

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



IBMCP
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas



Construcción de un nuevo interruptor genético basado en recombinación específica de sitio para Biología Sintética de Plantas

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: Alfredo Quijano Rubio

DIRECTOR: Diego Orzáez Calatayud

TUTORA: M^a Purificación Lisón Parraga

Curso Académico 2014-2015

VALENCIA, JULIO DE 2015



Título: Construcción de un nuevo interruptor genético basado en recombinación específica de sitio para Biología Sintética de Plantas.

Resumen: El reciente desarrollo y expansión de la Biología Sintética ha abierto un horizonte a nuevas posibilidades tecnológicas mediante el diseño de organismos vivos con nuevas funciones biológicas hasta la fecha inexistentes. Sin embargo, estas nuevas funciones en muchas ocasiones suponen una tara para el correcto desarrollo del organismo, debido a efectos de toxicidad o debido a que suponen una carga metabólica para el mismo. Por ello, estos nuevos avances requieren la creación de elementos de control de la expresión génica que permitan una estrecha regulación de estas funciones. Estos elementos son denominados interruptores genéticos y existe una gran variedad de ellos con diferentes características. De especial utilidad y relevancia son los interruptores genéticos biestables y reversibles. Estos permiten la modificación del estado de un sistema biológico y su mantenimiento de forma indefinida y estable hasta la llegada de una nueva señal de inducción, tras la cual el sistema vuelve a su estado inicial. De esta manera, es posible inducir y mantener durante el tiempo necesario la condición deseada en un sistema biológico. Los mecanismos de recombinación específica de sitio son idóneos para el diseño de interruptores con estas características, debido a su eficiente mecanismo de modificación del ADN.

Por otro lado, en los últimos años se han desarrollado diversos sistemas modulares de ensamblaje de ADN basados en el uso de piezas genéticas estandarizadas como unidad mínima de construcción de estructuras complejas. Gracias a esto se están desarrollando grandes colecciones de estas piezas básicas con infinidad de funciones, dando la oportunidad de ser utilizadas e intercambiadas en cualquier parte del mundo. Por ello, el diseño modular y estándar de nuevos dispositivos genéticos como los interruptores genéticos, es esencial para hacerlas fáciles de utilizar, adaptables y reutilizables, aportando soluciones a todo tipo de necesidades biotecnológicas.

Particularmente, el aun emergente campo de la Biología Sintética de Plantas promete importantes avances en los próximos años. Esto es debido a las capacidades metabólicas únicas de las plantas, que permiten su utilización en aplicaciones tan diversas como biorremediación o la producción de compuestos farmacológicos de alto valor. Sin embargo, actualmente existe un número muy limitado de interruptores genéticos funcionales para Biología Sintética de Plantas, por lo que la creación de estos nuevos dispositivos genéticos es esencial para el desarrollo de esta disciplina.

En este trabajo se ha llevado a cabo el diseño y construcción de un nuevo interruptor genético biestable y reversible para Biología Sintética de Plantas. Este está basado en recombinación específica de sitio de la integrasa Bxb1 y su diseño está adaptado a uno de estándares de ensamblaje genético más utilizados en Biología Sintética de Plantas, GoldenBraid2.0. La evaluación del funcionamiento del interruptor se realizó mediante transformación transitoria y estable de *Nicotiana benthamiana*, obteniéndose prometedores resultados que postulan a este interruptor como una potente herramienta para el futuro de la Biología Sintética de Plantas.

Autor del TFG: Alfredo Quijano Rubio

Localidad y fecha: Valencia, Julio de 2015

Director: Dr. Diego Orzáez Calatayud

Tutor académico: Dra. María Purificación Lisón Párraga

Title: Construction of a novel genetic switch based on site-specific recombination for Plant Synthetic Biology.

Abstract: The recent onset and expansion of Synthetic Biology has opened a new technological horizon based on the design of living organisms with novel biological functions. Nevertheless, these novel functions often involve toxic effects or suppose a metabolic burden for these organisms, hindering their normal development. As a consequence, the design and creation of new elements for the control of genetic expression is necessary to regulate these functions. Such elements are called genetic switches and there are different types of them depending on their characteristics. Particularly, bistable and reversible genetic switches have proven to be noticeably useful due to their ability to modify the state of a given biological system and maintain this new state indefinitely. This state can only be reversed due to the presence of a new induction signal that is able to catalyze the return of the system to its initial state. Therefore, they provide the tool to induce and maintain a given biological condition until it is no longer necessary. One of the most suitable mechanisms for the design of this type of genetic switches is the renowned site-specific recombination, which provides a quick and efficient DNA modification mechanism.

On the other hand, different modular DNA assembly systems have been recently developed. They are based on the use of DNA standard parts as building blocks for the construction of complex DNA structures. Large collections of parts with different functions are being created, giving the possibility to exchange and use these DNA parts all over the world. As a consequence, the modular and standard design of genetic elements, as genetic switches, is essential for to make them easy to use, adaptable and reusable, providing solutions to any biotechnological demand.

Particularly, Plant Synthetic Biology is a very promising emerging discipline. Plants' metabolic capabilities confer them unique properties that can be used in countless of applications in very diverse fields, for instance in bioremediation or the production of high-value pharmaceutical products. However, the number of functional genetic switches for plants is still very limited. Therefore, the creation of new genetic switches for plants is essential for the development of Plant Synthetic Biology.

In this project, the design, construction and testing of a novel bistable and reversible genetic switch for Plant Synthetic Biology were performed. This genetic switch is based on site-specific recombination of integrase Bxb1 and is built following GoldenBraid 2.0, a widely used plant modular assembly standards. The functional characterization of the switch was performed by transient and stable transformation of *Nicotiana benthamiana*. the results obtained indicate that, upon optimization, this new genetic switch has the potential to become an important tool for Plant Synthetic Biology.

Keywords: Plant Synthetic Biology, Genetic switch, Site-specific recombination.

Author: Alfredo Quijano Rubio

City and date: Valencia, Julio de 2015

Director: Diego Orzáez Calatayud, PhD

Academic tutor: M^a Purificación Lisón Párraga, PhD

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Biología Sintética.....	1
1.2. Biología Sintética de plantas.....	2
1.3. Interruptores genéticos.....	3
1.4. Recombinación específica de sitio.....	4
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	10
3.1. Cepas y condiciones de cultivo.....	10
3.2. Transformación bacteriana	10
3.3. Extracción de ADN plasmídico: minipreps	10
3.4. Análisis por restricción.....	11
3.5. Amplificación por PCR.....	11
3.6. Electroforesis en gel de agarosa	12
3.7. Secuenciación	13
3.8. Criopreservación de cepas bacterianas.....	13
3.9. Transformación transitoria de <i>Nicotiana benthamiana</i>	13
3.10. Transformación estable de <i>Nicotiana benthamiana</i>	13
3.11. Microscopía e imagen.....	14
3.12. Ensamblaje de ADN – GoldenBraid 2.0.....	15
3.12.1. Domesticación de piezas GoldenBraid 2.0.....	16
3.12.2. Ensamblaje multipartito	17
3.12.3. Ensamblaje binario	18
4. RESULTADOS	21
4.1. Construcción de los elementos del interruptor genético.....	21
4.1.1. Construcción del Reportero BP	21
4.1.2. Construcción del generador “set”: integrasa Bxb1.....	25
4.1.3. Construcción del generador “reset”: integrasa Bxb1 + Xis	25
4.1.4. Construcción del Reportero LR	26
4.2. Funcionamiento del nuevo interruptor genético en <i>Escherichia coli</i>	28
4.3. Funcionamiento del nuevo interruptor genético mediante expresión transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i>	30
4.4. Transformación estable de los elementos génicos del nuevo interruptor genético en <i>Nicotiana benthamiana</i>	33
5. DISCUSIÓN	35
6. CONCLUSIONES	38
7. BIBLIOGRAFÍA	39
8. ANEXOS	43
8.1. Domesticación de piezas GoldenBraid 2.0 mediante mutagénesis por PCR.....	43
8.2. Domesticación de piezas GoldenBraid 2.0 mediante síntesis <i>de novo</i>	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de recombinación específica de sitio	5
Figura 2. Mecanismos de recombinación específica de sitio	6
Figura 3. Funcionamiento del nuevo interruptor genético basado en recombinación específica de sitio.....	8
Figura 4. Visión general del sistema de ensamblaje modular GoldenBraid 2.0 (GB)	15
Figura 5. Secuencias de reconocimiento y corte de las enzimas de restricción tipo IIS, BsaI y BsmBI.....	16
Figura 6. Gramática para el ensamblaje multipartito en el sistema GoldenBraid 2.0	16
Figura 7. Proceso de ensamblaje multipartito GoldenBraid 2.0	18
Figura 8. Representación del ensamblaje binario GoldenBraid 2.0	19
Figura 9. Proceso del ensamblaje binario GoldenBraid 2.0 de las unidades transcripcionales (TU) de la integrasa Bxb1 y Xis..	20
Figura 10. Estructura y construcción del Reportero BP.....	23
Figura 11. Resultados de electroforesis en gel de agarosa de los pasos de la construcción del Reportero BP.....	24
Figura 12. Resultados por análisis de restricción de la construcción del generador “set”	25
Figura 13. Resultados por análisis de restricción de la construcción del generador “reset”	26
Figura 14. Estructura y resultados de la construcción del Reportero LR.....	27
Figura 15. Detalle del funcionamiento del test BP y test LR para comprobar los eventos de recombinación específica de sitio mediada por la integrasa Bxb1	28
Figura 16. Resultados de la prueba de inducción al cambio del estado 1 (Reportero BP) del nuevo interruptor genético, al estado 2 (reportero LR)..	29
Figura 17. Resultados de la prueba de reversibilidad del nuevo interruptor genético mediante la inducción al cambio del estado 2 (Reportero LR), al estado 1 (reportero BP)..	30
Figura 18. Inducción al cambio de estado del nuevo interruptor genético por transformación transitoria de <i>Nicotiana benthamiana</i>	31
Figura 19. Análisis de la reversibilidad del nuevo interruptor genético por transformación transitoria de <i>Nicotiana benthamiana</i>	32
Figura 20. Detección de fluorescencia emitida por plantas transformadas establemente mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , con el Reportero BP y una construcción control con DsRed de expresión constitutiva.....	33
Figura 21. Ensayo de cambio de estado del interruptor genético mediante expresión transitoria del generador “set” en hojas de <i>N. benthamiana</i> previamente transformada establemente con el Reportero BP	34
Figura S 1. Representación gráfica del vector domesticador pUPD	45
Figura S 2. Diseño de cebadores para domesticación de Xis como pieza GB B3-B4-B5	46
Figura S 3. Proceso de domesticación de Xis como pieza GB B3-B4-B5 mediante mutagénesis por PCR.....	47
Figura S 4. Alineamiento local de la secuencia original de la integrasa Bxb1 y la misma secuencia optimizada para uso de codones de <i>N. benthamiana</i>	48
Figura S 5. Representación gráfica de los vectores de destino GoldenBraid de nivel 1: pDGB3_α1 y pDGB3_α2.....	49

Figura S 6. Representación gráfica de los vectores de destino GoldenBraid de nivel 2: pDGB3_Ω1 y pDGB3_Ω2.....	50
Figura S 7. Modificación de las secuencias de recombinación específica de sitio de Bxb1, attB y attP.....	51
Figura S 8. “Lamda scan” de detección de GFP y DsRed por microscopía confocal de fluorescencia	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de reacciones de PCR para domesticación GoldenBraid y clonaje.....	11
Tabla 2. Condiciones de reacciones de PCR para diagnóstico de los eventos de recombinación	11
Tabla 3. Lista de cebadores utilizados en las reacciones de amplificación por PCR	12
Tabla 4. Composición de los diferentes medios para transformación estable de <i>N. benthamiana</i>	14
Tabla 5. Protocolo de ensamblaje binario GoldenBraid 2.0.....	19

LISTADO DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
attB	“Bacterial attachment site”
attL	“Left attachment site”
attP	“Phage attachment site”
attR	“Right attachment site”
bp	Pares de bases
CAT1	Gen de la catalasa 1
CDS	Región codificante
CRISPR	Repeticiones cortas palindrómicas aglomeradas interespaciadas regularmente
cm	Centímetro(s)
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DsRed	Proteína fluorescente roja
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	gramo(s)
GB	GoldenBraid
GFP	Proteína fluorescente verde
iGEM	“international Genetically Engineered Machine”
IHF	“Integration Host Factor”
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase(s)
KOH	Hidróxido potásico
L	Litro
LacZ	Gen de la β-galactosidasa
LB	Caldo de lisogenia
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)
mM	Milimolar

mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MS	Sales Murashige y Skoog
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NAA	Ácido Naftaleno Acético
ng	Nanogramo(s)
nm	Nanómetro(s)
p35S	Promotor del virus del mosaico de la coliflor
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pDGB	Plásmido de destino de GoldenBraid
PhyB	Fitocromo B
PIF6	Factor de interacción del fitocromo 6
pUPD	"Universal Parts Domesticator Plasmid"
RBS	Secuencia de unión al ribosoma
RES	Recombinación específica de sitio
rpm	Revoluciones por minuto
SSR	Recombinasas específicas de sitio
T-DNA	Ácido desoxirribonucleico de transferencia
TAE	Tris Acetato EDTA
TBSV	Virus del enanismo arbustivo del tomate
TNT	Trinitrotolueno
TU	Unidad transcripcional
Vir	Gen de virulencia
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
Xis	Escisionasa
μg	Microgramo(s)
μL	Microlitro(s)
μM	Micromolar

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BIOLOGÍA SINTÉTICA

La Biología Sintética es una nueva disciplina científica surgida de la aplicación de los principios básicos de ingeniería a la biología molecular y a la ingeniería genética. El objetivo de la Biología Sintética es diseñar organismos vivos con nuevas funciones biológicas inexistentes hasta el momento, que permitan dar solución a problemas difíciles de afrontar con la tecnología actual (Haseloff & Ajioka, 2009; Way, Collins, Keasling, & Silver, 2014).

La emergencia de esta joven disciplina es el resultado de la confluencia de diferentes factores tecnológicos (Tavassoli, 2010). Los grandes avances llevados a cabo en la tecnología del ADN recombinante desde la década de los 70 han permitido el desarrollo de un gran número de herramientas que hacen la manipulación del ADN accesible y eficiente. No obstante, debido a su falta de estandarización, la ingeniería genética encuentra todavía limitaciones técnicas en la creación de elementos genéticos de alta complejidad (Way et al., 2014) que puedan ser compartidos entre investigadores. Por otro lado, la rápida evolución y el abaratamiento de tecnologías de secuenciación y síntesis química de ADN han permitido que el diseño y el descubrimiento de nuevas funciones biológicas sean ampliamente posibles. (Carlson, 2009). De esta manera, el desarrollo tecnológico dio respuesta a la necesidad de mejorar las tecnologías de ADN recombinante con el fin explotar aun más el vasto abanico de posibilidades que ofrecen los sistemas biológicos, dando lugar al nacimiento de la Biología Sintética.

La Biología Sintética propone el uso de los principios de la ingeniería (modularidad, abstracción y estandarización) a la biología molecular con el fin de hacer posible el diseño racional de organismos con nuevas capacidades mediante un ciclo de creación donde el diseño asistido por ordenador y la simulación es una fase previa a la construcción y validación de los resultados (Endy, 2005; Liu & Stewart, 2015; Slusarczyk, Lin, & Weiss, 2012). Esta nueva aproximación a la biotecnología permitiría dar el salto de una tecnología “artesanal” y hecha a medida para cada necesidad, a una tecnología estándar que permita la optimización y automatización en el manejo del ADN, comparable al salto en la industria llevado a cabo en la primera revolución industrial (Church & Regis, 2012; Sarrion-Perdigones et al., 2011).

Para hacer posible este salto, uno de los primeros pasos ha consistido en el desarrollo de métodos clonaje que permitan construir (ensamblar) piezas de ADN de forma modular y estandarizada. Estos sistemas modulares facilitan la construcción de dispositivos y circuitos genéticos cada vez más complejos. Los sistemas de modulares han dado lugar a la definición de estándares de ensamblaje y a la creación de colecciones de partes de ADN estándar, intercambiables y reusables, que funcionan como unidades mínimas de construcción. Estas unidades, en su mayoría sintetizadas *de novo* funcionan como si de piezas de Lego se tratase: con un determinado set de piezas se puede crear una gran cantidad de estructuras con diferentes funciones (Collins, 2012). BioBricks constituye el ejemplo más célebre de estos nuevos sistemas de ensamblaje. Su funcionamiento es muy sencillo y consiste básicamente en la unión de piezas de ADN estándar dos a dos mediante reacciones de restricción-ligación específica. El resultado es una nueva pieza compuesta, la cual resulta flanqueada exactamente por los mismos sitios de restricción que las piezas originales que se utilizaron para componerla. Esta propiedad, conocida como idempotencia, permite que cada nueva pieza pueda ser usada de nuevo para combinarla con otras piezas utilizando siempre la misma reacción de ensamblaje y obtener construcciones multigénicas complejas tras varios ciclos de reacciones (Knight, 2003). BioBricks además posee un registro de partes de ADN donde científicos de todo el mundo pueden acceder y solicitar partes existentes e ingresar nuevas partes a la colección (http://parts.igem.org/Main_Page). No obstante, este método binario, especializado en construcciones procariotas, puede resultar poco eficiente en la construcción de dispositivos

génicos eucariotas, los cuales requieren más elementos para su funcionamiento. De esta manera, otros métodos modulares de ensamblaje especializados en eucariotas se desarrollaron años después, como es el caso de MoClo (Weber, Engler, Gruetzner, Werner, & Marillonnet, 2011), o GoldenBraid (GB). Este último es un sistema de ensamblaje modular desarrollado específicamente para Biología Sintética de Plantas (Sarrion-Perdigones et al., 2011, 2013). GB está basado en el sistema de ensamblaje multipartito Golden Gate, que permite la creación de piezas compuestas de un solo uso (Engler, Gruetzner, Kandzia, & Marillonnet, 2009). GoldenBraid expande estas posibilidades permitiendo el reusar estas partes compuestas y unir las entre sí mediante ensamblajes binarios con el fin de aumentar la complejidad de las construcciones génicas de manera iterativa y virtualmente indefinida. Información detallada en el apartado 3.9 *Ensamblaje de ADN: GoldenBraid*. De esta manera, GoldenBraid permite la rápida y eficiente construcción de dispositivos multigénicos, disponibles en la base de datos de su colección de partes génicas específicas de Biología Sintética de Plantas (<https://gbcloning.org>).

Algunos de los avances biotecnológicos más paradigmáticos de los últimos años se asocian al ámbito de la Biología Sintética. Libros escritos íntegramente con ADN (Church & Regis, 2012), genomas sintetizados y ensamblados *de novo* (Annaluru et al., 2014; Gibson et al., 2008) bacterias capaces de detectar el microentorno tumoral e invadir células cancerígenas (Anderson, Clarke, Arkin, & Voigt, 2006) o la producción de moléculas terapéuticas como el precursor del fármaco antimalárico artemisina (Ro et al., 2006). Otro indicador de la relevancia futura y las posibilidades que ofrece la Biología Sintética viene dado por los concursos iGEM, (“international Genetically Engineered Machine) donde estudiantes universitarios de todo el mundo compiten por desarrollar durante un verano el proyecto de Biología Sintética más innovador (http://igem.org/Main_Page). El impacto y la sofisticación de los proyectos iGEM (bacterias capaces de detectar carne en mal estado, levadura capaz de producir pan rico en provitamina A, bacterias capaces de modificar la temperatura de Marte o plantas capaces de controlar las poblaciones de insectos sin necesidad de usar pesticidas), son un excelente indicador de como esta disciplina ofrece grandes posibilidades y en los próximos años se postulará como una de las grandes revoluciones científicas de nuestro tiempo.

1.2. BIOLOGÍA SINTÉTICA DE PLANTAS.

La Biología Sintética comenzó modificando sistemas bacterianos, y actualmente se encuentra expandiéndose al mundo eucariota. Levaduras y mamíferos ya han sido alcanzados por esta disciplina, pero sin duda cabe destacar el gran potencial de la Biología Sintética de Plantas. Así, existe una gran expectativa puesta en el futuro de la Biología Sintética de Plantas en campos tan diversos como la alimentación, producción de biocombustibles, biorremediación, biomedicina e incluso biotecnología espacial o creación de nuevas formas de vida sintéticas. Además, existe un interés creciente en el uso de los principios de la Biología Sintética para la mejora de cultivos, mediante técnicas de editado genómico, ingeniería metabólica e incluso retos enormemente complejos como la conversión de plantas C3 en C4 (von Caemmerer, Quick, & Furbank, 2012). En los últimos años se han conseguido algunos avances notables como plantas capaces de brillar en la oscuridad (<http://www.glowingplant.com>), biosensores basados en plantas capaces de detectar TNT (Antunes et al., 2011) y patógenos (Liu et al., 2013) o plantas capaces de producir anticuerpos de forma transitoria mediante sistemas virales deconstruidos (Marillonnet et al., 2004). En este sentido, la biología sintética promete revolucionar el campo del “molecular farming” y la producción de nuevas moléculas específicas usando las plantas como biofactorias (Liu & Stewart, 2015).

Para hacer posible todos estos avances, el desarrollo y optimización de herramientas biotecnológicas y computacionales es esencial. Entre estas herramientas destacan los interruptores genéticos. Estos elementos son dispositivos genéticos necesarios para controlar la expresión de genes exógenos en la planta y por ende, controlar la puesta en marcha de

cualesquiera nuevas funciones biológicas, como por ejemplo, la producción de moléculas específicas de alto valor añadido.

1.3. INTERRUPTORES GENÉTICOS

Los interruptores genéticos son circuitos biológicos compuestos por elementos genéticos que permiten a un organismo vivo procesar la información de un determinado estímulo (input) y producir una respuesta biológica (output). Los interruptores se encuentran presentes en la mayoría de los procesos biológicos conocidos: en los bacteriófagos al entrar en el ciclo lisogénico (Broussard & Hatfull, 2013), en levadura al responder a la fuente de carbono presente en el medio (Gancedo, 1998) o en nuestros melanocitos que aumentan la producción de melanina para protegernos de la radiación UV (Gilchrest & Eller, 1999). Uno de los objetivos de la Biología Sintética es descifrar el mecanismo de funcionamiento de estos y otros interruptores, y rediseñarlos para darles uso en todo tipo de aplicaciones biotecnológicas (Jérôme Bonnet & Endy, 2013).

Los primeros circuitos biológicos creados en Biología Sintética fueron un interruptor de tipo “Toggle switch” (Gardner, Cantor, & Collins, 2000) y un “repressilator” (Elowitz & Leibler, 2000), ambos de gran repercusión, llegando a alcanzar actualmente, tras 15 años, cerca de las 3000 citas. El primero consiste en un interruptor bistable capaz de variar entre dos estados diferentes en respuesta a estímulos químicos externos. Su funcionamiento se basa en dos proteínas represoras que regulan la expresión de dos genes objetivo. Este estado “ON” puede invertirse mediante la presencia puntual de otro estímulo externo diferente. La característica fundamental del “Toggle Switch” es que dispone de memoria, es decir, que los inductores solo se necesitan de manera puntual, y no se requiere su presencia continuada en el sistema para mantenerlo en uno u otro estado. Por otro lado, el “repressilator” consiste en un oscilador genético que permite la expresión de tres genes diferentes de manera secuencial en el tiempo, gracias a la acción de diferentes proteínas represoras.

