progress and prospects in plant genome editing. En *Nature Plants* (Vol. 3, p. 17107). <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.107>
- Zhang, H., Zhang, J., Lang, Z., Botella, J. R., & Zhu, J. K. (2017). Genome Editing—Principles and Applications for Functional Genomics Research and Crop Improvement. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *36*(4), 291-309. <https://doi.org/10.1080/07352689.2017.1402989>
- Zhang, T., Zheng, Q., Yi, X., An, H., Zhao, Y., Ma, S., & Zhou, G. (2018). Establishing RNA virus resistance in plants by harnessing CRISPR immune system. *Plant Biotechnology Journal*, *16*(8), 1415-1423. <https://doi.org/10.1111/pbi.12881>
- Zhao, D., Li, J., Li, S., Xin, X., Hu, M., Price, M. A., Rosser, S. J., Bi, C., & Zhang, X. (2021). Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes. *Nature Biotechnology*, *39*(1), 35-40. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0592-2>
- Zhu, H., Li, C., & Gao, C. (2020). Applications of CRISPR–Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(11), 661-677. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00288-9>
- Zong, Y., Song, Q., Li, C., Jin, S., Zhang, D., Wang, Y., Qiu, J. L., & Gao, C. (2018). Efficient c-to-t base editing in plants using a fusion of nCas9 and human apobec3a. *Nature Biotechnology*, *36*(10), 950. <https://doi.org/10.1038/nbt.4261>

10 Anexo I.

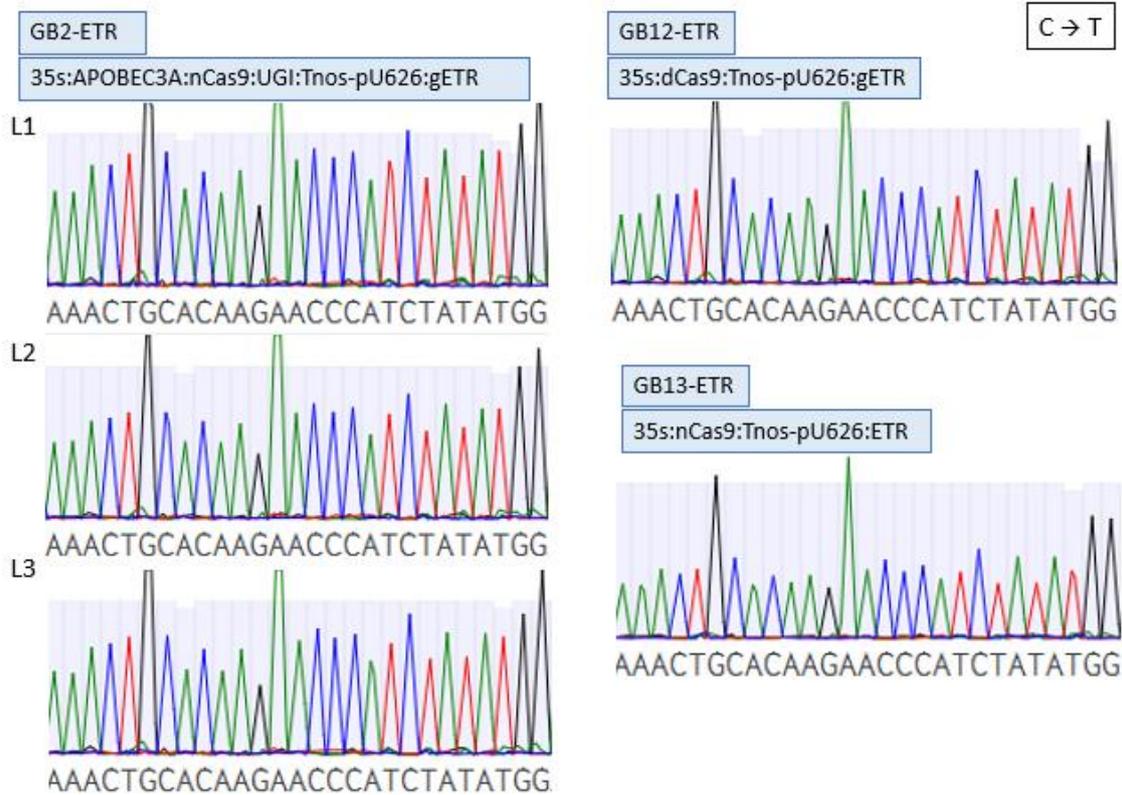


Figura 24. GB2-ETR. En los cromatogramas se muestra la secuencia diana de la nCas9: a la izquierda la obtenida con el editor citidina deaminasa, y a la derecha la obtenida con los dos controles negativos.

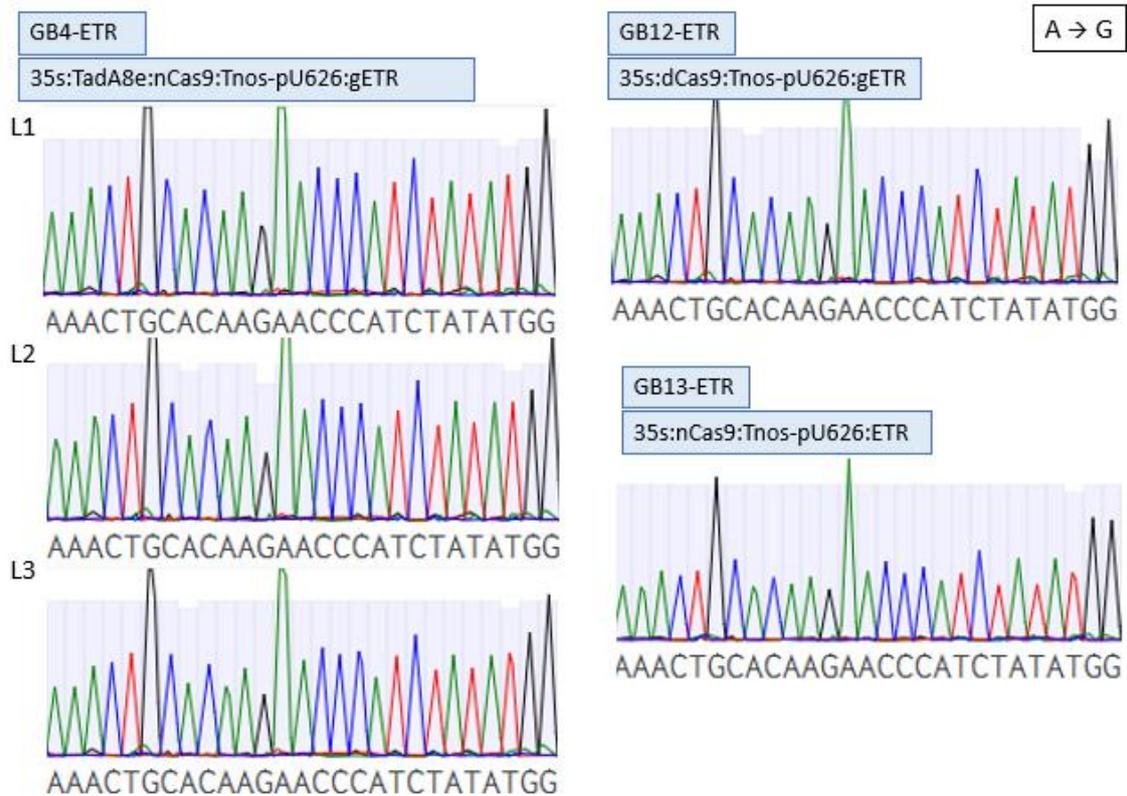


Figura 25. GB4-ETR. En los cromatogramas se muestra la secuencia diana de la nCas9: a la izquierda la obtenida con el editor adenina deaminasa, y a la derecha la obtenida con los dos controles negativos.