A partir del desarrollo de estos primeros dispositivos, el diseño de nuevos interruptores y circuitos genéticos fue adquiriendo una gran relevancia en este campo, incluyendo la Biología Sintética de Plantas. Estos ofrecen la posibilidad de regular la expresión de genes heterólogos cuya expresión constitutiva tenga efectos adversos sobre el crecimiento y el desarrollo de la planta, debido a que sus productos supongan una carga metabólica o sean tóxicos para el organismo (Klose, Günl, Usadel, Fischer, & Commandeur, 2013; Müller et al., 2014). También permiten la regulación de la expresión para evitar efectos medioambientalmente adversos o incluso inducir la expresión de genes que puedan tener efectos beneficiosos en algún tejido específico o en alguna fase del desarrollo de la planta. Algunos ejemplos de la utilidad de esta regulación son la producción de celulasas de uso industrial mediante expresión inducida por etanol para evitar el efecto de estas enzimas sobre la pared celular vegetal (Klose et al., 2013), la producción controlada de la toxina de *Bacillus thuringiensis* (Bt) en respuesta a acumulación de Ácido salicílico para evitar generación de resistencia en insectos (Bates et al., 2005), la expresión de transportadores de sacarosa de levadura inducible por etanol para controlar y estudiar el metabolismo vegetal, ya que su expresión constitutiva tiene efectos adversos en el crecimiento (Caddick et al., 1998), o la inducción de la floración utilizando sulfato de cobre para controlar el desarrollo morfológico vegetal (Saijo & Nagasawa, 2014). Sin embargo, el campo de los interruptores genéticos para Biología Sintética de Plantas todavía se encuentra en sus inicios y existen pocos circuitos estables totalmente funcionales disponibles.

La gran mayoría de interruptores genéticos para Biología Sintética de Plantas están basados en promotores inducibles por pequeñas moléculas químicas. Estos, al contrario que el “Toggle switch” comentado anteriormente, requieren la presencia continua del estímulo químico para activar la expresión del gen diana regulado por el promotor inducible. Es decir,

cuando el estímulo desaparece, la expresión del gen diana también. Algunos ejemplos de estos inductores químicos son etanol (Felenbok, 1991), sulfato de cobre (Mett, Lochhead, & Reynolds, 1993; Saijo & Nagasawa, 2014), antibióticos (Baron, Gossen, & Bujard, 1997) o glucocorticoides como la dexametasona (Aoyama & Chua, 1997). Sin embargo, algunos de estos inductores químicos no son adecuados en un gran número de aplicaciones o para su utilización en campo, debido a que algunos tienen efectos deletéreos sobre las propias plantas (Amirsadeghi, McDonald, & Vanlerberghe, 2007), son tóxicos para los humanos, producen efectos adversos no deseados o son simplemente caros.

Con el fin poder ejercer una regulación eficiente, se están desarrollando interruptores para plantas capaces de mantener y cambiar entre estados de manera estable, además de poseer otras características esenciales para un buen interruptor genético: ajustabilidad, reversibilidad y que permita un estrecho control espacio-temporal de la expresión (Polstein & Gersbach, 2012). Los primeros interruptores funcionales en plantas que responden a estas características están basados en optogenética. Consisten en la activación de la expresión génica tras la exposición a luz roja y la desactivación tras exposición a luz roja lejana (Müller et al., 2014). Su funcionamiento está basado en la heterodimerización del fitocromo B (PhyB) y el factor de interacción del fitocromo 6 (PIF6) tras exposición a luz roja. Al fusionar PhyB a un dominio activador de la transcripción y a PIF6 a un dominio de unión al ADN, tras la dimerización se activa la expresión de un determinado gen diana, que puede ser desactivada de nuevo tras exposición a luz roja lejana.

No obstante, estos interruptores basan su funcionamiento en eventos de interacción proteica que en muchos casos puede dar lugar a inestabilidad. Por este motivo, se ha enfatizado en el diseño de interruptores genéticos capaces de modificar la propia estructura del ADN para llevar a cabo una regulación de la expresión génica estable y eficiente. La respuesta a esta búsqueda se encontró en los sistemas de recombinación específica de sitio.

1.4. RECOMBINACIÓN ESPECÍFICA DE SITIO

La recombinación específica de sitio (RES) consiste en un proceso especializado de recombinación génica conservativa, llevado a cabo mediante el intercambio recíproco de dos fragmentos de ADN, flanqueados por secuencias diana de reconocimiento específicas (Grindley, Whiteson, & Rice, 2006). Este mecanismo, a diferencia de la recombinación homóloga, es capaz de intercambiar dos fragmentos cualesquiera de ADN que estén flanqueados por las secuencias de reconocimiento específicas, aunque estas no compartan ninguna región homóloga. Este es un mecanismo natural presente en muchas especies, como en diferentes bacteriófagos para controlar la integración de sus genomas en el huésped (Nafissi & Slavcev, 2014), o como el sistema F₁o-FRT de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Broach, Guarascio, & Jayaram, 1982). Estos sistemas constituyen herramientas muy valiosas para la investigación básica, la ingeniería genética, metabólica y Biología Sintética.

La RES está mediada por recombinasas específicas de sitio (“site-specific recombinase” SSR), proteínas muy especializadas capaces de reconocer secuencias de ADN específicas, unirse a ellas y llevar a cabo el proceso de recombinación. Este reconocimiento es altamente específico, ya que estos sistemas han evolucionado siendo esenciales en diferentes procesos biológicos (Gaj, Sirk, & Barbas, 2014). Tras el reconocimiento, las SSR llevan a cabo un corte de las cadenas de ADN dentro de las propias secuencias de reconocimiento y realizan el intercambio de cadenas y la posterior religación, completando el proceso de recombinación sin adición ni eliminación de nucleótidos. Este proceso puede dar lugar a tres diferentes resultados según la situación y la orientación de las secuencias de reconocimiento (Grindley et al. 2006; Wang et al. 2011; **Figura 1**). La **integración** tiene lugar cuando se produce recombinación entre dos sitios de reconocimiento presentes en dos moléculas de ADN diferentes, si al menos una de ellas es

circular. La **escisión** o **resolución** tiene lugar entre sitios de reconocimiento con la misma orientación dentro de la misma molécula de ADN; la secuencia escindida es la flanqueada por ambos sitios de reconocimiento. La **inversión** tiene lugar entre sitios de orientación enfrentada dentro de la misma molécula de ADN, siendo el resultado final la secuencia flanqueada por estos sitios en posición reversa-complementaria. Estos eventos de recombinación en la mayoría de casos son reversibles. Debido a estos tres posibles resultados, en muchas ocasiones las recombinasas son mencionadas con diferentes nombres según la función que lleven a cabo de manera natural: integrasas, escisionasas/resolvasas o invertasas.

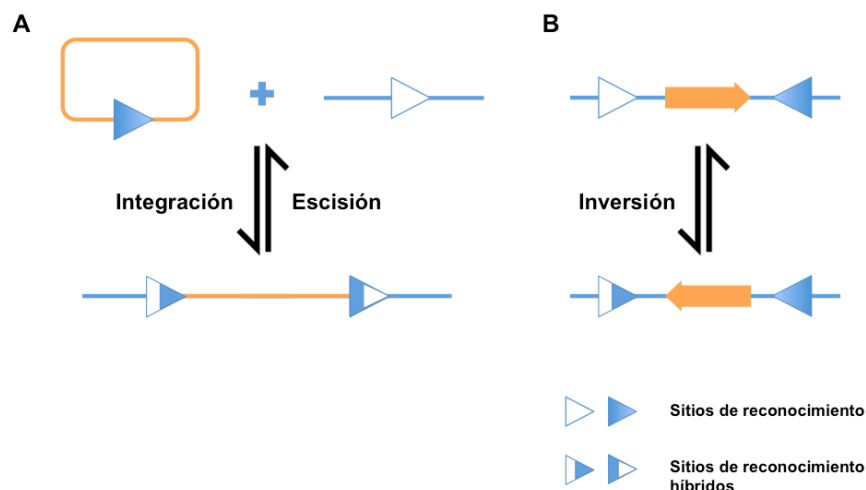


Figura 1. Tipos de recombinación específica de sitio. (A) Proceso de recombinación específica por integración/escisión. La integración tiene lugar mediante recombinación entre dos sitios de reconocimiento presentes en dos moléculas de ADN diferentes, siendo una de ellas circular, dando como resultado una única secuencia donde se ha insertado la secuencia de ADN circular y dos sitios de recombinación híbridos. La escisión tiene lugar mediante la recombinación entre dos sitios de reconocimiento dispuestos con la misma orientación en una única molécula de ADN, siendo el resultado dos moléculas de ADN separadas. Los procesos de integración y escisión son reversibles. (B) Proceso de recombinación específica de sitio por inversión entre dos sitios de reconocimientos enfrentados dentro de una única molécula de ADN. El resultado es la secuencia flanqueada por estos sitios invertida, es decir, en posición reversa-complementaria a la original. El proceso de inversión es reversible.

Existen dos grandes familias de SSRs conocidas, que se separan según su estructura y mecanismo de acción: **tirosina recombinasas** y **serina recombinasas** (Gaj et al., 2014; Grindley et al., 2006; Wang et al., 2011). Ambas familias se diferencian en la utilización de un residuo aminoacídico nucleofílico diferente (tirosina o serina) responsable de la rotura del enlace fosfodiéster del ADN y de formar un enlace covalente transitorio entre la proteína y la cadena de ADN, previo a la religación. Por otro lado, las tirosina recombinasas producen la rotura de una única cadena de cada molécula de ADN en cada catálisis y realizan la recombinación por unión Holliday, mientras que las serina recombinasas rompen al mismo tiempo las dos dobles cadenas de ADN y luego realizan el intercambio de cadenas y la religación (**Figura 2**).

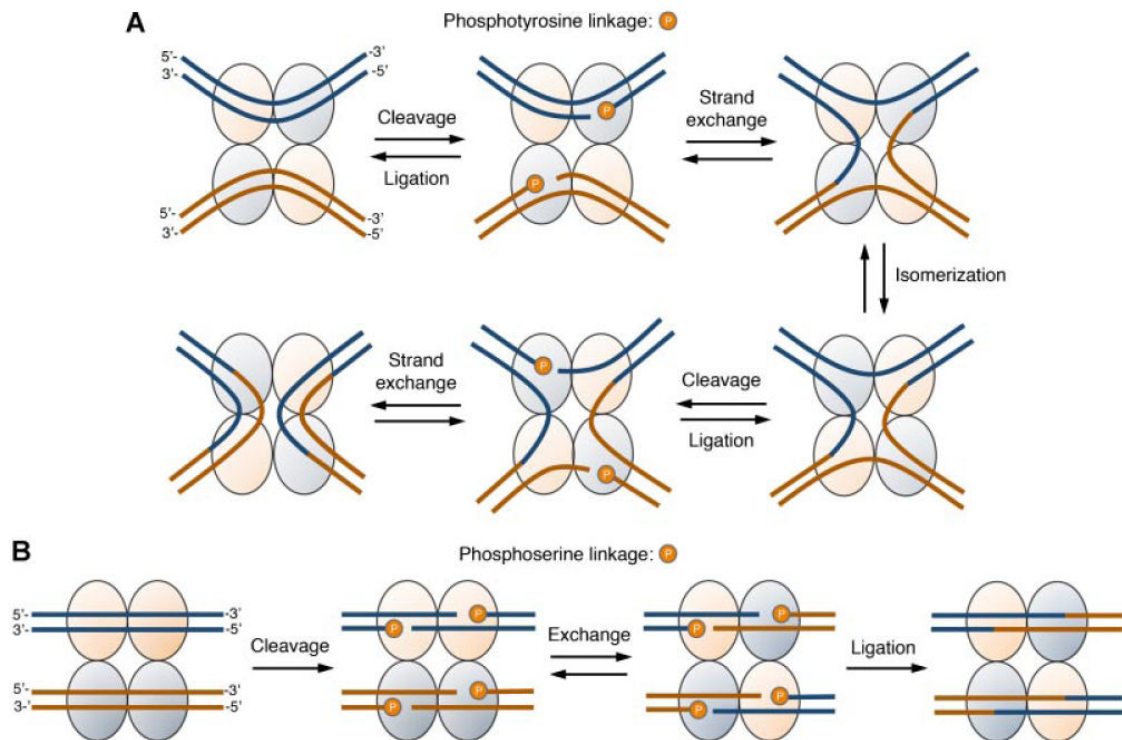


Figura 2. Mecanismos de recombinación específica de sitio. (A) Tirosina recombinasas: un tetrámero de recombinasas (círculos azules y naranjas) se encuentra unido a dos fragmentos de ADN en los sitios de reconocimiento específicos (dos recombinasas se unen a cada sitio de reconocimiento individual) formando el complejo sináptico. Dos monómeros activos (círculos azules) catalizan la rotura de una cadena de ADN de cada fragmento y la formación de un enlace fosfotirosina, posteriormente el intercambio de cadenas lleva a la formación de la unión de Holliday. Mediante isomerización, los dos monómeros restantes se activan catalizando la rotura de las cadenas restantes. Tras el intercambio de cadenas se libera el producto de la recombinación final. (B) Serina recombinasas: un dímero de recombinasas se une a cada sitio de reconocimiento. Posteriormente dos dímeros se unen formando un tetrámero unido a dos fragmentos de ADN, formando el complejo sináptico. Posteriormente se produce la rotura de la doble cadena simultáneamente, se forma un enlace fosfoserina covalente transitorio entre recombinasas y ADN y se produce el intercambio de cadenas al cambiar dos de las cuatro subunidades de posición. Finalmente se revierte el enlace fosfoserina y se forma el enlace fosfodiéster de ADN completando la religación y liberación del producto de recombinación. Figura reproducida de Gaj et al. 2014.

Actualmente se conocen muchas SSRs y son ampliamente utilizadas. Algunos ejemplos de tirosina recombinasas son Cre, del sistema Cre-Lox y Flp, del sistema Flp-FRT, ambas extensivamente utilizadas en ingeniería del genoma de una gran cantidad de organismos (Lyznik, 1996; Nagy, 2000; T. Xu & Rubin, 1993) o la integrasa del bacteriófago λ , utilizada también en métodos de clonaje como el sistema Gateway® (<https://www.lifetechnologies.com/es/en/home/life-science/cloning/gateway-cloning.html>). Los ejemplos más notables de serina recombinasas son las integrasas Φ C31 y Bxb1.

Más allá de la ingeniería genómica mediante SSRs, que lleva desarrollándose desde hace 3 décadas (Wang et al., 2011), actualmente se están desarrollando circuitos e interruptores genéticos basados en serina recombinasas de bacteriófagos en procariotas. Estos circuitos permiten el control de la expresión génica de una manera precisa y rápida a través de la modificación estable del ADN bacteriano en respuesta a un estímulo externo. Para ello se selecciona la expresión de un gen u otro de manera que la bacteria mantiene este estado durante varias generaciones hasta que otro estímulo induce la vuelta al estado inicial. Este tipo de sistemas pueden funcionar como dispositivos de memoria que permiten almacenar información durante generaciones (J. Bonnet, Subsoontorn, & Endy, 2012; Ham, Lee, Keasling, & Arkin, 2008; Siuti, Yazbek, & Lu, 2013) o como puertas lógicas en las que la combinación de estímulos externos puede dar lugar a diferentes resultados según el diseño del propio circuito genético (Jerome Bonnet, Yin, Ortiz, Subsoontorn, & Endy, 2013). No obstante, el gran número

de posibilidades que ofrecen estos sistemas todavía se encuentra en una fase temprana en organismos eucariotas. Por este motivo, el objetivo de este trabajo es la creación de un nuevo interruptor genético basado en recombinación específica de sitio para Biología Sintética de Plantas que permita aprovechar todas estas posibilidades.

Para la creación de este nuevo interruptor se escogió la recombinasa del Micobacteriófago Bxb1, miembro de la subfamilia de grandes serina recombinasas. Las serina recombinasas poseen ciertas ventajas respecto a las tirosina recombinasas que son de gran interés en diversas aplicaciones biotecnológicas. Muchas tirosina recombinasas requieren la presencia de un factor de integración del huésped (“Integration Host Factor” IHF) para su funcionamiento (Grindley et al., 2006) y utilizan sitios de reconocimiento largos (~200 bp). Sin embargo, las serina recombinasas no requieren la presencia de estos factores y utilizan sitios de reconocimiento cortos (~50 bp) (J. Bonnet et al., 2012; Keravala et al., 2006). Estas características permiten la utilización de las serina recombinasas en cualquier organismo sin necesidad de incorporar estos factores adicionalmente y facilitan la manipulación genética para incorporar los sitios de reconocimiento debido a su menor longitud. Por otro lado, las recombinasas de fago son reconocidas debido a que el proceso de recombinación es unidireccional, no reversible, pero puede ser revertido al añadir un factor de direccionalidad de la recombinación, lo que permite controlar la dirección del proceso (J. Bonnet et al., 2012; Ghosh, Wasil, & Hatfull, 2006). Por último, la elección de esta recombinasa esta basada en su exitosa utilización previa en circuitos genéticos procariotas (J. Bonnet et al., 2012; Jerome Bonnet et al., 2013) y en estudios que demuestran su eficacia y perspectivas de futuro en organismos eucariotas (Keravala et al., 2006; Z. Xu et al., 2013). Otros estudios demuestran su funcionamiento en organismos vegetales para realizar la escisión de marcadores de selección una vez obtenidas las líneas con las cualidades deseadas (Shao, Kumar, & Thomson, 2014; Thomson et al., 2012). Estos motivos hacen de ellas una herramienta prometedora para el diseño de circuitos e interruptores genéticos para aplicaciones biotecnológicas en plantas.

La integrasa elegida en este trabajo tiene 500 aminoácidos y proviene del gen gp35 del Micobacteriófago Bxb1. Su función es la de integrar y escindir el genoma del fago en el cromosoma bacteriano de *Mycobacterium smegmatis*, regulando así el ciclo lisogénico del fago (Kim et al., 2003). Por este motivo, se le denomina integrasa Bxb1. Esta integrasa reconoce dos sitios de unión de diferente secuencia, uno en el genoma del fago, llamado *attP* (“Phage attachment site”) y otro en el cromosoma bacteriano, llamado *attB* (“Bacterial attachment site”). La integrasa Bxb1 es capaz de unirse a estos sitios de reconocimiento e integrar el genoma del fago en el cromosoma bacteriano, mediante el mecanismo de recombinación detallado en la **Figura 2**. Como resultado, los sitios *att* quedan modificados dando secuencias producto híbridas de las anteriores, ahora llamadas *attR* y *attL*. Sin embargo, la integrasa Bxb1 por si misma funciona de manera unidireccional, es decir, no puede realizar la escisión en los sitios *attR* y *attL* (Ghosh, Pannunzio, Hatfull, & Gottesman, 2005). Sin embargo, se ha demostrado que la proteína gp47 del Micobacteriófago Bxb1 es una escisionasa (Xis) que actúa como factor de direccionalidad de la recombinación interaccionando con la integrasa para producir la recombinación por escisión entre los sitios *attR* y *attL* (Ghosh et al., 2006). Además la integrasa Bxb1 también posee función invertasa cuando dos sitios *att* complementarios se encuentran enfrentados el uno al otro, evento, que también es reversible con el concurso del factor de direccionalidad de la recombinación, Xis.

En vista de todo lo anterior, el objetivo de este trabajo consiste en el diseño y construcción de un nuevo interruptor genético bistable y reversible para Biología Sintética de Plantas, basado en la recombinación específica de sitio por inversión del Micobacteriófago Bxb1. Su funcionamiento se encuentra inspirado en el trabajo de un dispositivo de memoria bacteriano de Bonnet et al. 2012. Este dispositivo es análogo a los circuitos bistables “latch” usados en electrónica. Estos son capaces de almacenar información permanenciando en uno de sus dos posibles estados indefinidamente, hasta que un estímulo de entrada llamado “set”

induce un cambio de estado. Este nuevo estado también es memorizado, y solo podrá ser revertido tras recibir el impulso “reset”, devolviendo el latch a su estado inicial. En la **figura 3** se muestra la adaptación de estos dispositivos de memoria a Biología Sintética de Plantas. Este interruptor tiene dos posibles estados, 1 y 2. El objetivo final de este interruptor es la posibilidad de que los outputs de cada uno de los estados sean modificables a elección del investigador, pudiendo dotar a este interruptor de infinidad de funciones biológicas para cada aplicación.

Con el fin de comprobar la funcionalidad inicial del interruptor se utilizaron dos genes reporteros; el output del estado 1 es la expresión de la proteína fluorescente verde GFP, mientras que el output del estado 2 es la expresión de la proteína fluorescente roja DsRed. Para llevar a cabo los cambios de estado, el interruptor necesita un elemento capaz de registrar las señales de “set” o “reset” y dar como resultado el output adecuado. Este dispositivo, llamado registrador, está constituido por varios elementos biológicos con diferentes funciones. Incluye un promotor de la expresión génica en plantas flanqueado por sitios de recombinación *attB* y *attP* enfrentados. Dado que cada gen reportero se encuentra a cada lado del registrador, el promotor es capaz de expresar un gen u otro dependiendo de su orientación. Esta orientación puede ser modificada en respuesta a los estímulos “set” y “reset” mediante inversión por recombinación específica de sitio. En un estado inicial 1, el promotor se encuentra expresando el gen reportero GFP. En presencia del estímulo “set” (integrasa Bxb1), la orientación del promotor puede modificarse mediante inversión, alcanzando el estado 2. En este estado el output es la expresión de DsRed. Posteriormente, en presencia de una señal “reset” (integrasa Bxb1 junto a Xis), el registrador cambia de nuevo al estado 1, expresando de nuevo GFP. Durante este proyecto, todos los elementos génicos de este interruptor fueron adaptados al uso de codones de plantas y al estándar del sistema de ensamblaje GoldenBraid 2.0. y probados funcionalmente en plantas.

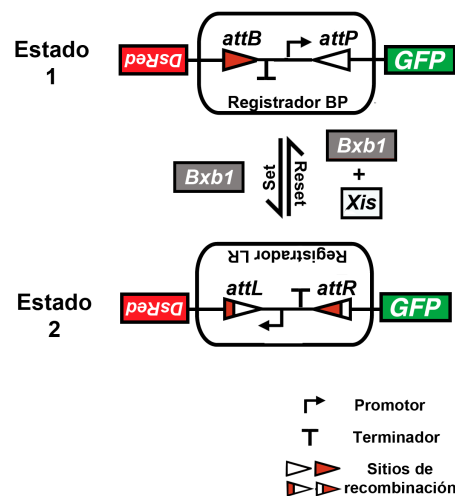


Figura 3. Funcionamiento del nuevo interruptor genético basado en recombinación específica de sitio.