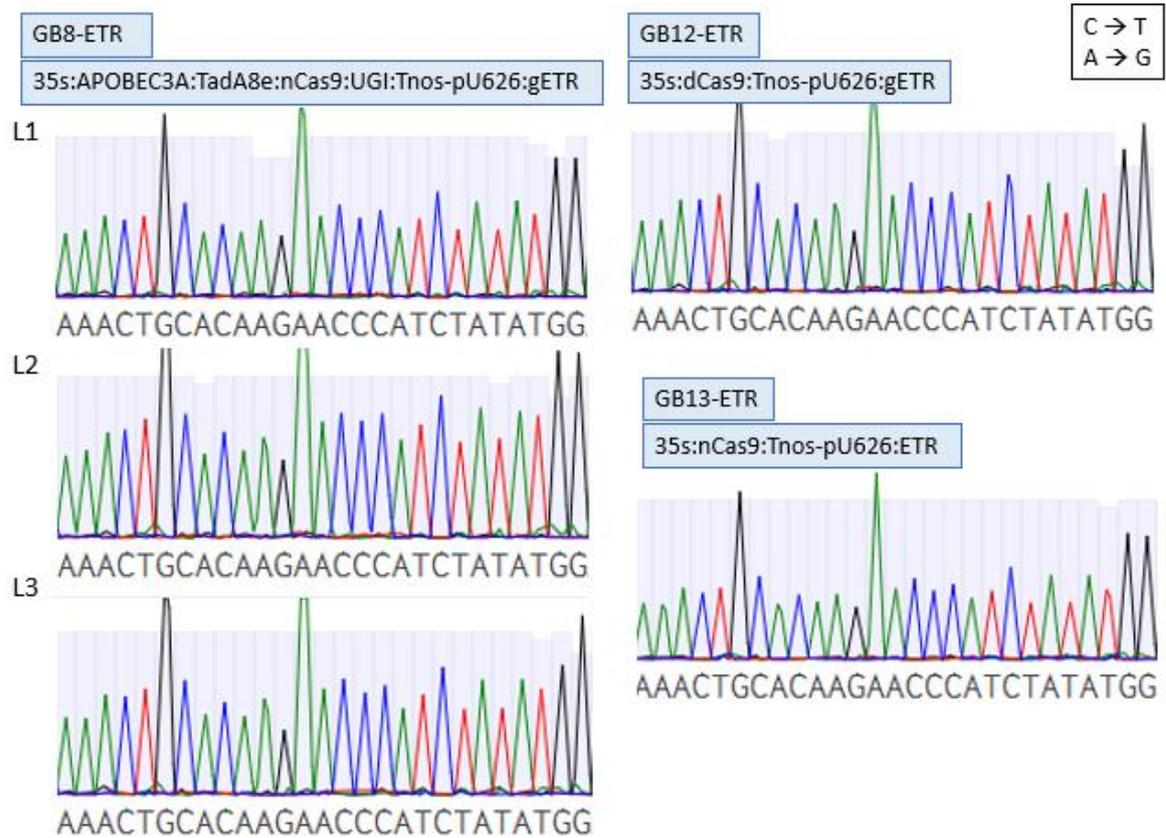


Figura 26. GB8-ETR. En los cromatogramas se muestra la secuencia diana de la nCas9: a la izquierda la obtenida con el editor citidina-adenina deaminasa (UGI), y a la derecha la obtenida con los dos controles negativos.

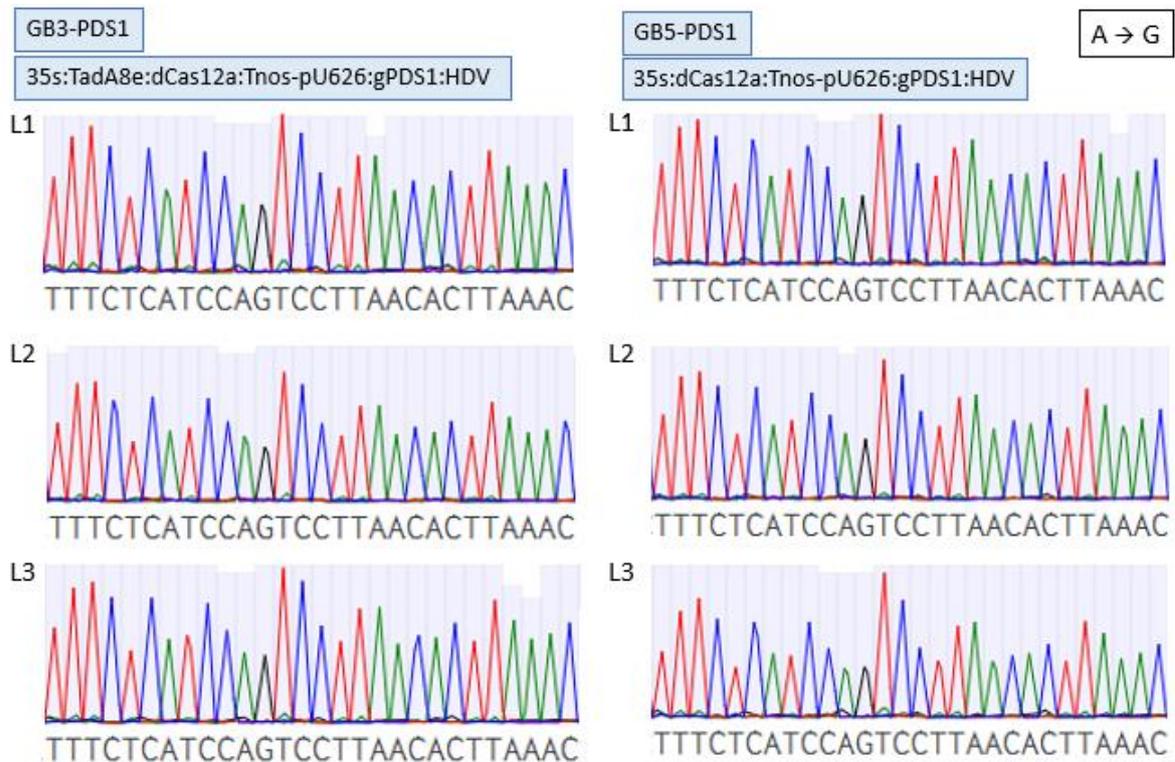


Figura 27. GB3-PDS1. En los cromatogramas se muestra la secuencia diana de la dCas12: a la izquierda la obtenida con el editor adenina deaminasa, y a la derecha la obtenida con el control negativo.