En un estado inicial 1, un promotor de la expresión génica en plantas se encuentra orientado hacia el gen reportero fluorescente verde GFP, permitiendo su expresión. Un terminador de la expresión génica se encuentra evitando la expresión del reportero fluorescente rojo DsRed. En presencia de la integrasa Bxb1 (“set”, dado que el promotor y el terminador se encuentran flanqueados por sitios de reconocimiento *attB* y *attP* enfrentados, se produce una inversión del promotor por recombinación específica de sitio, produciéndose el estado 2. En este estado el promotor se encuentra expresando DsRed, y el terminador evitando la expresión de GFP. En el estado 2 los sitios *attB* y *attP* se han convertido por recombinación en los sitios híbridos *attL* y *attR*. Este estado puede revertirse (“reset”) en presencia de Bxb1 y el factor de direccionalidad de la recombinación (Xis), cuya interacción permite el reconocimiento de los sitios *attL* y *attR* y la subsiguiente recombinación específica de sitio, volviendo al estado 1. Figura inspirada en Bonnet et al. 2012.

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es el diseño, construcción y comprobación del funcionamiento de un nuevo interruptor genético biestable y reversible para Biología Sintética de Plantas compatible con el sistema de ensamblaje GoldenBraid 2.0, basado en recombinación específica de sitio de la integrasa y la escisionasa del Micobacteriófago Bxb1.

Con este fin, se determinaron diferentes subobjetivos a realizar durante el trabajo:

- Construcción de los elementos genéticos necesarios para el funcionamiento del interruptor en plantas.
- Comprobación del correcto funcionamiento de los eventos de recombinación específica de sitio sobre el nuevo interruptor, inversión y vuelta al estado inicial, en *Escherichia coli*.
- Determinación del correcto funcionamiento del proceso de activación y reversibilidad del interruptor genético en planta mediante expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*.
- Validación de los resultados obtenidos mediante expresión transitoria, a través de la transformación estable de los elementos del interruptor en *Nicotiana benthamiana* y la posterior comprobación de la activación del mismo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Diferentes cepas bacterianas fueron escogidas de acuerdo a sus características útiles en diferentes aplicaciones.

• ***Escherichia coli* DH5 α** : esta cepa fue usada para clonaje. La cepa fue crecida en Caldo de lisogenia (LB) en agitación (200 rpm) y a 37°C durante 16h. La selección se realizó suplementando el medio con ampicilina (100 μ g/mL), kanamicina (50 μ g/mL), espectinomina (50 μ g/mL) o cloranfenicol (25 μ g/mL) según el marcador de resistencia presente en cada vector. Para el crecimiento en placa se empleó LB agar suplementado con los anteriores antibióticos para la selección e isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,5 mM y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) a 40 μ g/mL para realizar selección blanco-azul de las colonias correctamente transformadas después de 16h. Para experimentos de inducción por arabinosa el medio se suplementó con 0,5% de L-arabinosa (Sigma-Aldrich).

• ***Agrobacterium tumefaciens***: la cepa GV3101 fue usada para transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana*. La cepa LBA4404 fue usada para transformación estable de *Nicotiana benthamiana* debido a su menor virulencia. Ambas cepas fueron crecidas en medio LB en agitación (200 rpm) y a 28°C durante 2 días suplementado con rifampicina (50 μ g/mL) y alguno de los antibióticos anteriores según el marcador de resistencia presente en el plásmido transformado. Para su crecimiento en placa se utilizó LB agar suplementado con los antibióticos anteriores y se creció durante 2 días a 28°C.

3.2. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

• ***E. coli* DH5 α electrocompetentes**: los plásmidos producto de las reacciones de restricción-ligación GoldenBraid, sección 3.12 *Ensamblaje de ADN: GoldenBraid*, fueron transformados en células de *E. coli* DH5 α electrocompetentes mediante electroporación. Se utilizaron 1,5 microlitros de la reacción y se expuso a las células a un pulso de 1500V en una cubeta de electroporación. Posteriormente fueron crecidas en LB agar para su selección, composición detallada en el apartado 3.1 *Cepas y condiciones de cultivo*. Los clones positivos son reconocibles por su color blanco, ya que la reacción GoldenBraid de restricción-ligación exitosa consiste en la eliminación del lacZ del vector de destino y la inclusión del inserto deseado.

• ***Agrobacterium tumefaciens* electrocompetentes**: las construcciones génicas validadas y listas para su expresión en *Nicotiana benthamiana* fueron transferidas a células de *Agrobacterium tumefaciens* electrocompetentes (cepas GV3101 y LBA4404) mediante electroporación. Se utilizaron 75 nanogramos de plásmido extraído de *E. coli* y se electroporaron a 1440V. Posteriormente fueron crecidas en LB-agar para su selección, detallada en el apartado 3.1 *Cepas y condiciones de cultivo*.

3.3. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO: MINIPREPS

La extracción de ADN plasmídico se realizó utilizando kits comerciales siguiendo las instrucciones del proveedor. Para *E. coli* se utilizó E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I (Omega Bio-Tek, Norcross, USA). Para *A. tumefaciens* se utilizó QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Alemania).

3.4. ANÁLISIS POR RESTRICCIÓN

Los nuevos ensamblajes y construcciones génicas fueron comprobados mediante análisis de restricción utilizando enzimas de restricción tipo II. Este consiste en la localización de sitios de corte de estas enzimas de restricción en la secuencia de ADN a comprobar, que tras su digestión y análisis mediante electroforesis en gel de agarosa permitan identificar un patrón de bandas característico. La simulación *in silico* de los patrones de restricción se realizó usando el software online “Benchling”. Las reacciones de digestión se realizaron de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial para cada enzima de restricción (Thermo Scientific, Rockford, USA):

- 1X tampón de reacción recomendado para cada enzima
- 0,5 unidades de enzima
- 250-500 ng ADN plasmídico

3.5. AMPLIFICACIÓN POR PCR

La amplificación por PCR se realizó con dos fines diferentes, domesticación y clonaje de piezas GoldenBraid y para diagnóstico de los eventos de recombinación específica de sitio. La simulación de estas reacciones se realizó mediante el software online Benchling. La temperatura de anillamiento de los cebadores al molde fue calculada para cada reacción mediante la herramienta online de New England Biolabs (<http://tmcalculator.neb.com>).

- **Domesticación y clonaje:** La amplificación se realizó utilizando ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion® (New England Biolabs, Ipswich, USA) en una reacción con las condiciones recogidas en la **tabla 1**.

Tabla 1. Condiciones de reacciones de PCR para domesticación GoldenBraid y clonaje.

Componentes	Condiciones de la reacción		
- 10 ng ADN molde (plásmido) - 200 µM mezcla de dNTPs - 0.5 µM Cebador directo - 0.5 µM Cebador reverso - 1 unidad Phusion® Polimerasa - 1X Phusion® Tampón HF	Desnaturalización inicial	98°C	30s
	35 ciclos	98°C	5-10 s
		45-72°C	10-30 s
		72°C	15-30s por kb
	Extensión final	72°C	5 min
	Espera	4°C	∞

- **Diagnóstico de eventos de recombinación:** La amplificación se realizó utilizando Taq ADN polimerasa (New England Biolabs, Ipswich, USA) en una reacción con las condiciones recogidas en la **tabla 2**.

Tabla 2. Condiciones de reacciones de PCR para diagnóstico de los eventos de recombinación.

Componentes	Condiciones de la reacción		
- 1ng ADN molde (plásmido) - 200 µM mezcla de dNTPs - 0.2 µM Cebador directo - 0.2 µM Cebador reverso - 1,25 unidades Taq polimerasa - 1X Tampón Taq estándar	Desnaturalización inicial	95°C	30s
	30 ciclos	95°C	15-30 s
		45-72°C	15-60 s
		72°C	1 min por kb
	Extensión final	72°C	5 min
	Espera	4°C	∞

La **tabla 3** recoge todos los cebadores utilizados para amplificación por PCR en este trabajo. Los cebadores fueron sintetizados por Sigma-Aldrich, excepto 3 y 6, que al ser mayores de 45bp fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies como “Ultramere® Oligonucleotides”.

Tabla 3. Lista de cebadores utilizados en las reacciones de amplificación por PCR.

	Cebador	Secuencia (5'→3')
1	RegisterBP_Module1_F	GCGCGTCTCGCTCGATAGTTCTAGTCGAAATGGCCTCC
2	RegisterBP_Module1_R	GCGCGTCTCGCTCGGGAGAGGTCCTGGATTTTGGTTT
3	RegisterBP_Module2Part1_F	GCGCGTCTCGCTCGCTATTCGGCCGGCTTGTGACGACGGCAGTTTCCGTCG TCAGGATCATCCGGGCTCGAAAACTATATGCTCT
4	RegisterBP_Module2Part1_R	GCGCGTCTCGACGAAAATATAGTTGAAACAGA
5	RegisterBP_Module2Part2_F	GCGCGTCTCGTCTACTAGAGCCAAGCTGATCTC
6	RegisterBP_Module2Part2_R	GCGCGTCTCGCTCGAGGTTCTGGTTTGTCTGGTCAACCACCGCAGTTTCAG TGGTGTACGGTACAAACCCTAGTAAATTGTAATGTTGTTTGGTTG
7	RegisterBP_Module3_F	GCGCGTCTCGCTCGACCTTTCTAGTCGAAATGGTGAGCAAGGG
8	RegisterBP_Module3_R	GCGCGTCTCGCTCGAGCGGAGTCGGTCCCATTAT
9	Xis_Part1_F	GCGCGTCTCGCTCGAATGACTCAGCGTATCGTCTTTCTACC
10	Xis_Part1_R	GCGCCGTCTCGATACGACAGCCTGCCGGT
11	Xis_Part2_F	GCGCCGTCTCGGTATCGCACTCGTTCGGGTA
12	Xis_Part2_R	GCGCGTCTCGCTCGAAGCTTAGACTTCCCAGACCTGGCC
13	ReporterLR_Part1_F	GCGCGTCTCGCTCGCTATTCGGCCGGCTTGTGCGA
14	ReporterLR_Part1_R	GCGCGTCTCGGGACGATTCAAGGCTTGCTTCA
15	ReporterLR_Part2_F	GCGCGTCTCGGTCCATACTGGAATAGTACTTCTG
16	ReporterLR_Part2_R	GCGCGTCTCGCTCGAGGTTCTGGTTTGTCTG
17	TestLR&BP_F	TTGGAGCCGTAAGTGAAGT
18	TestLR_R	CAACCACGTCTTCAAAGCAAGT
19	TestBP_R	GTCTAGTGTTTTAGTGTGTCTGTCTGT

3.6. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La electroforesis en gel de agarosa fue la técnica utilizada para comprobar los resultados de análisis por restricción y de las reacciones de PCR. Los geles se hicieron con una cantidad variable de agarosa adecuada a cada análisis en TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) y Bromuro de etidio. Se utilizaron como marcadores “Gene Ruler DNA Ladder 1kb y 100 bp” (Thermo Scientific, Rockford, USA) y “Orange Loading Dye” (Thermo Scientific, Rockford, USA) fue diluido en las muestras antes de cargarlas en el gel. La electroforesis se realizó con el voltaje adecuado al volumen y tamaño de la cubeta de electroforesis indicado por el proveedor. Tras la electroforesis, los geles se visualizaron en un transiluminador (Syngene, Cambridge, UK) y se fotografió con el software GeneSnap.

3.7. SECUENCIACIÓN

Las nuevas partes GoldenBraid, domesticadas y clonadas en el plásmido domesticador pUPD, sección 3.12.1 *Domesticación de piezas GoldenBraid*, fueron verificadas mediante secuenciación por terminador fluorescente y electroforesis capilar basado en di-desoxinucleótidos marcados con fluorocromos. Para ello se utilizaron los cebadores T7 y SP6, cuyo sitio de anillamiento se encuentra presente en el vector pUPD (**Figura S 1**), y ADN plasmídico molde a una concentración de 200 ng/μL. Procedimiento realizado por el servicio de secuenciación del IBMCP, Valencia, España.

3.8. CRIOPRESERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Las partes GoldenBraid y construcciones multigénicas verificadas fueron almacenadas en forma de “stock” de glicerol bacteriano e introducidas dentro de la colección GoldenBraid. Para ello, 700 μL de cultivo saturado de colonias individuales de *E. coli* o *A. tumefaciens* portadoras del plásmido de interés fueron mezcladas con 300 μL de glicerol en agua destilada al 50% en un criovial de 1,2 mL y almacenadas a -80°C. Para su descongelación, parte del cultivo congelado fue sembrado en placas de medio sólido LB agar.

3.9. TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE *Nicotiana benthamiana*

La transformación transitoria de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es un método muy establecido de expresión de proteínas heterólogas que permite una rápida y abundante producción con el fin de comprobar el funcionamiento de nuevos elementos génicos en un corto periodo de tiempo. Cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 crecidos durante la noche fueron centrifugados a 3000rpm durante 20 minutos en tubos de cultivo falcon. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 5mL de solución de agroinfiltración (MES 10 mM a pH 5.6, MgCl₂ 10 mM, y acetosiringona 200 mM en dimetilsulfoxido (DMSO)) y se incubó a temperatura ambiente en un agitador de rodillos durante 2 horas protegiendo al cultivo de la luz. Durante este proceso se produce la activación de los genes *vir* de virulencia presentes en el plásmido “helper” de *A. tumefaciens*, responsables de la transferencia del ADN de transferencia (T-DNA) bacteriano a la planta (Gelvin, 2003). Posteriormente, se midió la Densidad Óptica a 600 nm y se ajustó a 0,2 en todos los cultivos diluyendo con más solución de agroinfiltración. Para coinfiltrar construcciones génicas en plásmidos diferentes, se mezclaron a partes iguales cultivos de *A. tumefaciens* con los diferentes plásmidos. También se mezclaron todos los cultivos a partes iguales con cultivo de p19, proteína supresora del silenciamiento génico del virus del enanismo arbustivo del tomate (TBSV) (Voinnet, Rivas, Mestre, & Baulcombe, 2003). La inoculación tuvo lugar utilizando jeringas sin aguja de 2,5 mL en el envés de hojas de *Nicotiana benthamiana* de 3-5 semanas de edad. Para experimentos con hojas jóvenes se realizó agroinfiltración al vacío, sumergiendo las hojas en solución de agroinfiltración y aplicando vacío mediante el uso de una bomba (Kapila, De Rycke, Van Montagu, & Angenon, 1997). Las condiciones de crecimiento de las plantas fueron ciclos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 24°C durante el día y 20°C durante la noche. Finalmente las hojas fueron recogidas 4 días post-infiltración para su análisis.

3.10. TRANSFORMACIÓN ESTABLE DE *Nicotiana benthamiana*

Plantas de *N. benthamiana* fueron transformadas mediante una modificación del método transformación y regeneración *in vitro* de discos de hoja (Horsch & Klee, 1986; Horsch, 1985). Hojas jóvenes completamente expandidas de plantas de 3-4 semanas (condiciones de crecimiento: ciclos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 24°C durante el día y 20°C

durante la noche) fueron recogidas y esterilizadas sumergiéndolas durante 15 minutos en una solución de 5% lejía en agua y 20 µL de Tween 20 por cada litro de solución. Posteriormente se enjuagaron una vez en alcohol al 70% y tres veces en agua destilada estéril. Se obtuvieron discos de 0,8-1 cm de diámetro de las hojas estériles utilizando un sacabocados estéril. Se prepararon 50 discos por cada construcción a transformar. Los discos se incubaron en placas de pre-encallecimiento (**Tabla 4**) durante 24 horas a 25°C bajo luz fluorescente. El mismo día se creció *A. tumefaciens* LBA4404 conteniendo el plásmido de interés en medio LB con antibióticos de selección pero sin rifampicina, ya que los discos son sensibles a esta, y se dejó crecer a 28°C por la noche. Se vertió el cultivo estacionario de *A. tumefaciens* en una placa de Petri estéril, se sumergieron los discos en él durante 2-3 minutos y se incubaron durante 48 horas en placas de pre-encallecimiento nuevas. Posteriormente los discos se transfirieron a placas con medio de selección (**Tabla 4**), que contiene carbenicilina para eliminar restos de *A. tumefaciens*, se sellaron con cinta microporosa y se incubaron durante 3-5 semanas para favorecer la formación de callos. Se obtuvieron aproximadamente 30 callos por construcción transformada. Tras este tiempo, pequeños brotes aparecieron de los callos formados. Estos fueron cortados en condiciones estériles y transferidos a botes con medio de enraizamiento (**Tabla 4**) durante 2-4 semanas para favorecer la aparición de raíces. Tras el desarrollo de raíces, las plántulas fueron transferidas a condiciones estándar de cultivo en invernadero. Se obtuvieron aproximadamente 15 plántulas de cada construcción transformada.

Tabla 4. Composición de los diferentes medios para transformación estable de *N. Benthamiana*.

	Medio de pre-encallecimiento	Medio de selección	Medio de enraizamiento
Medio basal	0,8% Phytoagar 4,9 g/L de sales Murashige y Skoog (MS) con vitaminas y MES 3% Sacarosa		
Hormonas	<ul style="list-style-type: none"> • 1,0 µg/mL Bencil amino purina (BAP) • 0,1 µg/mL Ácido Naftaleno Acético (NAA) 	<ul style="list-style-type: none"> • 1,0 µg/mL Bencil amino purina (BAP) • 0,1 µg/mL Ácido Naftaleno Acético (NAA) 	-
Antibióticos	-	<ul style="list-style-type: none"> • 500 µg/mL Carbenicilina • 100 µg/mL Kanamicina 	<ul style="list-style-type: none"> • 500 µg/mL Carbenicilina • 100 µg/mL Kanamicina
Ajustar a pH 5,7 con KOH y autoclavar			

3.11. MICROSCOPIA E IMAGEN

La fluorescencia de las hojas de *N. benthamiana* recogidas 4 días postinoculación fue examinada utilizando un macroscopio estereoscópico equipado con una fuente de fluorescencia (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Las imágenes de fluorescencia verde de GFP fueron capturadas utilizando un filtro de excitación 480/40 nm y filtro de emisión 510LP mientras que la señal de DsRed se captó con un filtro de excitación 545/30 y un filtro de emisión 620/60.

Las hojas de *N. benthamiana* también fueron examinadas a los 4 días postinoculación mediante microscopía confocal de fluorescencia con un microscopio ZEISS 780 AxioObserver Z1 (ZEISS, Jena, Germany) usando un objetivo cAPO 40X/1.2 W. El tejido folicular fue cortado y montado en agua en un portaobjetos. La fluorescencia verde de GFP fue detectada excitando a 488 nm con un láser Ar y su emisión fue detectada entre 500-530 nm. La fluorescencia roja de DsRed fue detectada excitando con la línea 514 del láser Ar, y su emisión fue examinada entre 580-620nm. Las imágenes adquiridas fueron analizadas mediante el software de código abierto basado en ImageJ, Fiji.

3.12. ENSAMBLAJE DE ADN – GOLDENBRAID 2.0

En vista de la gran importancia de conocer detalladamente las bases y el proceso del sistema de ensamblaje GoldenBraid para comprender el diseño del nuevo interruptor genético, en esta sección se ha incluido una descripción exhaustiva del método con ejemplos explicativos.

GoldenBraid (GB) es un sistema modular de ensamblaje de ADN para Biología Sintética de plantas que permite la construcción de complejos dispositivos multigénicos mediante la combinación de diferentes piezas estándar de ADN (Sarrion-Perdigones et al., 2011, 2013). Este sistema utiliza un algoritmo de ensamblaje simple y eficiente que sigue un orden jerárquico, niveles, con el fin de obtener complejas construcciones multigénicas (**Figura 4**). En primer lugar, en el nivel -1, un fragmento de ADN de interés debe ser domesticado para adaptarlo al sistema GoldenBraid, constituyendo una parte GB reutilizable e intercambiable de la colección. Las partes, o piezas de Nivel 0, son la unidad mínima de ensamblaje y cada una posee una función propia específica (e.g. promotores de la expresión génica o regiones codificantes (CDS)). Posteriormente, diversas partes pueden ser combinadas en un único ensamblaje multipartito Golden Gate (Engler et al., 2009), con el fin de obtener una unidad transcripcional (TU), nivel 1, también reutilizable e intercambiable en el sistema GB (e.g. Promotor:CDS:Terminador). Finalmente, GoldenBraid permite la combinación de diferentes unidades transcripcionales mediante ensamblajes binarios en el Nivel 2, con el fin de aumentar la complejidad de las construcciones génicas de manera iterativa y virtualmente indefinida, hasta obtener la construcción multigénica deseada (**Figura 4**).

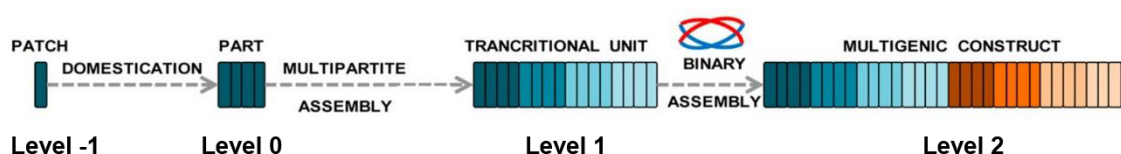


Figura 4. Visión general del sistema de ensamblaje modular GoldenBraid 2.0 (GB). (Nivel -1) Un fragmento de ADN en primera instancia es domesticado mediante su división en parches para eliminar sitios de restricción BsaI y BsmBI internos. (Nivel 0) Los diferentes parches posteriormente se ensamblan para formar una pieza estándar de ADN totalmente compatible con el sistema GB. (Nivel 1) Diferentes piezas pueden combinarse mediante ensamblaje multipartito Golden Gate para formar una unidad transcripcional. (Nivel 2) Finalmente, el ensamblaje binario GB permite combinar unidades transcripcionales de dos en dos, hasta obtener la construcción multigénica final deseada. *Figura reproducida de Sarrion-Perdigones et al. 2013.*

El sistema GoldenBraid está diseñado con el fin de llevar a cabo cada una de las diferentes reacciones de ensamblaje mencionadas anteriormente en una única reacción de restricción-ligación, en un solo tubo. Esto es posible gracias al uso de enzimas de restricción tipo IIS, cuya secuencia de reconocimiento es distinta a su secuencia de corte, pudiendo ser esta última definida a conveniencia (**Figura 5**). De esta manera, la acción de estas enzimas de restricción IIS genera extremos cohesivos de 4 nucleótidos que posteriormente pueden ser utilizados para la ligación de moléculas de ADN con extremos complementarios, de manera ordenada e inequívoca.

En vista del gran número de posibilidades que ofrece este sistema de ensamblaje, GoldenBraid definió junto a otro método de ensamblaje basado en el mismo principio, MoClo (Weber et al., 2011), una gramática conjunta y estándar para Biología Sintética de Plantas (Sarrion-Perdigones et al. 2013; **Figura 6**). Esta gramática define los 4 nucleótidos de los extremos cohesivos de las diferentes partes estándar de ADN, de manera que estas partes puedan intercambiarse y usarse según las necesidades del investigador. GoldenBraid dispone de una amplia colección de partes de ADN para Biología Sintética de Plantas, así como

herramientas online para guiar al usuario en el proceso de ensamblaje accesible a todo el mundo a través de su página web (<https://gbcloning.org>).

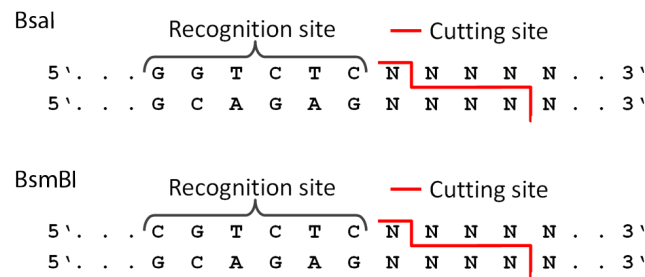


Figura 5. Secuencias de reconocimiento y corte de las enzimas de restricción tipo IIS: BsaI y BsmBI.

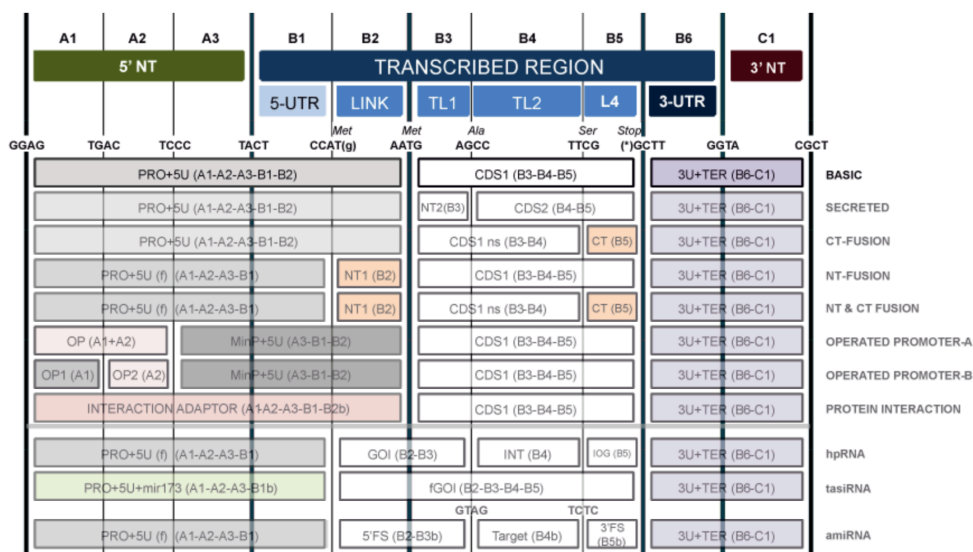


Figura 6. Gramática para el ensamblaje multipartito en el sistema GoldenBraid 2.0. En la figura se ilustran todas las posibilidades de ensamblaje multipartito estándar posibles mediante el sistema GoldenBraid2.0. El ensamblaje básico utilizado en este trabajo consiste en la combinación de un promotor de la expresión génica (Pieza A1-A2-A3-B1-B2) (Extremos 5' GGAG, 3' AATG), una región codificante de una proteína (Pieza B3-B4-B5) (Extremos 5' AATG, 3' GCTT) y un terminador de la transcripción (Pieza B6-C1) (Extremos 5' GCTT, 3' CGCT). A este ensamblaje básico se le puede añadir o cambiar elementos dentro del ensamblaje multipartito según las necesidades, siguiendo la gramática definida (e.g. fusión C-terminal de proteínas). Figura reproducida de gbcloning.org.

Una vez definido el uso general del Sistema GoldenBraid, se va a describir en detalle el proceso de construcción de nuevos dispositivos genéticos llevados a cabo en este trabajo. Este proceso se divide en tres partes: **domesticación**, **ensamblaje multipartito** y **ensamblaje binario**.

3.12.1. Domesticación de piezas GoldenBraid 2.0

El término domesticación hace referencia a la adaptación de una secuencia de ADN a un sistema de ensamblaje determinado, GoldenBraid en este caso, de manera que esta sea estándar y totalmente compatible con el mismo. Para ello, este proceso requiere (i) la eliminación de sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción tipo IIS utilizadas en GoldenBraid (BsmBI y BsaI) (ii) la adición de 4 nucleótidos para formar los extremos adecuados según la función de la parte y la gramática GoldenBraid (**Figura 6**). Una vez domesticado un fragmento de ADN, este

se clona mediante una reacción GB de restricción-ligación en el vector pUPD de Nivel 0 (Universal Parts Domesticator Plasmid). Las condiciones de la reacción son estándar (25-50 ciclos: 2 min 37°C, 5 min a 16°C) y sus componentes vienen detallados a continuación:

- 75 ng vector domesticador pUPD
- 40 ng de cada parche producto de PCR
- 3 unidades de Ligasa T4 (Promega, Madison, USA)
- 5 unidades de BsmBI (New England Biolabs, Ipswich, USA)
- 1x Tampón Ligasa T4 (Promega, Madison, USA)

Existen dos estrategias diferentes para domesticar piezas de ADN. Cada una es necesaria según las condiciones iniciales de la secuencia a domesticar. Estas son: **mutagénesis por PCR y síntesis de novo**. Los detalles generales de este proceso, así como la descripción de la domesticación de la integrasa Bxb1 y la escisionasa Xis se encuentran incluidas en el apartado de Anexos (*sección 8.1 Domesticación de piezas goldenbraid 2.0 mediante mutagénesis por pcr y 8.2 Domesticación de piezas goldenbraid 2.0 mediante síntesis de novo*)

3.12.2. Ensamblaje multipartito

Las partes GB domesticadas, nivel 0, son combinadas conjuntamente mediante un ensamblaje multipartito para constituir una unidad transcripcional (TU) con funcionalidad propia en el organismo vegetal de destino. Estas unidades transcripcionales pueden estar compuestas por diferentes tipos de partes según su funcionalidad y son las que constituyen el Nivel 1 (**Figura 6**). Estas piezas son insertadas en un vector de destino basado en los vectores pCAMBIA (Roberts et al. 1997), llamados pDGB3_α1 y pDGB3_α2 (**Figura S 5**). Estos son vectores Ti binarios, debido a que poseen la región del T-DNA entre el “Left Border” y el “Right Border” que será transferida a la planta por transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Murai, 2013). La unidad transcripcional más sencilla es la compuesta por Promotor:CDS:Terminador. Las piezas constituyentes de las TUs son ensambladas dentro del vector de destino mediante una única reacción GB de restricción-ligación, utilizando en esta ocasión la enzima de restricción tipo IIS: BsaI (25-50 ciclos: 2 min 37°C, 5 min a 16°C):

- 75 ng vector Nivel 1: pDGB3_α1 o pDGB3_α2
- 75 ng de cada pieza GB Nivel 0
- 3 unidades de Ligasa T4 (Promega, Madison, USA)
- 5 unidades de enzima BsaI (New England Biolabs, Ipswich, USA)
- 1x Tampón Ligasa T4 (Promega, Madison, USA)

El producto de reacción es posteriormente transformado en células electrocompetentes *E. coli* DH5α. Los clones positivos fueron seleccionados en medio con kanamicina, IPTG y X-Gal por selección blanco-azul y el ensamblaje correcto fue comprobado mediante análisis de restricción. Detalle de cada proceso mencionado disponible en su correspondiente sección.

Las piezas de nivel 0 B3-B4-B5 (mencionadas en las secciones 8.1 y 8.2), Bxb1 y Xis, fueron combinadas junto a otras piezas mediante ensamblaje multipartito para obtener nuevas unidades transcripcionales. Ambas fueron ensambladas junto a la pieza A1-A2-A3-B1-B2 correspondiente al promotor constitutivo viral CaMV 35S y a la pieza B6-C1 correspondiente al terminador viral CaMV 35S utilizando vectores de destino pDGB3_α1 y pDGB3_α2 respectivamente (**Figura 7**). Finalmente se obtuvieron dos unidades transcripcionales independientes.

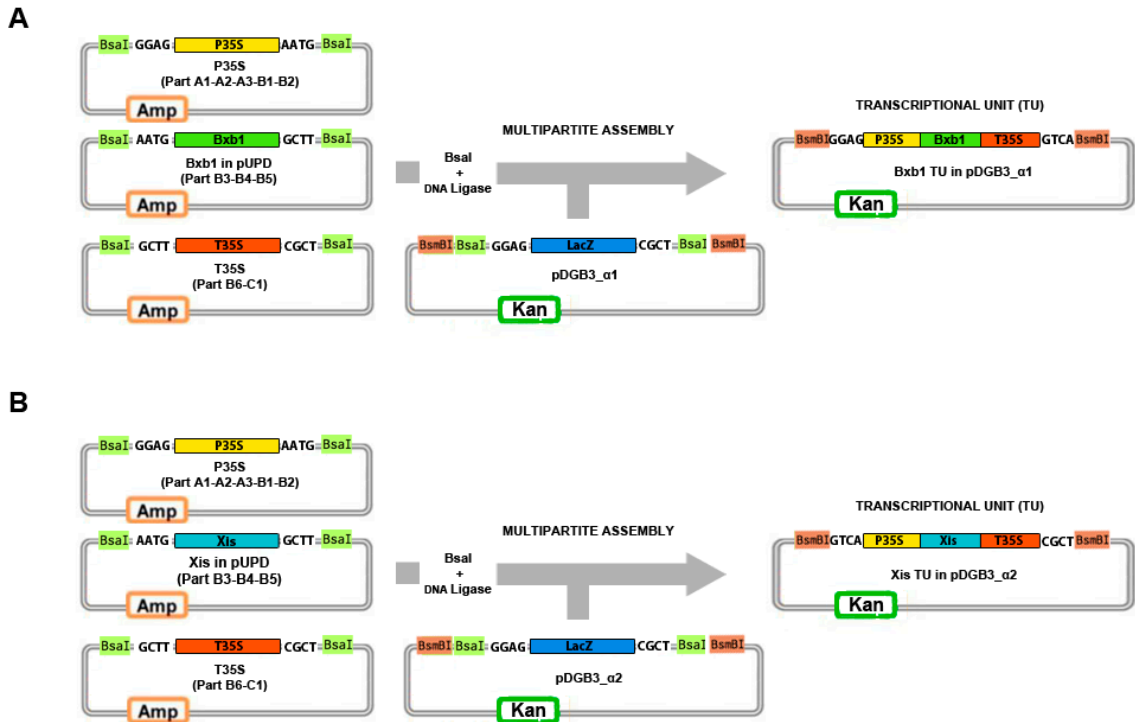


Figura 7. Proceso de ensamblaje multipartito GoldenBraid 2.0. (A) Tres piezas GB de nivel 0 (Promotor 35S, CDS de la integrasa Bxb1 y el terminador 35S) son combinadas en un mismo ensamblaje multipartito dentro del vector de destino pDGB3_α1. Este proceso se lleva a cabo en una única reacción GB de digestión BsaI y ligación. Cada una de estas piezas se encuentra flanqueada por sitios de restricción BsaI, que tras la acción de la enzima de restricción dejan accesibles extremos cohesivos de 4 nucleótidos, complementarios entre si y con el vector de destino. La acción de BsaI sobre el vector elimina el LacZ y permite la inserción de la unidad transcripcional. El resultado del proceso es el ensamblaje ordenado de cada una de las partes por complementariedad de los extremos dentro del vector de destino, obteniéndose una unidad transcripcional de la integrasa Bxb1, nivel 1, capaz de ser expresada en planta. **(B)** Este esquema representa el mismo proceso de ensamblaje multipartito anterior, entre tres piezas de nivel 0 (Promotor 35S, CDS de la escisionasa Xis y el terminador 35S) en el vector de destino pDGB3_α2. Este proceso da como resultado la unidad transcripcional de Xis nivel 1, funcional en planta.

3.12.3. Ensamblaje binario

Una vez construidas las diferentes unidades transcripcionales de nivel 1 mediante ensamblajes multipartitos, GoldenBraid ofrece la posibilidad de crear ensamblajes multigénicos complejos en el nivel 2. Para ello utiliza dos sets de vectores, α y Ω (pDGB3_α1 y pDGB3_α2; pDGB3_Ω1 y pDGB3_Ω2) (**Figura S 5 y S 6**). El inserto de dos vectores del mismo set puede ensamblarse conjuntamente en un plásmido de destino del otro set mediante un ensamblaje binario GoldenBraid. Es decir, el inserto de un vector pDGB3_α1 y el inserto de un vector pDGB3_α2 pueden ensamblarse conjuntamente en un vector de destino Ω , tanto pDGB3_Ω1 como pDGB3_Ω2, y viceversa. Mediante este sistema, GoldenBraid ofrece la posibilidad de crear construcciones complejas de manera virtualmente indefinida mediante un método de ensamblaje iterativo basado en los dos sets de vectores para ensamblaje binario (**Figura 8**).

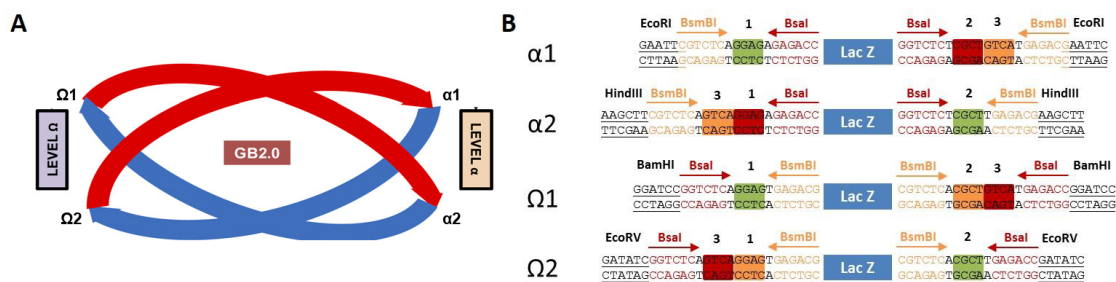


Figura 8. Representación del ensamblaje binario GoldenBraid 2.0. (A) Representación del algoritmo de ensamblaje binario iterativo de GoldenBraid 2.0. Los insertos de dos vectores complementarios de nivel α (pDGB3_ $\alpha 1$ y pDGB3_ $\alpha 2$) son introducidos conjuntamente en un vector de destino de nivel Ω (pDGB3_ $\Omega 1$ o pDGB3_ $\Omega 2$) y viceversa. De esta manera este proceso iterativo es infinito, dando lugar a la creación de construcciones multigénicas cada vez más complejas. (B) Detalle de la secuencia de los vectores de destino nivel α y nivel Ω . Las secuencias 1,2 y 3 representan los extremos de 4 nucleótidos que tras la digestión con las enzimas de restricción IIS (BsaI y BsmBI) podrán ser ligados con insertos de extremos complementarios. Sitios en rojo son los que resultan de digestión con BsaI, naranjas con BsmBI y verdes con ambas. Al utilizar vectores α como destino se utiliza BsaI, mientras que al ser vectores Ω los de destino, se utiliza BsmBI. De esta manera, en todos los vectores de destino se elimina el LacZ, permitiendo la inserción de nuevas unidades transcripcionales.

El ensamblaje binario tiene lugar en una única reacción restricción-ligación donde la enzima utilizada depende de los vectores de inicio y el vector de destino (i.e. para ensamblar dos insertos de vectores nivel α en un vector de destino Ω se utiliza BsmBI, si es al contrario se usa BsaI) (Tabla 5). Los vectores de nivel α contienen resistencia a kanamicina para su posterior selección (Figura S5), mientras que los de nivel Ω contienen resistencia a espectinomicina (Figura S6).

Tabla 5. Protocolo de ensamblaje binario GoldenBraid 2.0.

Ensamblaje binario nivel Ω	Ensamblaje binario nivel α
- 75 ng pDGB3_ $\alpha 1$ con inserto de origen	- 75 ng pDGB3_ $\Omega 1$ con inserto de origen
- 75 ng pDGB3_ $\alpha 2$ con inserto de origen	- 75 ng pDGB3_ $\Omega 2$ con inserto de origen
- 75 ng pDGB3_ $\Omega 1$ o pDGB3_ $\Omega 2$ de destino	- 75 ng pDGB3_ $\alpha 1$ o pDGB3_ $\alpha 2$ de destino
- 3 unidades de Ligasa T4	- 3 unidades Ligasa T4
- 5 unidades de BsmBI	- 5 unidades de BsaI
- 1x Tampón Ligasa T4	- 1x Tampón Ligasa T4
25-50 ciclos: 2 min 37°C, 5 min a 16°C	

El proceso GoldenBraid binario fue realizado para llevar a cabo el ensamblaje de las Unidades transcripcionales de nivel 1 previamente descritas (Bxb1 TU y Xis TU) en el vector de destino pDGB3_ $\Omega 1$ (Figura 9). De esta manera se obtuvo una construcción multigénica de nivel 2 funcional en planta.

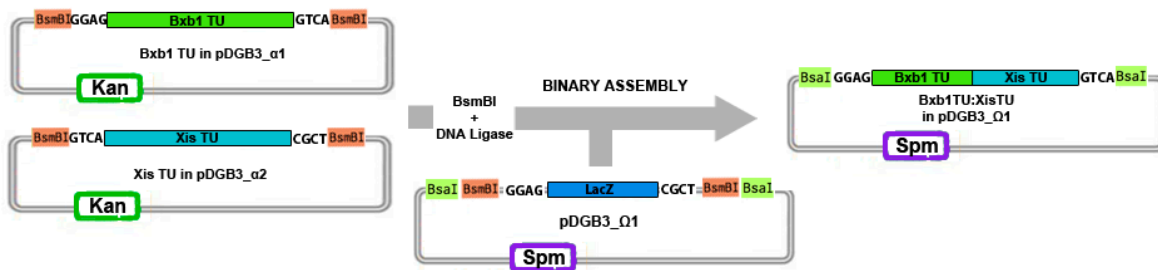


Figura 9. Proceso del ensamblaje binario GoldenBraid 2.0 de las unidades transcripcionales (TU) de la integrasa Bxb1 y Xis. Dos vectores de nivel α con sus respectivos insertos (Bxb1 TU en pDGB3_α1 y Xis TU en pDGB3_α2) junto con el vector de destino nivel Ω (pDGB3_Ω1) fueron sometidos a una reacción binaria GB de digestión con BsmBI y ligación. Como resultado, Los dos insertos de entrada se ensamblan en orden determinado por la complementariedad de sus extremos cohesivos de 4 nucleótidos dentro del vector de destino. De esta manera se obtiene una construcción multigénica mediante el sistema GoldenBraid 2.0.

El producto de esta reacción es posteriormente transformado en células electrocompetentes *E. coli* DH5α. Los clones positivos fueron detectadas en medio de selección con espectinomycin y con IPTG y X-Gal para selección blanco-azul. A las colonias positivas se les realizó una extracción de ADN plasmídico y se comprobó el resultado del mediante análisis de restricción. Detalles de cada proceso mencionado disponibles en su sección correspondiente.

4. RESULTADOS

4.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS ELEMENTOS DEL INTERRUPTOR GENÉTICO

Para la construcción de un nuevo interruptor genético biestable, reversible y funcional en Plantas se comenzó con un el diseño minucioso de cada uno de sus elementos. Con el fin de que este interruptor fuera reutilizable y adaptable a diferentes aplicaciones biotecnológicas, su diseño también se centró en hacer el interruptor modular, estándar y compatible con uno de los sistemas de ensamblaje más utilizados en la disciplina, GoldenBraid (Sarrion-Perdigones et al., 2011, 2013). Los elementos básicos del interruptor son: el **Reportero**, el **generador “set”** (integrasa Bxb1) y el **generador “reset”** (escisionasa Xis)(**Figura 3**):

4.1.1. Construcción del Reportero BP

El reportero es el elemento central del interruptor genético. Se trata de un dispositivo genético con dos posibles estados (1 y 2), cuyo output es la expresión de dos proteínas diferentes. Tiene la capacidad de modificar su estado mediante inversiones mediadas por recombinación específica de sitio y de memorizarlo hasta que se induzca la señal de reversión al estado inicial. Con el fin de hacer posible su funcionamiento, el reportero contiene los siguientes elementos:

- **El registrador:** este es el elemento dónde tendrá lugar la inversión por recombinación específica de sitio y es el que permite activar la expresión de un gen u otro según su orientación. Para ello el registrador esta compuesto por diferentes partes genéticas (**Figuras 3 y 10**):

- Un promotor constitutivo de altos niveles de expresión en plantas. El promotor viral CaMV 35S será el utilizado (<https://gbcloning.org/feature/GB0030/>).
- Un terminador de la expresión génica situado en orientación reversa-complementaria al promotor, con el fin de evitar la expresión del gen no activado. Se utilizó el terminador de *Solanum lycopersicum* Mtb. (<https://gbcloning.org/feature/GB0142/>).
- Secuencias *attB* y *attP* de recombinación específica de sitio mediante la integrasa Bxb1. Estas se encuentran flanqueando al promotor y al terminador en posición enfrentada la una a la otra, con el fin de que tenga lugar la inversión de la parte central y se registre el cambio de estado del dispositivo. Los sitios *attB* y *attP* originales contienen sitios BsaI internos en su secuencia que los hace incompatibles con el sistema de ensamblaje GoldenBraid. Por ello, se realizaron dos sustituciones en cada uno de os sitios *att*, las cuales, no han mostrado efectos adversos en el mecanismo de recombinación en investigaciones previas (Singh, Ghosh, & Hatfull, 2013). Detalles de las mutaciones realizadas disponibles en la **figura S 7**.

- **Dos genes objetivo:** la expresión de estos genes constituye los dos posibles outputs del interruptor. La secuencia codificante (CDS) del gen correspondiente al estado 1 se sitúa inmediatamente aguas abajo del registrador y en la misma orientación que el promotor. La CDS del gen cuya expresión corresponde al estado 2 se sitúa aguas arriba del registrador en posición reversa-complementaria, de manera que su expresión es solo posible tras la inversión del registrador. Para hacer efectiva la expresión de estos genes, es necesario añadir una secuencia de unión al ribosoma (RBS) para el inicio de la traducción aguas arriba de cada CDS, y un terminador tras ella. Para evaluar el funcionamiento del dispositivo se utilizaron los genes fluorescentes: GFP (Estado 1) y DsRed (Estado 2). Como RBS se utilizó el 5' UTR del promotor 35S, y como terminador se usó T35S (<https://gbcloning.upv.es/feature/GB0036/>).

Mediante esta disposición de elementos genéticos, el reportero es capaz de mantener el estado 1 (GFP) hasta la expresión de la integrasa Bxb1, cuando su estado cambiará a 2 (DsRed). Posteriormente, este estado puede ser revertido a 1 (GFP) de nuevo mediante la expresión simultánea de integrasa Bxb1 y Xis. Este reportero es llamado BP por encontrarse en un estado inicial que posee los sitios de recombinación *attB* y *attP*.