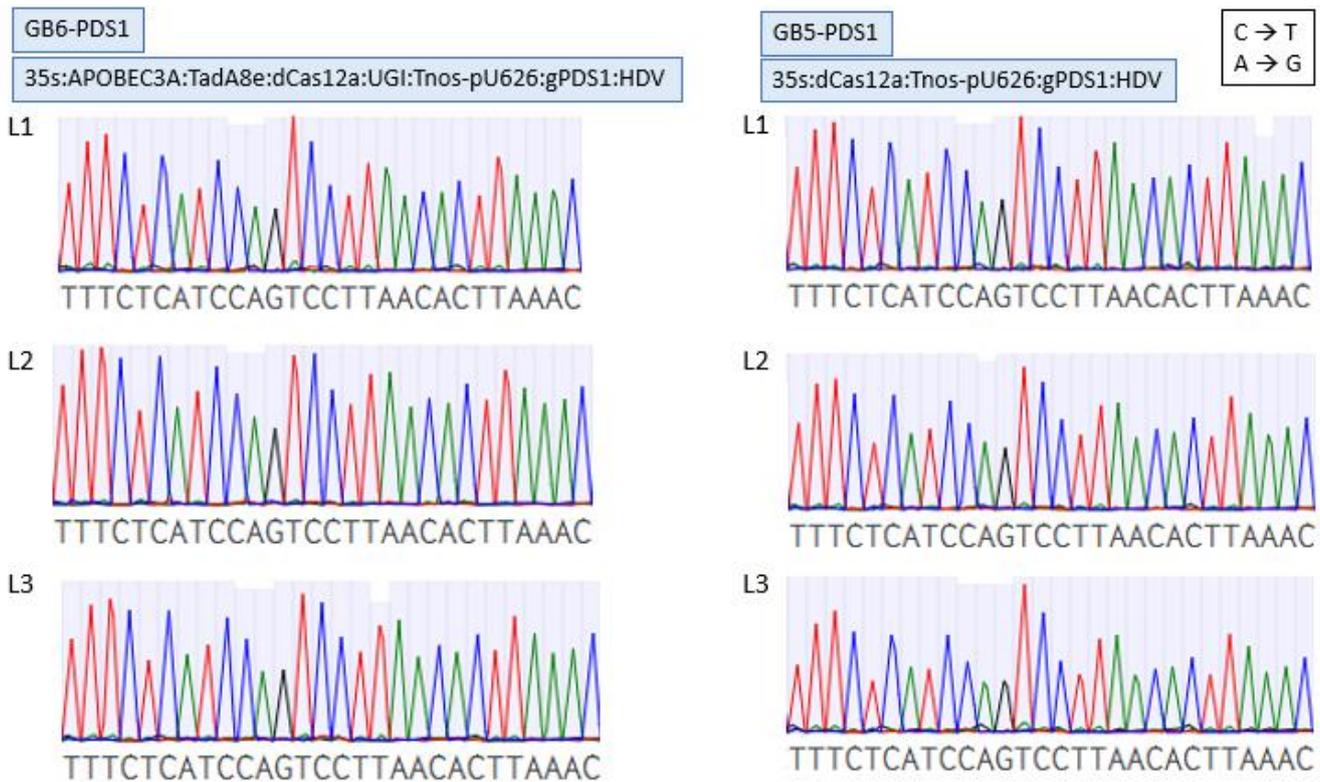


Figura 28. GB6-PDS1. En los cromatogramas se muestra la secuencia diana de la dCas12: a la izquierda la obtenida con el editor citidina-adenina deaminasa (UGI), y a la derecha la obtenida con el control negativo.