La construcción del Reportero BP tuvo lugar mediante el ensamblaje de tres módulos de ADN obtenidos mediante domesticación por PCR de piezas GoldenBraid ya existentes, detalles en el apartado (3.9.1a *Domesticación mediante mutagénesis por PCR*). Estos módulos constituyen nuevas piezas GB de nivel 0 que son posteriormente combinadas en un ensamblaje multipartito para formar el Reportero BP finalizado (detalles en el apartado 3.9.2 *Ensamblaje multipartito*). La construcción de cada uno de los módulos se describe en la **figura 10** y a continuación:

- **Módulo 1:** consiste en la CDS de DsRed junto al RBS y al terminador 35S en orientación reversa-complementaria al resto de los módulos. La domesticación de este módulo se realizó mediante amplificación por PCR de la pieza GB0360 (<https://gbcloning.upv.es/feature/GB0360/>) utilizando los cebadores 1 y 2 de la **tabla 3**.
- **Módulo 2:** consiste en registrador descrito anteriormente: *attB*, el terminador Mtb en posición reversa-complementaria, el promotor 35S y el sitio *attP* en orientación reversa. Su construcción se llevó a cabo en dos reacciones de PCR paralelas que luego fueron ensamblados conjuntamente en el vector pUPD. La primera consistió en la amplificación de la pieza GB0142 del terminador Mtb (<https://gbcloning.org/feature/GB0142/>) utilizando los cebadores 3 y 4 de la **tabla 3**. El cebador 3 es un ultrámero de gran longitud, debido a que contiene el sitio *attB* de 50bp íntegro para su incorporación por PCR en la nueva pieza. La segunda reacción de PCR se realizó sobre la pieza del promotor 35S GB0030 (<https://gbcloning.org/feature/GB0030/>) utilizando los cebadores 5 y 6 de la **tabla 3**. El cebador 6 también es un ultrámero que contiene el sitio *attP* en orientación reversa. Debido a que los sitios *attB* y *attP* originales son incompatibles con GoldenBraid, los sitios introducidos dentro de los oligonucleótidos ultraméricos 3 y 6, fueron modificados mediante dos sustituciones (**Figura S 7**).
- **Módulo 3:** consiste en la CDS de GFP junto al RBS y al terminador 35S. La domesticación de este módulo se realizó mediante amplificación por PCR de la pieza GB0359 (<https://gbcloning.upv.es/feature/GB0359/>) utilizando los cebadores 7 y 8 de la **tabla 3**.

Cada uno de estos módulos son piezas GB nuevas con una gramática propia para facilitar su reutilización en la creación de circuitos complejos (**Figura 10**). Esta gramática tiene la finalidad de permitir intercambiar los módulos y adaptar el dispositivo a diferentes funciones biológicas. En este caso, los módulos 1 y 2 contienen la secuencia codificante de GFP y DsRed respectivamente para comprobar el funcionamiento del interruptor. El objetivo final es la construcción de nuevos módulos siguiendo esta gramática para obtener un nuevo interruptor con el mismo funcionamiento que de lugar a diferentes outputs según su aplicación.

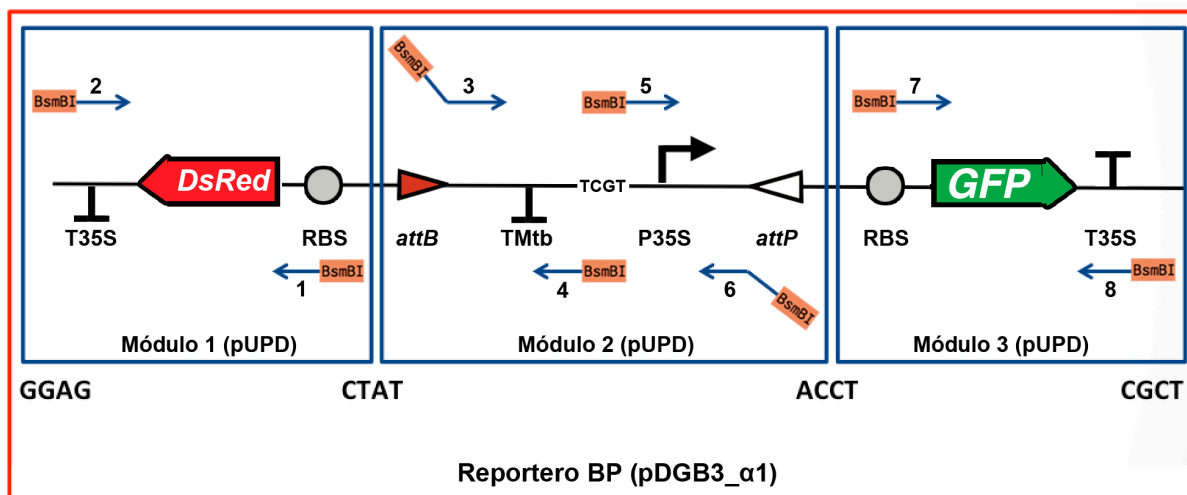


Figura 10. Estructura y construcción del Reportero BP. La construcción del Reportero BP tuvo lugar mediante el ensamblaje de tres módulos de ADN (cuadros azules) obtenidos mediante domesticación por PCR de piezas GoldenBraid ya existentes. El módulo 1 consiste en la región codificante de la proteína fluorescente roja DsRed junto a la secuencia de inicio de traducción (RBS) y el terminador T35S; todo en posición complementaria-reversa al resto de módulos. El módulo 2 consiste en el registrador: attB y attP de la integrasa Bxb1 enfrentados el uno a otro y flanqueando al terminador TMTb (orientación reversa-complementaria) y al promotor P35S. El módulo 3 consiste en la región codificante de la proteína fluorescente verde GFP junto al RBS y el terminador T35S. La domesticación se realizó utilizando los cebadores (flechas azules) enumerados del 1 al 8 en la tabla 3. Todos los cebadores introducen sitios de restricción BsmBI para permitir la inserción de los productos de PCR en el vector domesticador pUPD. Los cebadores 3 y 6 son oligonucleótidos ultraméricos que introducen la secuencia de los atts completa a cada extremo del modulo 2. El módulo 2 está formado por dos productos de PCR que serán unidos en una reacción de digestión BsmBI y ligación utilizando la secuencia TCGT como nexo de unión. Cada uno de los tres módulos es una pieza de nivel 0 (vector pUPD), que son ensambladas conjuntamente en un vector pDGB3_α1 para constituir el Reportero BP funcional completo como una pieza de nivel 1.

Los resultados de la domesticación mediante amplificación por PCR fueron comprobados por electroforesis en gel de agarosa (**Figura 11A**). Posteriormente, se realizó la inserción de los productos de PCR en el vector pUPD, mediante una reacción GB de restricción-ligación. El correcto ensamblaje de las nuevas piezas de comprobó por análisis de restricción (**Figura 11B**) y secuenciación. Finalmente, cada uno de los tres módulos se ensamblaron conjuntamente en el orden establecido dentro de un vector de destino pDGB3_α1, mediante ensamblaje multipartito, cuyo resultado también fue comprobado por análisis de restricción (**Figura 11C**).

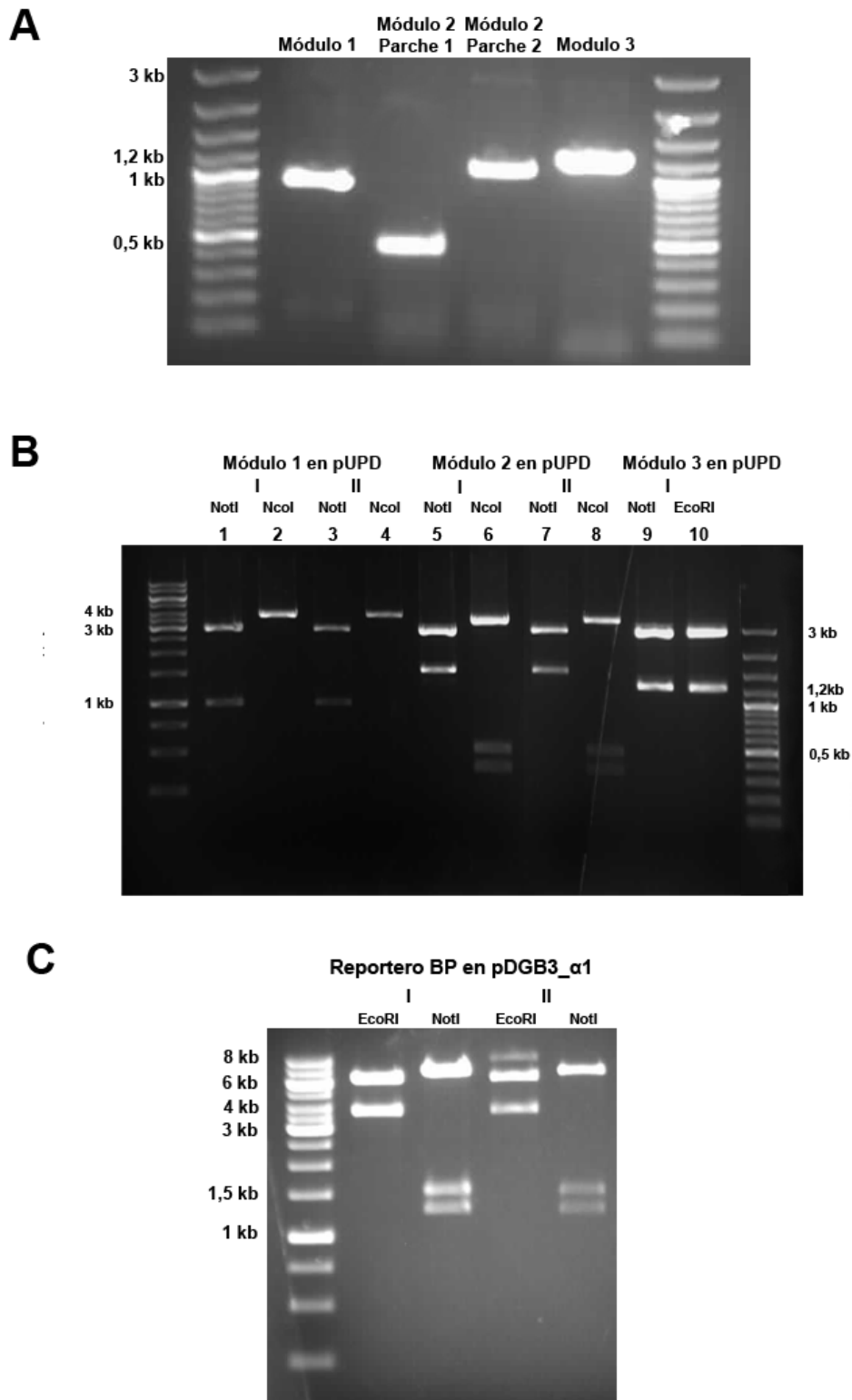


Figura 11. Resultados de electroforesis en gel de agarosa de los pasos de la construcción del Reportero BP. (A) Resultado de la domesticación por PCR de los diferentes módulos del Reportero BP. Bandas esperadas (bp): Módulo 1 (955), Módulo 2 Parche 1 (470), Módulo 2 parche 2 (1102), Módulo 3 (1265). (B) Análisis por restricción de los módulos del Reportero BP en nivel 0 (pUPD). Tamaño de los fragmentos esperados por carril (bp): 1 y 3 (2981, 997), 2 y 4 (3503, 475), 5 y 7 (2981, 1590), 6 y 8 (3646, 525, 390), 9 (2981, 1305) y 10 (2997, 1285). La digestión con NcoI de los carriles 2 y 4 no se llevó a cabo correctamente. (C) Análisis por restricción del Reportero BP en pDGB3_α1. Fragmentos esperados (bp): EcoRI (6326, 3696), NotI (7197, 1532, 1290).

4.1.2. Construcción del generador “set”: integrasa Bxb1

El generador “set” es el elemento encargado de llevar a cabo la activación del interruptor, pasando del estado 1 al 2. Esto tiene lugar mediante inversión por recombinación específica de sitio de la integrasa Bxb1. El diseño y construcción de este elemento se encuentra detallado en las secciones 3.9.1*b* *Domesticación por síntesis de novo* y 3.9.2 *Ensamblaje multipartito*. Brevemente, la secuencia fue diseñada *in silico* compatible con GoldenBraid 2.0. Para mejorar su eficiencia traduccional y evitar posibles efectos adversos durante su clonaje se realizó la optimización de codones para *Nicotiana benthamiana* (**Figura S 4**) y se introdujo un intrón del gen CAT1 de *R. communis* dentro de su secuencia. Tras su síntesis, el fragmento de ADN fue clonado en el vector pUPD para constituir una pieza de nivel 0 y comprobado por análisis de restricción (**Figura 12A**) y secuenciación. Finalmente, se construyó una unidad transcripcional mediante un ensamblaje multipartito, combinando el promotor P35S, CDS de Bxb1 y el terminador T35S en un vector pDGB3_α1. El resultado del proceso de clonaje fue comprobado por análisis de restricción (**Figura 12B**). De esta manera, se construyó el generador “set” como una pieza nivel 1, consistente en la unidad transcripcional de la integrasa Bxb1.

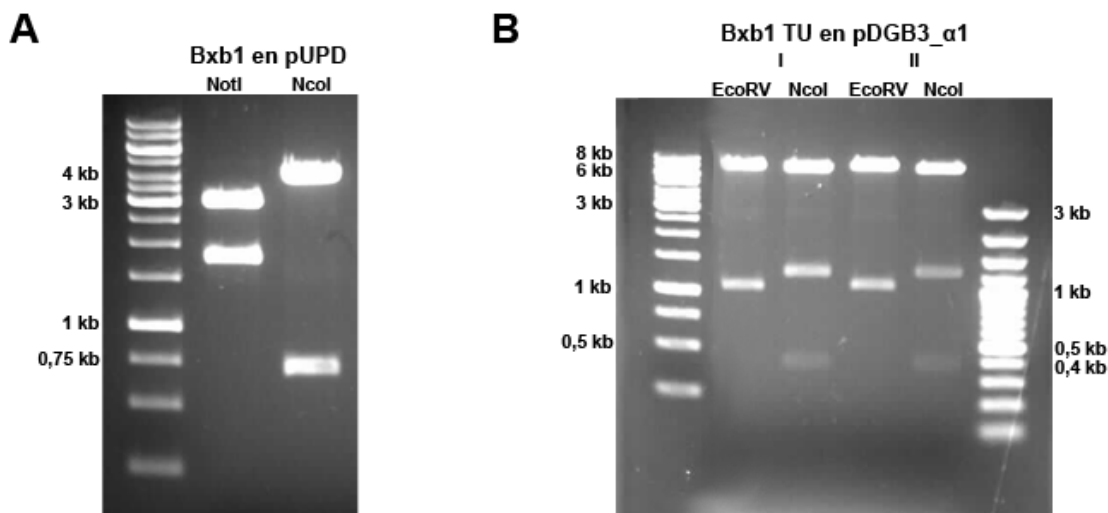


Figura 12. Resultados por análisis de restricción de la construcción del generador “set”. (A) Análisis por restricción de la integrasa bxb1 en nivel 0. Fragmentos esperados (bp): NotI (2981, 1768), NcoI (4031, 710). (B) Análisis por restricción del generador “set” completo (Unidad transcripcional (TU) de la integrasa Bxb1 en el vector de nivel 1 pDGB3_α1). Fragmentos esperados (bp): EcoRV (8231, 1081), NcoI (7646, 1268, 390).

4.1.3. Construcción del generador “reset”: integrasa Bxb1 + Xis

El generador “reset” es el elemento encargado de devolver el interruptor al estado inicial, es decir, permite cambiar el estado del registrador de 2 a 1. Este proceso tiene lugar mediante inversión por recombinación específica de sitio mediada por la integrasa Bxb1 y el factor de direccionalidad de la misma, Xis. La interacción de ambas proteínas les permite reconocer los sitios *attL* y *attR* y llevar a cabo la inversión. La integrasa Bxb1 ya se encuentra en una pieza de nivel 1, no obstante, Xis todavía deber ser domesticada y ensamblada. Los detalles del proceso de su domesticación y ensamblaje se encuentran en las secciones 3.9.1*a* *Domesticación mediante mutagénesis por PCR* y 3.9.2 *Ensamblaje multipartito*, respectivamente. Los resultados de la amplificación por PCR fueron comprobados por electroforesis (**Figura 13A**) y los resultados del ensamblaje en nivel 0 fueron comprobados mediante análisis por restricción y secuenciación (**Figura 13B**). Por último, el ensamblaje multipartito en pDGB3_α2 también fue comprobado mediante análisis por restricción (**Figura 13C**).

Finalmente, una vez la unidad transcripcional de la integrasa Bxb1 y la de Xis se encontraron en nivel 1, ambas se combinaron para constituir el generador “reset” completo en el vector de destino pDGB3_Ω1, cuyo resultado se comprobó por análisis por restricción (**Figura 13D**). Detalles del proceso en la sección 3.9.3 *Ensamblaje binario*.

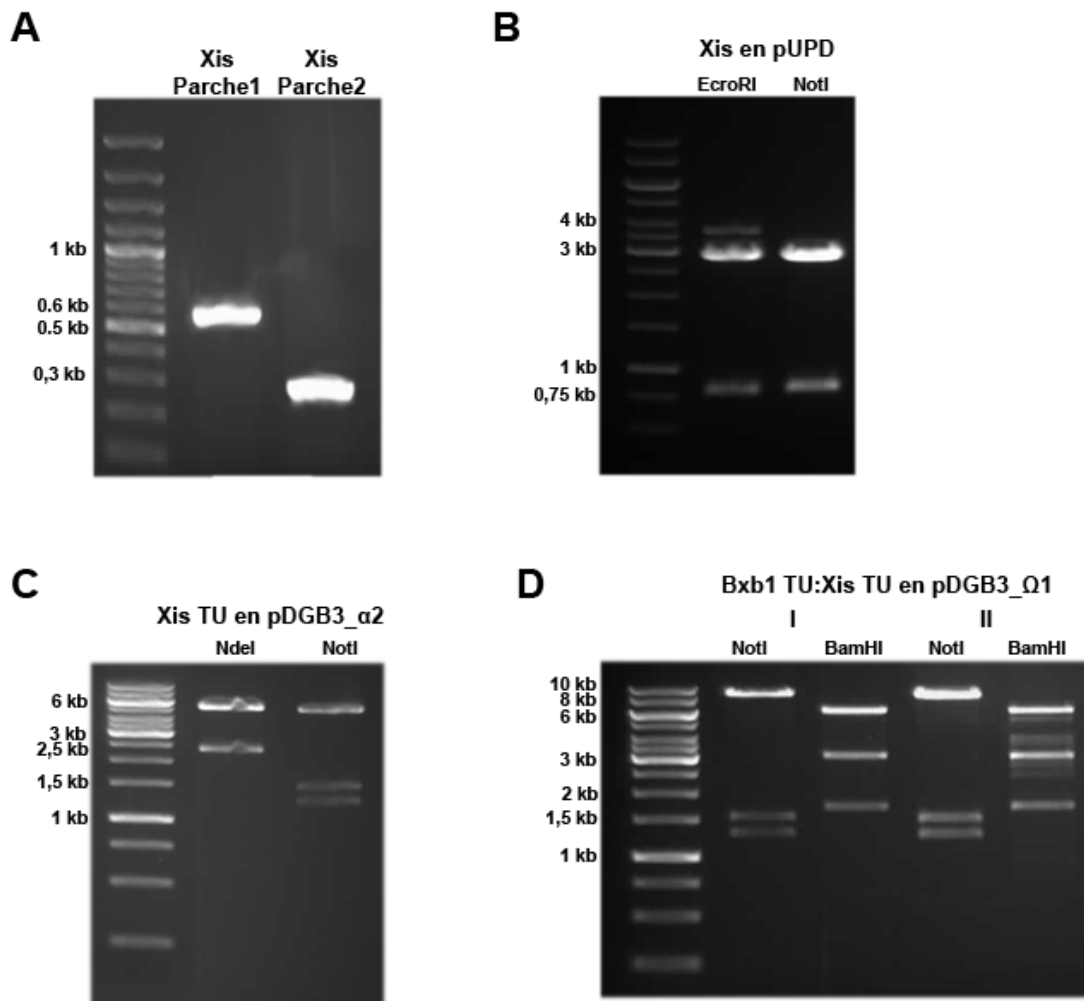


Figura 13. Resultados por análisis de restricción de la construcción del generador “reset”. (A) Resultado de la domesticación por PCR de Xis. Bandas (bp): Parche 1 (573), Parche 2 (254). (B) Análisis por restricción de Xis en nivel 0. Fragmentos esperados (bp): EcoRI (2997, 827), NotI (843, 2981). (C) Análisis por restricción de la unidad transcripcional (TU) de Xis en el vector de nivel 1 pDGB3_α2. Fragmentos esperados (bp): NdeI (5914, 2489), NotI (5581, 1532, 1290). (D) Análisis por restricción del generador “set” completo (Bxb1 TU + Xis TU en el vector pDGB3_Ω1). Fragmentos esperados (bp): NotI (8873, 1532, 1290), BamHI (6674, 3239, 1782).

4.1.4. Construcción del Reportero LR

Con el fin de ensayar el funcionamiento del interruptor en todos sus estados posibles, se construyó el dispositivo correspondiente al Reportero tras haber cambiado al estado 2 por efecto del estímulo “set”, es decir, el estado del Reportero BP con el registrador central invertido por acción de la integrasa Bxb1. A esta construcción se le denominó Reportero LR, debido a que los sitios de recombinación resultantes tras la recombinación son *attL* y *attR*. Para llevar a cabo su construcción, se utilizó el ADN plasmídico resultante de la prueba de funcionamiento del interruptor en *E. coli*, en la cual se consiguió que el interruptor alcanzase el estado 2 mediante inversión por acción de la integrasa Bxb1. Detalles en la sección 4.2 *funcionamiento del nuevo interruptor genético en Escherichia coli*. Debido a que esta miniprep contenía conjuntamente Reporteros BP y LR, los cuales eran imposibles de aislar unos de otros, se decidió amplificar

parte del Reportero LR mediante PCR y luego ensamblarlo modularmente, siguiendo el proceso descrito en la sección 4.1.1 *Construcción del Reportero BP*.

Los cebadores utilizados para la amplificación por PCR quedan recogidos en la **tabla 3** con los números 13,14,15 y 16. El diseño de los cebadores se centró en evitar la posible amplificación del Reportero BP y asegurar que cualquier resultado de amplificación tuviera origen en el Reportero LR. Para ello se realizaron dos PCRs paralelas, cuya amplificación solo es posible si la orientación del Reportero es la correspondiente al LR, i.e. estado 2 (**Figura 14A**). Tras comprobar el resultado de la amplificación (**Figura 14B**), se realizó una ligación con cada uno de los productos de PCR en el vector pUPD que fue comprobada por análisis de restricción (**Figura 14C**) y secuenciación. Finalmente, el Reportero LR fue ensamblado al completo en un vector pDGB3_α1 utilizando los módulos 1 y 3 utilizados previamente en la construcción del Reportero BP (**Figura 14D**).

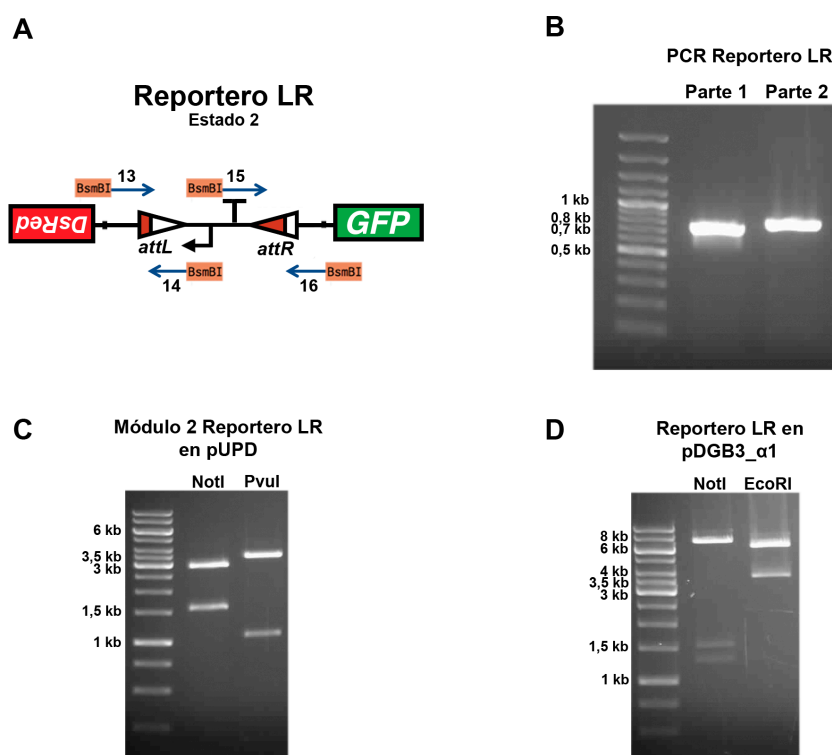


Figura 14. Estructura y resultados de la construcción del Reportero LR. (A) La estructura del Reportero BP consiste en la misma disposición de elementos que el Reportero BP (Figura 10) excepto por la inversión (cambio de orientación) del segmento central. Esta inversión causa como resultado la transformación de los sitios attB y attP previos, en sitios híbridos attL y attR. La construcción del Reportero LR se realizó amplificando por PCR una miniprep que tras la inducción de cambio de estado, contenía tanto construcciones del Reportero BP y el Reportero LR. Para ello se utilizaron los cebadores 13, 14, 15 y 16 de la tabla 3. Se realizaron dos PCR utilizándolas parejas de cebadores 13:14 y 15:16 cuya amplificación corresponde exclusivamente al reportero LR. Nótese que en el caso del Reportero BP, el cual no ha sufrido la inversión, estas parejas de cebadores anillan en la misma hebra, con lo que no tiene lugar la amplificación. Los productos de PCR contienen sitios BsmBI para su inserción en el vector pUPD. (B) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del Reportero LR. Bandas esperadas (bp): Parche 1 (752), Parche 2 (820). (C) Análisis por restricción del Módulo 2 del reportero LR en nivel 0 (pUPD). Fragmentos esperados (bp): NotI (2981, 1590), PvuI (3475, 1096). (D) Análisis por restricción del Reportero LR en pDGB3_α1. Fragmentos esperados (bp): NotI (7197, 1532, 1290), EcoRI (6323, 3696).

4.2. FUNCIONAMIENTO DEL NUEVO INTERRUPTOR GENÉTICO EN *ESCHERICHIA COLI*.

Con el fin de comprobar el correcto funcionamiento del nuevo interruptor genético construido, se realizaron ensayos de funcionalidad en *E. coli*. Los elementos del interruptor están diseñados para su expresión en planta, por ello la evaluación del funcionamiento del interruptor no se realizó observando el efecto de los genes reporteros, si no a través de la detección de eventos de recombinación específica de sitio mediante amplificación por PCR. Para ello se diseñaron cebadores capaces de diferenciar el estado del registrador; son el 17, 18 y 19 de la **tabla 3**. Con estos cebadores se puede realizar dos tipos de test: el **test BP**, que será positivo si el reportero se encuentra en estado 1 (Reportero BP) y negativo en el estado 2 (Reportero LR); y el **test LR** que será negativo en estado 1 (Reportero BP) y positivo en estado 2 (Reportero LR). El cebador 17 es común para ambos test, mientras que el 18 es único para el test LR y el 19 es único para el test BP. Su funcionamiento se basa en que el cebador 17 siempre anilla en la misma posición de una hebra de ADN, mientras que en cada estado del registrador solo uno de los cebadores 18 y 19 ocupará la hebra complementaria dando lugar a amplificación (**Figura 15**). Es decir, en el estado 1, el cebador 18 anilla en la misma hebra que el cebador 17, con lo que no hay amplificación. Sin embargo, 17 y 19 anillan en hebras opuestas, con lo que si que tiene lugar la amplificación (**Figura 15A**). En el estado 2 sucede justo al contrario (**Figura 15B**).

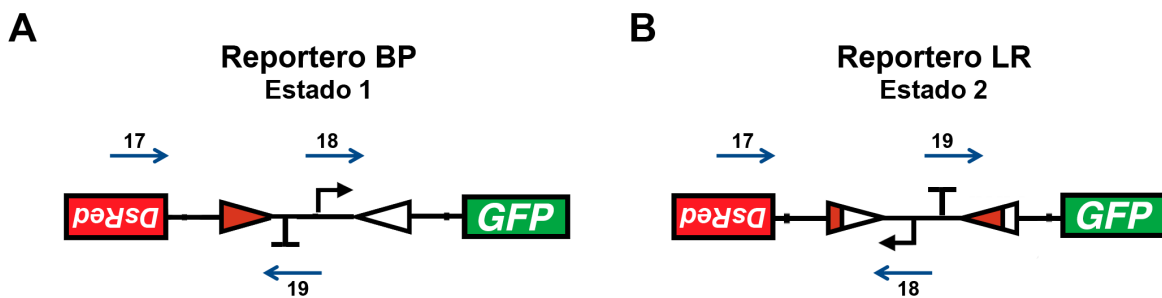


Figura 15. Detalle del funcionamiento del test BP y test LR para comprobar los eventos de recombinación específica de sitio mediada por la integrasa Bxb1. Los cebadores (flechas azules) utilizados para el test BP son 17 y 19 (Tabla 3); para el test LR son 17 y 18 (Tabla 3). (A) En el estado 1 (Reportero BP) el cebador 17 y 18 anillan en la misma hebra sin dar lugar a amplificación por PCR, mientras que 17 y 19 anillan cada uno en una hebra, dando lugar a amplificación. Por lo tanto, el reportero BP es positivo para el test BP, pero negativo para el test LR. (B) En el estado 2 (Reportero LR) el cebador 17 y 18 anillan hebras complementarias, dando lugar a amplificación por PCR; mientras que los cebadores 17 y 19 anillan en la misma hebra, lo que no permite llevar a cabo la amplificación. Por lo tanto, el reportero LR es negativo para el test BP, pero positivo para el test LR.

Con el fin de evaluar el funcionamiento del interruptor en bacteria, se cotransformó *E. coli* con el Reportero BP y con el plásmido “RAD Module G8-C1” (número de acceso: JQ929585). Este segundo plásmido contiene generadores “set” y “reset” específicos de bacteria. El generador “set” expresa la integrasa Bxb1 bajo el promotor bacteriano P_{TET} inducible por tetraciclina, sin embargo, en cepas sin gen de resistencia a tetraciclina, como en este caso, este expresa constitutivamente a un nivel basal, suficiente para este ensayo. Tras el cultivo de células transformadas con ambos plásmidos, se extrajo su ADN plasmídico que fue sometido a los test BP y LR descritos anteriormente. El resultado obtenido fue amplificación tanto en el test BP como en el test LR (**Figura 16**). Este resultado demuestra la existencia de un evento de recombinación específica de sitio inducida por el generador “set” (integrasa Bxb1), probando la correcta construcción del interruptor genético y su funcionamiento en bacteria. Por lo tanto, también queda demostrado que a pesar de haber llevado a cabo la sustitución de dos residuos dentro de las secuencias de reconocimiento de la integrasa Bxb1, *attB* y *attP*, tiene lugar la recombinación específica de sitio en bacteria.

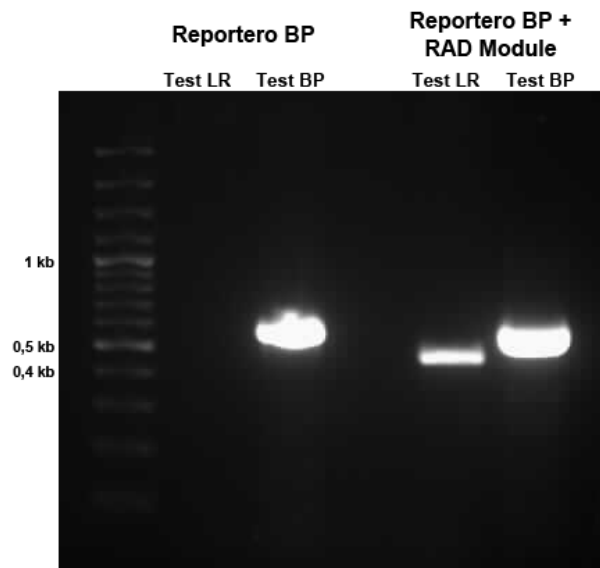


Figura 16. Resultados de la prueba de inducción al cambio del estado 1 (Reportero BP) del nuevo interruptor genético, al estado 2 (reportero LR). Este ensayo se llevo a cabo mediante realización de los test BP y LR de diagnóstico de eventos de recombinación específica por PCR en células de *E. coli* cotransformadas con el reportero BP y "RAD module" (generador "set" bacteriano), y su posterior análisis por electroforesis en gel de agarosa. El tamaño del producto de amplificación del test LR es de 462 bp y el del test BP de 585 bp. El reportero BP fue utilizado como control negativo para el test LR y como control positivo para el test BP. El resultado de la cotransformación muestra amplificación positiva en ambos test. Esto demuestra el cambio de estado 1 (Reportero BP) al estado 2 (Reportero LR).

Por otro lado, con el objetivo de evaluar la reversibilidad del nuevo interruptor genético, se cotransformó *E. coli* con el plásmido del Reportero LR y "RAD Module G8-C1". En esta ocasión se hizo uso del generador "reset" para bacteria presente en el segundo plásmido. Este permite la expresión de la integrasa Bxb1 y Xis bajo el promotor inducible por arabinosa P_{BAD} . Colonias transformadas con ambos plásmidos fueron crecidas en medio con L-arabinosa mientras que otras fueron crecidas sin el inductor, como control negativo. Posteriormente, el ADN plasmídico extraído de estas colonias fue sometido a Test BP y LR. Los resultados a este ensayo muestran el cambio de estado del Reportero LR (Estado 2) al Reportero BP (Estado 1) en células inducidas con L-arabinosa por efecto del generador "reset" bacteriano; mientras que las células no inducidas no muestran un cambio de estado significativo (la tenue amplificación visible puede ser debida a una expresión basal del promotor P_{BAD}). Estos datos prueban que este nuevo interruptor está construido correctamente y es reversible en bacteria (**Figura 17**).

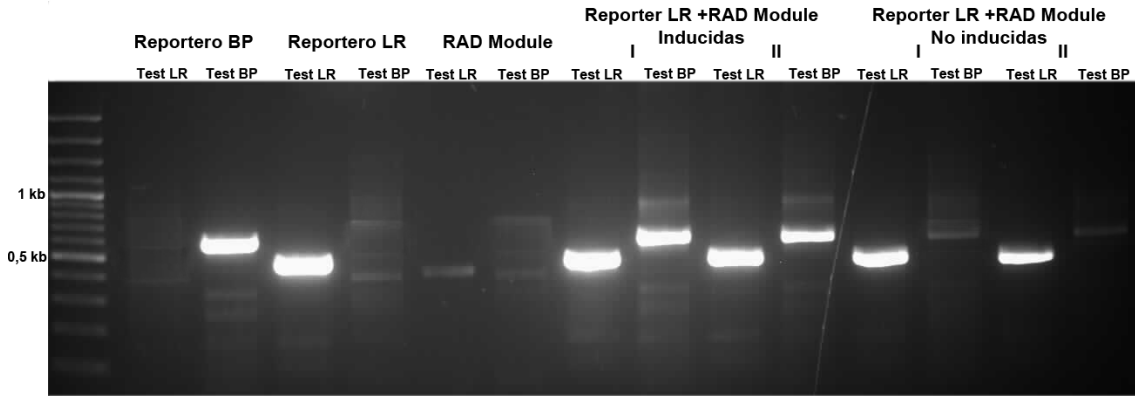


Figura 17. Resultados de la prueba de reversibilidad del nuevo interruptor genético mediante la inducción al cambio del estado 2 (Reportero LR), al estado 1 (reportero BP). El ensayo se realizó mediante la realización de los test BP y LR de diagnóstico de eventos de recombinación específica por PCR, en células de *E. coli* cotransformadas con el Reportero LR y "RAD module" (generador "reset" bacteriano) e inducidas con L-arabinosa. El Reportero BP se utilizó como control negativo del test LR y como positivo del test BP. El reportero LR se utilizó como control positivo del test LR y como negativo del test BP. Los test sobre "RAD Module" se realizaron para comprobar la ausencia de amplificación debida a este plásmido. Las células cotransformadas inducidas con L-arabinosa muestran amplificación mediante ambos test, mientras que las no inducidas solo muestra amplificación en el test LR. Esto demuestra la presencia del cambio de estado del Reportero LR, demostrando la reversibilidad del nuevo interruptor genético.

4.3. FUNCIONAMIENTO DEL NUEVO INTERRUPTOR GENÉTICO MEDIANTE EXPRESIÓN TRANSITORIA EN *Nicotiana benthamiana*.

La evaluación del funcionamiento del interruptor genético en planta se realizó mediante expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* (detalles del proceso descritos en la sección 3.10 *Transformación transitoria de Nicotiana benthamiana*). Con este fin, inicialmente se agroinfiltró únicamente el Reportero BP para evaluar la expresión correcta del gen de GFP, validando así la correcta construcción del interruptor genético. La fluorescencia en el citoplasma celular en el tejidos de hoja se observó mediante microscopía confocal. Los resultados obtenidos fueron positivos, mostrando una expresión de GFP alta, uniforme y estable (Datos no mostrados. Una muestra del resultado observable en la **Figura 18A izquierda**). Plantas agroinfiltradas con construcciones de GFP y DsRed fueron utilizadas como control durante todos los ensayos para comprobar que la fluorescencia detectada es efectivamente debido a estas proteínas.

Una vez comprobada la capacidad del interruptor de dar lugar a un output identificable en su estado inicial, expresión de GFP, se ensayó la inducción al cambio de estado del interruptor en planta, mediante la coinfiltración del Reportero BP y el generador "set" (TU de la integrasa Bxb1). Este cambio de estado sería identificable debido a la expresión de la proteína fluorescente roja DsRed. Tras el análisis del tejido foliar por microscopía confocal de fluorescencia se observaron resultados prometedores. Se localizaron eventos puntuales de fluorescencia roja dispersos por el tejido (**Figura 18A**), demostrando el cambio del estado 1 (GFP) al estado 2 (DsRed). Algunas de ellas mostraban expresión únicamente de DsRed (**Figura 18B**), mientras que otras mostraban expresión de ambas proteínas fluorescentes (**Figura 18C**). Esto es debido a que algunos de los T-DNA con el Reportero BP sufren el cambio de estado antes de comenzar su expresión, dando lugar únicamente a expresión de DsRed; mientras que en otros, el cambio de estado es producido posteriormente, produciéndose la expresión de GFP inicialmente y de DsRed a continuación, acumulando ambas proteínas. Estos resultados prueban el correcto funcionamiento del cambio de estado del nuevo interruptor genético en planta.

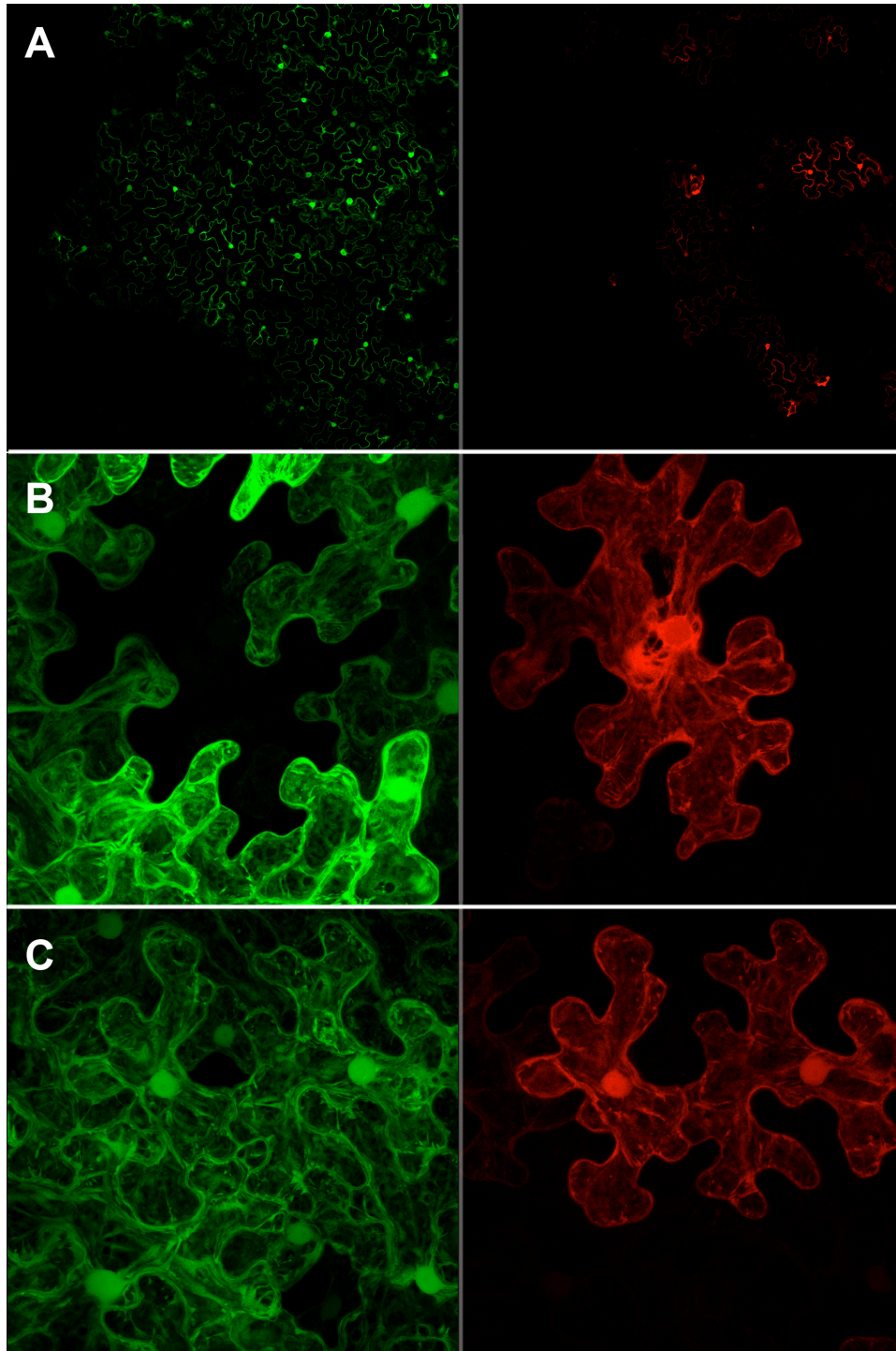


Figura 18. Inducción al cambio de estado del nuevo interruptor genético por transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana*. La coinfiltración de hojas de *N. benthamiana* con el reportero BP y el generador "set" (integrasa Bxb1) producen fluorescencia verde por expresión de GFP en el citoplasma de células donde no ha tenido lugar el cambio de estado del interruptor, mientras que células donde si ha tenido lugar, se observa fluorescencia roja por efecto de la expresión de DsRed. La fluorescencia fue analizada por microscopía confocal de fluorescencia. (A) La expresión transitoria del Reportero BP muestra una expresión fuerte y uniforme del gen output GFP (izquierda). El funcionamiento del interruptor es observable en eventos de cambio de estado que dan lugar a fluorescencia roja (derecha). Sin embargo, estos eventos se encuentran dispersos en el tejido foliar, mostrando baja uniformidad en el cambio de estado. (B) Proyección 3D de células de *N. benthamiana* agroinfiltradas con el interruptor genético. La célula central únicamente muestra fluorescencia roja (derecha), probando que el cambio de estado del interruptor ha sido inducido en una frase muy temprana tras la infiltración. (C) Proyección 3D de células de *N. benthamiana* agroinfiltradas con el interruptor genético. Las células centrales muestran tanto fluorescencia verde (izquierda) como roja (derecha), probando que ha tenido lugar el cambio de estado del interruptor de manera tardía tras la infiltración.

Posteriormente, se comprobó el funcionamiento del Reportero LR en planta, con el fin de confirmar la capacidad del interruptor de dar lugar a dos outputs diferentes según su estado; siendo en este caso expresión de DsRed. Los resultados obtenidos fueron positivos, siendo visible una expresión elevada, uniforme y estable de DsRed (**Figura 19A izquierda**). Finalmente, se comprobó la reversibilidad del interruptor, es decir, la capacidad de regresar del estado 2 al estado 1 tras la inducción del generador “reset”. Para ello se coinfiltró el Reportero LR junto al generador “reset” (TU de la integrasa Bxb1 + TU de Xis). Por lo tanto, los resultados esperados son un cambio de expresión de DsRed a GFP tras una recombinación efectiva. Los resultados obtenidos muestran eventos puntuales de cambio de estado y expresión de GFP, probando la reversibilidad funcional del interruptor genético (**Figura 19A y B**). Como en el caso anterior, algunas células expresan GFP únicamente debido al cambio de estado temprano (**Figura 19B 1**), mientras que otras expresan ambas proteínas fluorescentes de manera simultánea, debido a una inducción de cambio de estado más tardía (**Figura 19B 2 y 3**).

Ambos ensayos, consiguen probar el funcionamiento completo del nuevo interruptor genético en planta. Demuestran que el estado inicial 1 (GFP) puede ser modificado por acción del generador “set” llegando al estado 2 (DsRed). Y posteriormente, este cambio puede ser revertido por acción del generador “reset”, volviendo al estado inicial 1 (GFP).

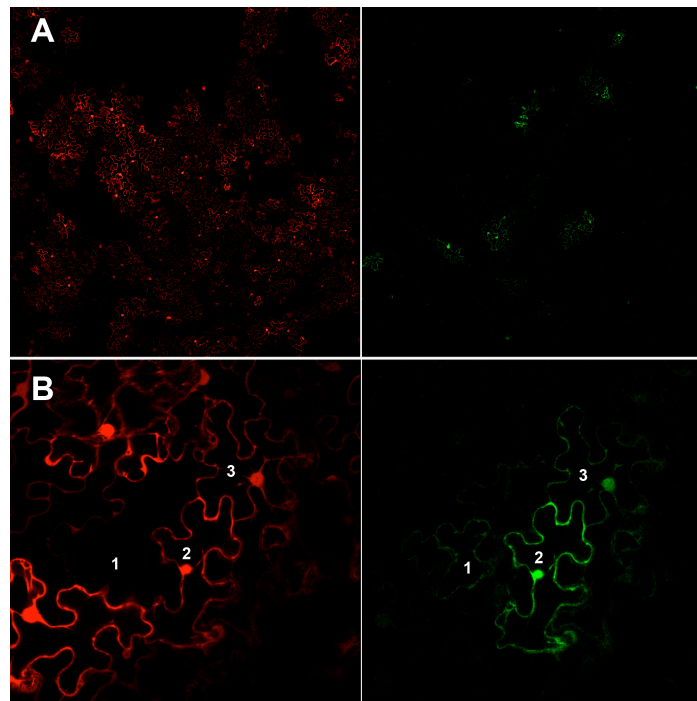


Figura 19. Análisis de la reversibilidad del nuevo interruptor genético por transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana*. La coinfiltración de hojas de *N. benthamiana* con el reportero LR y el generador “reset” (integrasa Bxb1 + Xis) producen fluorescencia roja por expresión de DsRed en el citoplasma de células donde no ha tenido lugar el cambio de estado del Reportero LR, mientras que células donde si ha tenido lugar, se observa fluorescencia verde por efecto de la expresión de GFP. La fluorescencia de las imágenes fue detectada mediante microscopía confocal de fluorescencia. (A) La expresión transitoria del Reportero LR permite observar elevada fluorescencia roja, debido a la expresión fuerte y uniforme de DsRed (izquierda). Este ensayo también muestra el funcionamiento de la reversibilidad del interruptor, debido a eventos de cambio de estado del Reportero LR identificables por expresión de GFP (derecha). Sin embargo, estos eventos se encuentran dispersos en el tejido foliar, mostrando baja uniformidad en el cambio de estado. (B) Detalle de células donde ha tenido el cambio de estado del Reportero LR, resultando en la expresión de GFP. Existen células en las que se observa únicamente fluorescencia verde, debido a una inducción temprana del cambio de estado (1). En otras se observa fluorescencia tanto de GFP como DsRed, debido a una inducción más tardía (2 y 3).