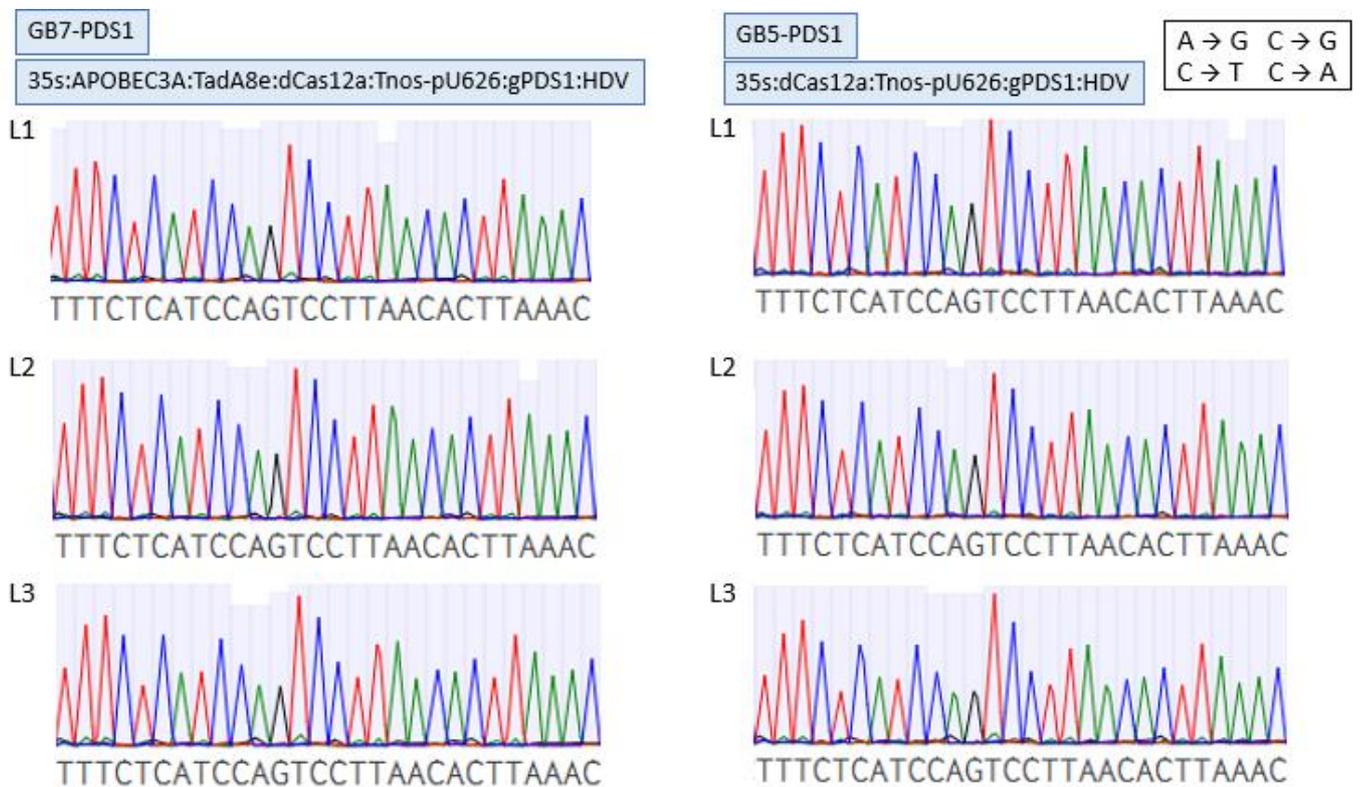


Figura 29. GB7-PDS1. En los cromatogramas se muestra la secuencia diana de la dCas12: a la izquierda la obtenida con el editor citidina-adenina deaminasa, y a la derecha la obtenida con el control negativo.

11 Anexo II.

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				✓
ODS 2. Hambre cero.		✓		
ODS 3. Salud y bienestar.		✓		
ODS 4. Educación de calidad.				✓
ODS 5. Igualdad de género.				✓
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				✓
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				✓
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				✓
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				✓
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				✓
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				✓
ODS 12. Producción y consumo responsables.	✓			
ODS 13. Acción por el clima.		✓		
ODS 14. Vida submarina.				✓
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				✓
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				✓
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				✓

El TFM realizado supone una puesta a punto de un método con numerosas aplicaciones, algunas de las cuales se han comentado en la discusión del trabajo. La aplicación más inmediata, y para la que ya se ha empleado el “base-editing” en algunos casos, es la obtención de plantas resistentes a herbicidas de amplio espectro. Por este motivo, consideramos que el trabajo se alinearía bien con el ODS 12: “Producción y consumo responsables”, ya que permitiría usar en los cultivos herbicidas de amplio espectro mucho menos contaminantes que otros herbicidas. También planteamos la posibilidad de obtener cambios enfocados a un menor uso de agua, nitrato o fosfatos, lo que también se alinea con una producción responsable.