4.4. TRANSFORMACIÓN ESTABLE DE LOS ELEMENTOS GÉNICOS DEL NUEVO INTERRUPTOR GENÉTICO EN *Nicotiana benthamiana*.

En vista del correcto funcionamiento del interruptor observado mediante expresión transitoria en plantas, se propuso la evaluación de su funcionamiento en plantas transformadas establemente. Este ensayo permitirá analizar el funcionamiento del interruptor sin alteraciones causadas por el elevado número de copias de T-DNA y la alta expresión proteica característica de la expresión transitoria. La transformación estable, basada en la inserción de una única copia del elemento génico de interés, permitirá evaluar el funcionamiento del interruptor de una manera más fiable. Para ello, se planteó el proceso experimental de inserción estable del Reportero BP dentro del genoma de *N. benthamiana* mediada por *A. tumefaciens*. Sin embargo, se requiere un marcador de selección para identificar las plantas transformadas correctamente. Para ello se utilizó el gen de resistencia a kanamicina NptII (<https://gbcloning.org/feature/GB0184/>), que se combinó junto al Reportero BP mediante un ensamblaje binario GoldenBraid. También se transformaron establemente construcciones con expresión constitutiva de GFP y DsRed y el gen de resistencia a kanamicina NptII, como controles.

Tras aproximadamente 20 días, los discos de hoja transformados comenzaron a desarrollar callos. Estos callos fueron examinados bajo macroscopio estereoscópico de fluorescencia, observándose una llamativa fluorescencia verde en los callos transformados con GFP y el Reportero BP (**Figura 20A izquierda**), mientras que los transformantes con DsRed exhibían fluorescencia roja (**Figura 20A derecha**). Tras aproximadamente 35 días, los callos comenzaron a producir brotes del tamaño adecuado para su escisión y siembra. Estas plántulas también exhibían fluorescencia verde o roja en cada caso (**Figura 20B**).

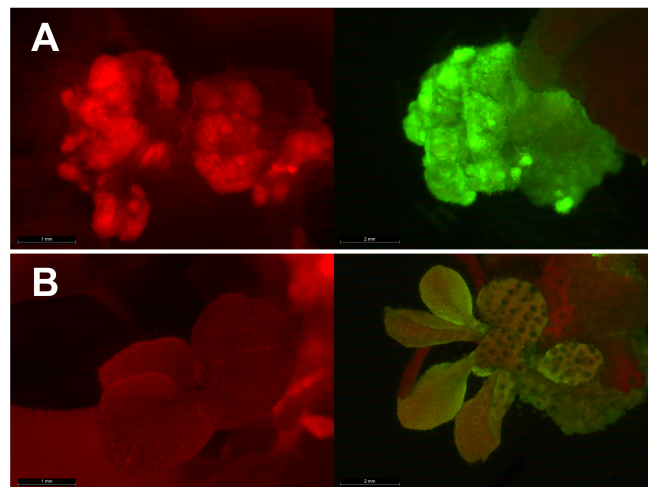


Figura 20. Detección de fluorescencia emitida por plantas transformadas establemente mediante *Agrobacterium tumefaciens*, con el Reportero BP y una construcción control con DsRed de expresión constitutiva. (A) Callos formados a partir de discos de hoja de *N. benthamiana* transformados establemente. Los callos transformados con el Reportero BP muestran una fuerte fluorescencia verde debido a la expresión de GFP (izquierda). Los callos transformados con una construcción con DsRed de expresión constitutiva muestran una fuerte fluorescencia roja (derecha). (B) Plántulas transformadas establemente obtenidas a partir de los callos de *N. benthamiana*. Las plántulas transformadas con el Reportero BP muestran fluorescencia verde elevada a causa de la expresión de GFP (izquierda). Las plántulas transformadas con una construcción con DsRed de expresión constitutiva muestran una fuerte fluorescencia roja (derecha).

Por último, con el fin de comprobar el funcionamiento del interruptor de manera estable en planta, se llevó a cabo la transformación transitoria del generador “set” (i.e. la TU de la integrasa Bxb1) en hojas individuales de plántulas de aproximadamente 50 días desde su escisión del callo. De esta manera, la integrasa expresada transitoriamente puede inducir un cambio de estado en el Reportero presente en el genoma de la planta. El ensayo se realizó por agroinfiltración al vacío, con el fin de evitar daños a las jóvenes hojas. Tras el ensayo, la

fluorescencia de las hojas fue examinada mediante microscopía confocal. Los resultados mostraron una fuerte expresión de GFP a lo largo de cada hoja, sin embargo, no se observaron células expresando DsRed resultantes del cambio de estado (**Figura 21**).

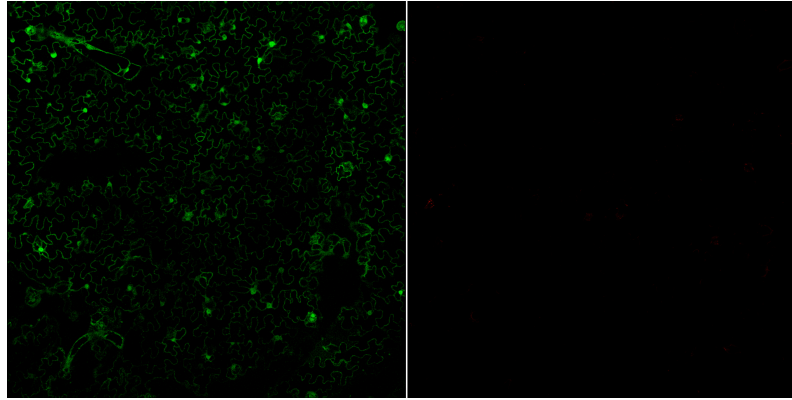


Figura 21. Ensayo de cambio de estado del interruptor genético mediante expresión transitoria del generador “set” en hojas de *N. benthamiana* previamente transformada establemente con el Reportero BP. La inserción genómica estable del reportero BP muestra una expresión de GFP elevada (izquierda), sin embargo, no se observa fluorescencia roja debida a la expresión de DsRed como resultado del cambio de estado del Reportero del interruptor genético.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha llevado a cabo el diseño y construcción de un nuevo interruptor genético bistable y reversible para Biología Sintética de Plantas, basado en recombinación específica de sitio de la integrasa Bxb1. El funcionamiento de este interruptor es análogo al conocido elemento electrónico denominado “latch”, lo que le aporta ciertas características que lo hacen de gran valor para una gran cantidad de aplicaciones biotecnológicas. Su característica principal es la memoria estable. Consiste en la capacidad de mantener un estado determinado indefinidamente hasta la llegada de un estímulo que induzca un cambio en el mismo. Estos estímulos se denominan “set” o “reset” y permiten llevar a cabo el cambio de estado de manera reversible. De esta manera, el interruptor tiene dos estados posibles y cada uno tiene como resultado un output, que puede ser elegido según la aplicación final del interruptor. Por este motivo, el diseño modular y estándar de los elementos del mismo es esencial para permitir su uso en un gran número de situaciones. Para ello, este interruptor genético se construyó siguiendo las reglas de ensamblaje del sistema GoldenBraid 2.0 y se creó una gramática propia, que permite el uso de piezas GB adaptadas como posibles outputs del dispositivo. Así pues, en este trabajo se ha llevado a cabo la creación de un nuevo interruptor genético modular cuyos outputs pueden ser definidos e intercambiados a conveniencia.

En este trabajo también se ha realizado la evaluación del funcionamiento de este interruptor genético tanto en bacterias (*E. coli*) como en plantas (*N. benthamiana*). Inicialmente, se comprobó el funcionamiento de la construcción sin inducir ningún cambio de estado en planta. Los resultados muestran una expresión abundante y uniforme de GFP en el estado 1 y de DsRed en el estado 2. Esto prueba que el interruptor es capaz de llevar a cabo la expresión elevada, uniforme y estable de determinadas proteínas como output de cada uno de sus dos estados. En vista de los anteriores resultados, se ensayó la capacidad de inducir y revertir el cambio de estado del interruptor tanto en bacteria como en planta. Los resultados confirman el comportamiento esperado de cambio de estado y reversibilidad de este interruptor. Se produce un cambio de estado inicial inducido por el generador “set” (integrasa Bxb1) y se produce la vuelta al estado inicial por acción del generador “reset” (integrasa Bxb1+Xis). Estos cambios han sido detectados por PCR en bacteria y cambios en la fluorescencia de las células transformadas en planta. Estos cambios en la fluorescencia, tienen lugar al inducir el cambio de estado 1 (verde) al estado 2 (rojo) y viceversa. Por lo tanto, estos resultados también demuestran la correcta construcción y funcionamiento en planta del resto de elementos del interruptor: los generadores “set” y “reset”.

Sin embargo, los resultados muestran una baja eficiencia de los eventos de cambio de estado, es decir, baja eficiencia de los eventos de recombinación específica de sitio, que son detectables de manera no uniforme en el tejido foliar. Por otro lado, las células donde sí ha tenido lugar el cambio de estado, muestran diferencias entre sí. Algunas de ellas expresan únicamente la proteína fluorescente esperada tras el cambio, mientras que otras expresan ambas. Esto es posiblemente debido a que la inducción al cambio de estado ha tenido lugar de manera temprana en las primeras, pero de manera tardía en las otras. Otro posible factor que puede explicar la aparición de estas subpoblaciones es el distinto número de copias de la construcción reportera que se cotransforman en una misma célula. Así, cuando más de un T-DNA con la construcción reportera penetra en una misma célula, es posible que sólo algunos de ellos sufran la inversión, dando lugar a células de fluorescencia mixta. En cambio cuando se da la presencia de un solo T-DNA reportero, es más probable que una inversión temprana de lugar a una célula monocromática.

La baja uniformidad espacio-temporal de la inducción al cambio de estado puede tener origen a su vez en diferentes factores. Es posible que sea debida a una baja eficiencia expresión

de los generadores “set” o “reset” o a una baja eficiencia de su transporte al núcleo. Pese a que estudios previos han probado el funcionamiento de esta integrasa en el núcleo de células vegetales (Thomson et al., 2012), es posible que la adición de una señal de localización nuclear en su C-terminal pueda aumentar su eficiencia (Blechl, Lin, Shao, Thilmony, & Thomson, 2012). También es posible que, al igual que en el caso del reportador, la heterogeneidad en el número de copias de T-DNA de la integrasa en las diferentes células agroinfiltradas contribuya a la heterogeneidad de la distribución de la fluorescencia. Esto puede ser solucionado creando una nueva construcción con el reportero y uno de los dos generadores conjuntamente.

Otro factor a tener en cuenta son a las sustituciones llevadas a cabo dentro de las secuencias de recombinación específica de sitio *attB* y *attP*, para hacerlas compatibles con GoldenBraid. Pese a que previamente se ha comprobado su neutralidad en ensayos *in vitro* (Singh et al., 2013), y en este trabajo se ha comprobado su funcionamiento en *E. coli*, existe la posibilidad de que estas mutaciones tengan algún efecto negativo en el funcionamiento de la recombinación en planta. Por lo tanto, para la optimización del circuito se requiere el ajuste de todos sus componentes.

En este trabajo también se llevó a cabo la transformación estable del interruptor en estado 1 en *N. benthamiana*. Los resultados muestran el correcto funcionamiento del reportero, que muestra altos niveles de expresión del gen output (GFP) del dispositivo. Dado que la inserción aleatoria puede dar lugar a diferencias en la expresión génica, un objetivo futuro es localizar los sitios de integración óptimos y llevar a cabo su inserción con herramientas de modificación genómica dirigida, como las repeticiones cortas palindrómicas aglomeradas interespaciadas regularmente (CRISPR) (Belhaj, Chaparro-Garcia, Kamoun, & Nekrasov, 2013). Sin embargo, las pruebas preliminares de inducción del cambio mediante expresión transitoria del generador “set” en las hojas de las plantas previamente transformadas con el reportero, no han dado resultados positivos. Una posible razón es que las hojas utilizadas eran demasiado jóvenes. Es sabido que la agroinfiltración es muy poco eficiente en hojas en crecimiento y de hecho las hojas ensayadas en este experimento sufrieron daño significativo durante el proceso de infiltración y análisis. Sin embargo hasta el momento de la presentación de este trabajo solo se disponía de este tipo material vegetal, puesto que las plantas transformadas establemente están todavía *in vitro*. Por ello, debido a que este experimento es clave para determinar los detalles del funcionamiento del interruptor, este será repetido cuando las plantas transgénicas sean lo suficientemente maduras.

Este trabajo da los primeros pasos en la creación del primer interruptor genético bistable y reversible de plantas, basado en recombinación específica de sitio. Pese a la necesidad de seguir evaluando su funcionamiento y optimizando sus elementos, los resultados preliminares demuestran la funcionalidad y reversibilidad de este interruptor, con lo que se espera que posteriores estudios permitan utilizarlo como elemento de regulación espacio-temporal de la expresión génica. La funcionalidad final de este interruptor permitirá la elección de los outputs deseados, así como la elección del estímulo externo necesario para activar y revertir el interruptor. Estos es posible utilizando elementos génicos inducibles (i.e. promotores inducibles), acoplados a los generadores “set” y “reset”. De esta manera, es posible combinar la capacidad de activación de la expresión génica, rápida y estable, del mecanismo de recombinación específica de sitio, a la facilidad técnica de utilizar estímulos externos químicos, térmicos o lumínicos. Todo ello, introduciendo cada uno de sus elementos de manera estable en un lugar del genoma de la planta que permita optimizar su funcionamiento. Por lo tanto, este mecanismo permitirá la regulación de genes heterólogos, rutas metabólicas completas e incluso sistemas de regulación secundarios, pudiendo ser esta activada o desactivada tras la utilización de un inductor externo durante una corta fracción de tiempo, sin la necesidad de mantener este inductor. Algunos ejemplos de estas futuras aplicaciones pueden ser el control del desarrollo de especies vegetales, como la inducción simultánea de la floración en un campo de cultivo; producción de enzimas con actividad catalítica nociva para la propia planta; activación de

sistemas vegetales de control de plagas mediante la producción de algún compuesto volátil solo cuando llegue la época de plagas; o incluso, la activación y desactivación de un futuro alumbrado público basado en plantas luminiscentes.

Este nuevo interruptor se plantea como una eficaz herramienta para el control de la expresión génica en biotecnología de plantas y su desarrollo ofrece grandes posibilidades futuras. No solo permitirá el estrecho control de su expresión, si no la activación o desactivación de la misma de una manera rápida, eficaz y reversible. Esto, sumado a su diseño modular GoldenBraid que lo hace reutilizable, adaptable y muy sencillo de manipular, convierten a este interruptor en una eficaz herramienta para la diseñados por Biología Sintética de Plantas.

6. CONCLUSIONES

1. Un nuevo interruptor genético biestable y reversible basado en recombinación específica de sitio, para Biología Sintética de plantas fue construido. Este se encuentra caracterizado por un diseño modular y estándar, compatible con el sistema de ensamblaje GoldenBraid 2.0. Este diseño permite la reutilización y adaptación sencilla de sus elementos a cualquier tipo de aplicación biotecnológica en plantas.
2. El nuevo interruptor genético es funcional en bacteria (*E. coli*) y planta (*N. benthamiana*). Los ensayos realizados mediante expresión transitoria en planta revelan la capacidad del interruptor de expresar dos proteínas diferentes según el estado del mismo. También se demostró la eficacia de la inducción al cambio de estado y la reversibilidad del mismo en planta. No obstante, la eficiencia de ambos eventos se observó limitada, mostrando la necesidad de optimización del dispositivo.
3. Se realizó la transformación estable de plantas de *N. benthamiana* con el interruptor genético. Estas mostraron el correcto funcionamiento del dispositivo insertado establemente en el genoma de la planta. Sin embargo, los ensayos preliminares de cambio de estado no mostraron ningún resultado concluyente.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AMIRSADEGHI, S., McDONALD, A. E., & VANLERBERGHE, G. C. (2007). A glucocorticoid-inducible gene expression system can cause growth defects in tobacco. *Planta*, 226(2), 453–63.
- ANDERSON, J. C., CLARKE, E. J., ARKIN, A. P., & VOIGT, C. A. (2006). Environmentally controlled invasion of cancer cells by engineered bacteria. *Journal of Molecular Biology*, 355(4), 619–627.
- ANNALURU, N., MULLER, H., MITCHELL, L. A., RAMALINGAM, S., STRACQUADANIO, G., RICHARDSON, S. M., ... CHANDRASEGARAN, S. (2014). Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6179), 55–8.
- ANTUNES, M. S., MOREY, K. J., SMITH, J. J., ALBRECHT, K. D., BOWEN, T. A., ZDUNEK, J. K., ... MEDFORD, J. I. (2011). Programmable ligand detection system in plants through a synthetic signal transduction pathway. *PLoS One*, 6(1), e16292.
- AOYAMA, T., & CHUA, N. H. (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 11(3), 605–612.
- BARON, U., GOSSSEN, M., & BUJARD, H. (1997). Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Research*, 25(14), 2723–9.
- BATES, S. L., CAO, J., ZHAO, J.-Z., EARLE, E. D., ROUSH, R. T., & SHELTON, A. M. (2005). Evaluation of a chemically inducible promoter for developing a within-plant refuge for resistance management. *Journal of Economic Entomology*, 98(6), 2188–2194.
- BELHAJ, K., CHAPARRO-GARCIA, A., KAMOUN, S., & NEKRASOV, V. (2013). Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods*, 9(1), 39.
- BLECHL, A., LIN, J., SHAO, M., THILMONY, R., & THOMSON, J. (2012). The Bxb1 Recombinase Mediates Site-Specific Deletion in Transgenic Wheat. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30(6), 1357–1366.
- BONNET, J., & ENDY, D. (2013). Switches, Switches, Every Where, In Any Drop We Drink. *Molecular Cell*, 49(2), 232–233.
- BONNET, J., SUBSOONTORN, P., & ENDY, D. (2012). Rewritable digital data storage in live cells via engineered control of recombination directionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(23), 8884–8889.
- BONNET, J., YIN, P., ORTIZ, M. E., SUBSOONTORN, P., & ENDY, D. (2013). Amplifying genetic logic gates. *Science (New York, N.Y.)*, 340(6132), 599–603.
- BROACH, J. R., GUARASCIO, V. R., & JAYARAM, M. (1982). Recombination within the yeast plasmid 2 μ circle is site-specific. *Cell*, 29(1), 227–234.
- BROUSSARD, G. W., & HATFULL, G. F. (2013). Evolution of genetic switch complexity. *Bacteriophage*, 3(1), e24186.
- CADDICK, M. X., GREENLAND, A. J., JEPSON, I., KRAUSE, K. P., QU, N., RIDDELL, K. V., ... TOMSETT, A. B. (1998). An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nature Biotechnology*, 16(2), 177–80.
- CARLSON, R. (2009). The changing economics of DNA synthesis. *Nature Biotechnology*, 27(12), 1091–4.
- CAZZONELLI, C. I., & VELTEN, J. (2003). Construction and testing of an intron-containing luciferase reporter gene from *Renilla reniformis*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21(3), 271–280.
- CHURCH, G., & REGIS, E. (2012). *Regenesis: How Synthetic Biology Will Reinvent Nature and Ourselves*. New York: Basic Books.
- COLLINS, J. (2012). Synthetic Biology: Bits and pieces come to life. *Nature*, 483(7387), S8–10.
- ELOWITZ, M. B., & LEIBLER, S. (2000). A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, 403(6767), 335–8.
- ENDY, D. (2005). Foundations for engineering biology. *Nature*, 438(7067), 449–53.
- ENGLER, C., GRUETZNER, R., KANDZIA, R., & MARILLONNET, S. (2009). Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. *PLoS One*, 4(5), e5553.

- FELENBOK, B. (1991). The ethanol utilization regulon of *Aspergillus nidulans*: the alcA-alcR system as a tool for the expression of recombinant proteins. *Journal of Biotechnology*, 17(1), 11–17.
- GAJ, T., SIRK, S. J., & BARBAS, C. F. (2014). Expanding the scope of site-specific recombinases for genetic and metabolic engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(1), 1–15.
- GANCEDO, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(2), 334–61.
- GARDNER, T. S., CANTOR, C. R., & COLLINS, J. J. (2000). Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*, 403(6767), 339–42.
- GELVIN, S. B. (2003). *Agrobacterium* -Mediated Plant Transformation : the Biology behind the *Agrobacterium* -Mediated Plant Transformation : the Biology behind the “ Gene-Jockeying ” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16–37.
- GHOSH, P., PANNUNZIO, N. R., HATFULL, G. F., & GOTTESMAN, M. (2005). Synapsis in phage Bxb1 integration: Selection mechanism for the correct pair of recombination sites. *Journal of Molecular Biology*, 349(2), 331–348.
- GHOSH, P., WASIL, L. R., & HATFULL, G. F. (2006). Control of phage Bxb1 excision by a novel recombination directionality factor. *PLoS Biology*, 4(6), 0964–0974.
- GIBSON, D. G., BENDERS, G. A., ANDREWS-PFANNKUCH, C., DENISOVA, E. A., BADEN-TILLSON, H., ZAVERI, J., ... SMITH, H. O. (2008). Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5867), 1215–20.
- GILCHREST, B. A., & ELLER, M. S. (1999). DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses. *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research*, 4(1), 35–40.
- GRINDLEY, N. D. F., WHITESON, K. L., & RICE, P. A. (2006). Mechanisms of site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry*, 75, 567–605.
- HAM, T. S., LEE, S. K., KEASLING, J. D., & ARKIN, A. P. (2008). Design and construction of a double inversion recombination switch for heritable sequential genetic memory. *PLoS ONE*, 3(7), 1–9.
- HASELOFF, J., & AJIOKA, J. (2009). Synthetic biology: history, challenges and prospects. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 6 Suppl 4(Suppl_4), S389–91.
- HORSCH, R. B. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science (New York, N.Y.)*, 227(4691), 1229–31.
- HORSCH, R. B., & KLEE, H. J. (1986). Rapid assay of foreign gene expression in leaf discs transformed by *Agrobacterium tumefaciens*: Role of T-DNA borders in the transfer process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(12), 4428–32.
- KAPILA, J., DE RYCKE, R., VAN MONTAGU, M., & ANGENON, G. (1997). An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*, 122(1), 101–108.
- KERAVALA, A., GROTH, A. C., JARRAHIAN, S., THYAGARAJAN, B., HOYT, J. J., KIRBY, P. J., & CALOS, M. P. (2006). A diversity of serine phage integrases mediate site-specific recombination in mammalian cells. *Molecular Genetics and Genomics*, 276(2), 135–146.
- KIM, A. I., GHOSH, P., AARON, M. A., BIBB, L. A., JAIN, S., & HATFULL, G. F. (2003). Mycobacteriophage Bxb1 integrates into the *Mycobacterium smegmatis* groEL1 gene. *Molecular Microbiology*, 50(2), 463–473.
- KLOSE, H., GÜNL, M., USADEL, B., FISCHER, R., & COMMANDEUR, U. (2013). Ethanol inducible expression of a mesophilic cellulase avoids adverse effects on plant development. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 53.
- KNIGHT, T. (2003). Idempotent Vector Design for Standard Assembly of Biobricks. MIT Artificial Intelligence Laboratory; MIT Synthetic Biology Working Group.
- LIU, W., MAZAREI, M., RUDIS, M. R., FETHE, M. H., PENG, Y., MILLWOOD, R. J., ... STEWART, C. N. (2013). Bacterial pathogen phyto-sensing in transgenic tobacco and Arabidopsis plants. *Plant Biotechnology Journal*, 11(1), 43–52.
- LIU, W., & STEWART, C. N. (2015). Plant synthetic biology. *Trends in Plant Science*, 20(5), 309–317.
- LYZNIK, L. (1996). FLP-mediated recombination of FRT sites in the maize genome. *Nucleic Acids Research*, 24(19), 3784–3789.

- MARILLONNET, S., GIRITCH, A., GILS, M., KANDZIA, R., KLIMYUK, V., & GLEBA, Y. (2004). In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(18), 6852–7.
- METT, V. L., LOCHHEAD, L. P., & REYNOLDS, P. H. (1993). Copper-controllable gene expression system for whole plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(10), 4567–71.
- MÜLLER, K., SIEGEL, D., RODRIGUEZ JAHNKE, F., GERRER, K., WEND, S., DECKER, E. L., ... ZURBRIGGEN, M. D. (2014). A red light-controlled synthetic gene expression switch for plant systems. *Molecular bioSystems*, *10*(7), 1679–88.
- MURAI, N. (2013). Review : Plant Binary Vectors of Ti Plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* with a Broad Host-Range Replicon of pRK2 , pRi , pSa or pVS1, *2013*(April), 932–939.
- NAFISSI, N., & SLAVCEV, R. (2014). Bacteriophage recombination systems and biotechnical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1–11.
- NAGY, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, *26*(2), 99–109.
- OHTA, S., MITA, S., HATTORI, T., & NAKAMURA, K. (1990). Construction and Expression in Tobacco of a {beta}-Glucuronidase (GUS) Reporter Gene Containing an Intron Within the Coding Sequence. *Plant Cell Physiol.*, *31*(6), 805–813.
- POLSTEIN, L. R., & GERSBACH, C. A. (2012). Light-Inducible Spatiotemporal Control of Gene Activation by Customizable Zinc Finger Transcription Factors, 10–13.
- RO, D.-K., PARADISE, E. M., OUELLET, M., FISHER, K. J., NEWMAN, K. L., NDUNGU, J. M., ... KEASLING, J. D. (2006). Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, *440*(7086), 940–3.
- ROBERTS C, RAJAGOPAL S, SMITH LM, NGUYEN TA, YANG W, N. S., & RAVI KS, VIJAYACHANDRA K, HARCOURT RL, DRANSFIELD L, ET AL. (1997). A Comprehensive Set of Modular Vectors for advanced Manipulations and Efficient Transformation of Plants. In *pCAMBIA Vector Release Manual Rockefeller Foundation Meeting of the International Program on Rice Biotechnology*. Malacca, Malaysia.
- SAIJO, T., & NAGASAWA, A. (2014). Development of a tightly regulated and highly responsive copper-inducible gene expression system and its application to control of flowering time. *Plant Cell Reports*, *33*(1), 47–59.
- SARRION-PERDIGONES, A., FALCONI, E. E., ZANDALINAS, S. I., JUÁREZ, P., FERNÁNDEZ-DEL-CARMEN, A., GRANELL, A., & ORZAEZ, D. (2011). GoldenBraid: an iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLoS One*, *6*(7), e21622.
- SARRION-PERDIGONES, A., VAZQUEZ-VILAR, M., PALACÍ, J., CASTELIJNS, B., FORMENT, J., ZIARSOLO, P., ... ORZAEZ, D. (2013). GoldenBraid 2.0: a comprehensive DNA assembly framework for plant synthetic biology. *Plant Physiology*, *162*(3), 1618–31.
- SHAO, M., KUMAR, S., & THOMSON, J. G. (2014). Precise excision of plastid DNA by the large serine recombinase Bxb1. *Plant Biotechnology Journal*, *12*(3), 322–329.
- SINGH, S., GHOSH, P., & HATFULL, G. F. (2013). Attachment Site Selection and Identity in Bxb1 Serine Integrase-Mediated Site-Specific Recombination. *PLoS Genetics*, *9*(5).
- SIUTI, P., YAZBEK, J., & LU, T. K. (2013). Synthetic circuits integrating logic and memory in living cells. *Nature Biotechnology*, *31*(5), 448–52.
- SLUSARCZYK, A. L., LIN, A., & WEISS, R. (2012). Foundations for the design and implementation of synthetic genetic circuits. *Nature Reviews. Genetics*, *13*(6), 406–20.
- TAVASSOLI, A. (2010). Synthetic biology: scope, applications and implications. *Organic & Biomolecular Chemistry*, *8*(1), 24–28.
- THOMSON, J. G., CHAN, R., SMITH, J., THILMONY, R., YAU, Y.-Y., WANG, Y., & OW, D. W. (2012). The Bxb1 recombination system demonstrates heritable transmission of site-specific excision in *Arabidopsis*. *BMC Biotechnology*, *12*(1), 9.
- VOINNET, O., RIVAS, S., MESTRE, P., & BAULCOMBE, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal*, *33*(5), 949–956.
- VON CAEMMERER, S., QUICK, W. P., & FURBANK, R. T. (2012). The development of C₄rice: current progress and future challenges. *Science (New York, N.Y.)*, *336*(6089), 1671–2.

- WANG, Y., YAU, Y. Y., PERKINS-BALDING, D., & THOMSON, J. G. (2011). Recombinase technology: Applications and possibilities. *Plant Cell Reports*, 30(3), 267–285.
- WAY, J. C., COLLINS, J. J., KEASLING, J. D., & SILVER, P. A. (2014). Integrating biological redesign: Where synthetic biology came from and where it needs to go. *Cell*, 157(1), 151–161.
- WEBER, E., ENGLER, C., GRUETZNER, R., WERNER, S., & MARILLONNET, S. (2011). A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS ONE*, 6(2).
- XU, T., & RUBIN, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development (Cambridge, England)*, 117(4), 1223–37.
- XU, Z., THOMAS, L., DAVIES, B., CHALMERS, R., SMITH, M., & BROWN, W. (2013). Accuracy and efficiency define Bxb1 integrase as the best of fifteen candidate serine recombinases for the integration of DNA into the human genome. *BMC Biotechnology*, 13, 87.

8. ANEXOS

8.1. DOMESTICACIÓN DE PIEZAS GOLDENBRAID 2.0 MEDIANTE MUTAGÉNESIS POR PCR

Este proceso de mutagénesis consiste en la amplificación por PCR de un fragmento de ADN utilizando varios pares de oligonucleótidos, de manera que el resultado son varios parches de ADN (Nivel -1) que al ser ligados juntos en el vector pUPD, constituirán una nueva pieza GB estándar totalmente compatible con el sistema de ensamblaje (Nivel 0). Este proceso está estandarizado y requiere el uso de oligonucleótidos que introduzcan en los extremos del fragmento molde de ADN los nucleótidos adecuados al tipo de parte GB según la gramática (**Figura 6**). Si el fragmento posee un sitio interno de reconocimiento BsmBI o BsaI este debe ser modificado mediante mutaciones silenciosas, teniendo en cuenta no alterar el marco de lectura ni la secuencia aminoacídica en el caso de que la pieza se trate de una región codificante. A continuación se describe como ejemplo ilustrativo de este proceso el diseño de cebadores (**Figura S 2**) y el proceso de domesticación mediante mutagénesis por PCR de Xis (**Figura S 3**), la escisionasa que actúa como factor de direccionalidad de la integrasa Bxb1, como pieza B3-B4-B5 (AATG-GCTT).

La secuencia original se obtuvo del plásmido RAD Module G8-C1 (número de acceso: JQ929585) del laboratorio de Drew Endy, Stanford University a través del repositorio de plásmidos Addgene, Cambridge, MA. Esta posee un sitio BsmBI interno en las bases (3658-3664). Por ello, se requiere el diseño de dos pares de oligonucleótidos para su domesticación: 2 cebadores externos que añadan los extremos necesarios para estandarizar la pieza (Xis_Part1_F y Xis_Part2_R) y 2 internos que lleven a cabo la mutagénesis dirigida (Xis_Part1_R y Xis_Part2_F). El diseño de los mismos queda recogido en la **figura S 2**. A continuación se lleva a cabo una reacción de PCR con cada pareja de oligonucleótidos (Xis_Part1_F junto a Xis_Part1_R y Xis_Part2_F junto a Xis_Part2_R), que darán lugar a los parches mencionados anteriormente (**Figura S 3**). Detalles del procedimiento de PCR detallados en la sección 3.5 *Amplificación por PCR* y lista de cebadores en la **tabla 3**. Finalmente, los parches producto de PCR son ensamblados en el vector domesticador de destino pUPD mediante una reacción GB única de restricción-ligación (25-50 ciclos: 2 min 37°C, 5 min a 16°C):

- 75 ng vector domesticador pUPD
- 40 ng de cada parche producto de PCR
- 3 unidades de Ligasa T4 (Promega, Madison, USA)
- 5 unidades de BsmBI (New England Biolabs, Ipswich, USA)
- 1x Tampón Ligasa T4 (Promega, Madison, USA)

Posteriormente, el producto de la ligación fue transformado en *E. coli* DH5 α y cultivado en medio LB-Agar de selección con ampicilina, debido a que el vector pUPD posee marcador de resistencia a la misma (**Figura S 1**). Las colonias positivas por selección blanco-azul fueron cultivadas en medio líquido para su posterior extracción de ADN plasmídico. Finalmente, este fue comprobado por digestión en gel de agarosa y secuenciación. Las colonias portadoras del plásmido fueron criogenizadas y conservadas a -80°C como “stock” de glicerol. Los procesos y detalles de los procesos mencionados pueden encontrarse en sus respectivos apartados.

8.2. DOMESTICACIÓN DE PIEZAS GOLDENBRAID 2.0 MEDIANTE SÍNTESIS DE NOVO

La domesticación por síntesis *de novo* de ADN consiste en el diseño *in silico* de la pieza de ADN, compatible con el sistema GoldenBraid y sin sitios de reconocimiento internos, y su posterior síntesis química como fragmentos de ADN de doble cadena. En este trabajo la integrasa Bxb1 fue domesticada por este método. Esta secuencia fue encargada en forma de “gBlocks® Gene Fragments” a Integrated DNA Technologies - Condalab (Madrid, España).

La síntesis de ADN ofrece la posibilidad de mejorar la funcionalidad de los elementos génicos mediante la modificación de su secuencia de ADN. La integrasa Bxb1, además de ser domesticada, se le añadieron diferentes características para su mejor funcionamiento:

- **Optimización del uso de codones:** consiste en la modificación de la secuencia codificante (CDS) adaptándola a la frecuencia de uso de codones de la especie de destino, con el fin de mejorar la eficiencia traslacional. Para ello se lleva a cabo la sustitución de codones de la secuencia original por codones sinónimos que corresponden a la frecuencia de uso de una determinada especie. La optimización de uso de codones para la integrasa Bxb1 fue realizada para *Nicotiana benthamiana* mediante la herramienta online de optimización de Integrated DNA Technologies (<https://eu.idtdna.com/CodonOpt>). Detalle del proceso de optimización disponible en la **figura S 4**.
- **Inserción de intrones:** los intrones son elementos esenciales para el correcto procesamiento del mRNA en especies eucariotas. Es por este motivo que la inserción de intrones es una práctica común en ingeniería genética para mejorar la expresión de genes heterólogos en eucariotas. Con el fin de mejorar la expresión génica y evitar posibles sucesos de recombinación durante el proceso de clonaje en especies bacterianas (*E. coli* y *A. tumefaciens*), a la CDS de la integrasa Bxb1 se le insertó el primer intrón del gen de la catalasa 1 (CAT1) de *Ricinus communis* cuya funcionalidad en especies de *Nicotiana* ha sido probada (Cazzonelli & Velten, 2003; Ohta, Mita, Hattori, & Nakamura, 1990). La secuencia del intrón (número acceso: D21161) se insertó entre el quinto y sexto codón de la secuencia de la integrasa, 15 bases aguas abajo del inicio de transcripción, manteniendo las secuencias del intrón flanqueantes consenso para el reconocimiento del spliceosoma y permitir el correcto procesamiento y eliminación del intrón (5' GT....AG 3').

Finalmente, una vez recibida la secuencia de ADN, esta fue clonada en el vector pUPD, transformada en *E. coli* y cultivada en LB agar con kanamicina, IPTG y X-gal. Las colonias positivas fueron seleccionadas y se extrajo su ADN plasmídico, que posteriormente fue comprobado por análisis de restricción y secuenciación. El proceso detallado de cada técnica se encuentra descrito en su respectivo apartado.

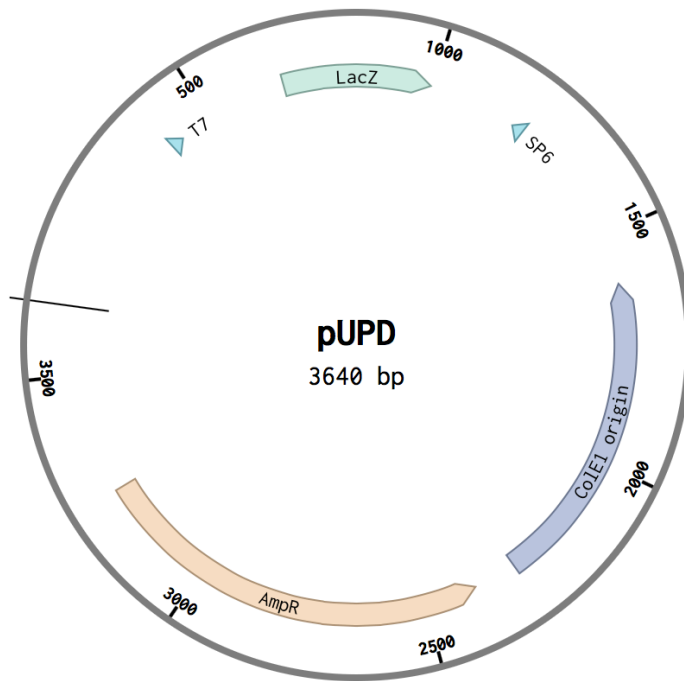


Figura S 1. Representación gráfica del vector domesticador pUPD. Contienen el gen marcador bacteriano de resistencia a ampicilina (AmpR), el origen de replicación bacteriano ColE1, sitios de anillamiento T7 y SP6 para la unión de cebadores y el Gen lacZ para selección blanco-azul de colonias transformadas.

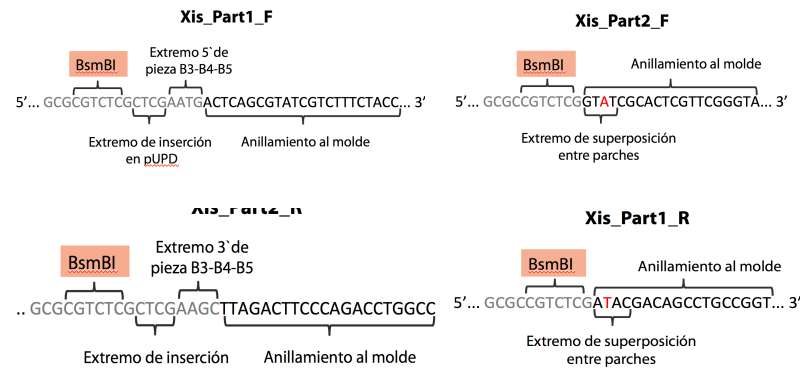


Figura S 2. Diseño de cebadores para domesticación de Xis como pieza GB B3-B4-B5. Los cebadores Xis_Part1_F junto a Xis_Part1_R, y Xis_Part2_F junto a Xis_Part2_R serán utilizados en dos reacciones de PCR paralelas por parejas con el fin de obtener dos parches para domesticar la secuencia original de Xis. Los cebadores Xis_Part1_F y Xis_Part2_R serán los encargados de añadir los 4 nucleótidos en los extremos de la pieza siguiendo la gramática GB. Los cebadores Xis_Part1_R y Xis_Part2_F contienen ambos una sustitución en la zona de anillamiento al molde (en rojo) para llevar a cabo la mutagénesis dirigida por PCR y eliminar un sitio interno BsmBI.

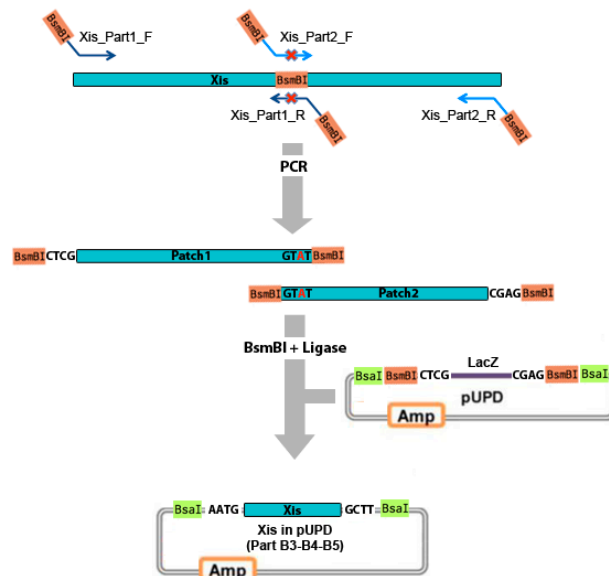


Figura S 3. Proceso de domesticación de Xis como pieza GB B3-B4-B5 mediante mutagénesis por PCR. La secuencia original codificante de Xis (Acceso: JQ929585) posee un sitio interno de la enzima de restricción BsmBI que debe ser eliminado. También se le deben añadir los extremos para su uso en GoldenBraid. Esta es amplificada en dos reacciones de PCR paralelas, utilizando los pares cebadores Xis_Part1_F junto a Xis_Part1_R y Xis_Part2_F junto a Xis_Part2_R. Esto dará lugar a dos parches diferentes en los cuales se ha eliminado el sitio BsmBI interno mediante una sustitución silenciosa introducida en los cebadores (aspa roja y letras de color rojo) y flanqueados por sitios BsmBI. Posteriormente, ambos parches son introducidos junto al vector de domesticación pUPD en una reacción GB de digestión BsmBI y ligación. La acción de BsmBI cortará los sitios flanqueantes de los parches dejando accesibles extremos cohesivos de 4 nucleótidos, complementarios entre los parches y con el vector pUPD. La acción de BsmBI sobre el vector pUPD elimina el LacZ del mismo y permite la inserción de los parches. La acción de la ligasa permite la unión de ambos parches en el orden adecuado y su inserción en el vector por complementariedad de los extremos cohesivos. Este proceso permiten el ensamblaje de la nueva pieza GB B3-B4-B5.

Range 1: 1 to 1499 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
756 bits(838)	0.0	1067/1499(71%)	0/1499(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGAGAGCCCTGGTAGTCATCCGCCTGTCCCGCGTCACCGATGCTACGACTTCACCGGAGCGTCAGCTGGAGTCTTGCCAGCAGCTCTGC	90		
Sbjct 1	ATGAGAGCACTCGTTGTGATTAGATTAAGCAGGGTAACCGATGCCACGACGAGCCCTGAAAGGCAACTCGAGAGCTGTGAGCAACTTTGT	90		
Query 91	GCCCAGCGGGCTGGGACGTCGTCGGGGTAGCGGAGGATCTGGACGTCCTCCGGGGCGGTCGATCCGTTGACCCGAAGCGCAGACCGAAC	180		
Sbjct 91	GCTCAAAGAGGCTGGGATGTTGTGGGCGTCGACAGGATTTAGATGTTCCGGAGCCGTAGATCCCTTTGACAGAAAAGGAGGCTAAC	180		
Query 181	CTGGCCCGTGGCTAGCGTTCGAGGAGCAACCGTTGACGCTGATCGTGGCGTACCAGGTTGACCCGATCGATCCGCGATCTG	270		
Sbjct 181	CTTGCCAGGTGGTTAGCATTCGAGGAACAACCTTTTACGCTCATCGTTGCTTATCGTGTGATCGGCTCACGAGAAGTATTAGGCATCTG	270		
Query 271	CAGCAGTGGTCCACTGGGCCGAGGACCACAAGAAGCTGGTCGTCCTCCGACCCGAAGCGCACTTCGATACGACGACCGCTTTGCGGG	360		
Sbjct 271	CAACAGCTAGTTCACTGGGCCGAAGATCACAAAAAATGGTCGTTAGTGTACGGAAAGCACAATTTGATACGACTACGCCATTCGCTGCT	360		
Query 361	GTCGTCATCGCGCTTATGGGAACGGTGGCGCAGATGGAATAGAAGCGATCAAAAGCGGAACCGTTCGGCTGCGCATTTCAATATCCGC	450		
Sbjct 361	GTGGTTATTGCTCTGATGGGAATGTAGCACAGATGGAGTTAGAAGCAATTAAGAGAGAAAATAGAAGCGCTGCTCATTTTAAACATTAGG	450		
Query 451	GCCGGGAAATACCGAGGATCCCTGCCGCGTGGGATACCTGCCTACGCGCTGGACGGGAGTGGCGGCTGGTCCCGGACCTGTGTCAG	540		
Sbjct 451	GCTGGAAGTATCGGGTAGTCTTCCCTCCATGGGGCTATTTACCACCTAGAGTGGATGGGAGTGGAGATTAGTCCCTGATCCTGTTCAA	540		
Query 541	CGAGAGCGCATCCTCGAGGTATCACCGCGTCGTCGACAACCACGAGCCGCTGCACCTGGTGGCCACGACCTGAACCGCGCTGGTGTCT	630		
Sbjct 541	AGAGAAAGGATCCTCGAGGTTTACCAATCGTGTGGTAAATCATGAGCCACTCCACCTGGTGTCTCATGATTAATAGAAAGGGTGTATA	630		
Query 631	CTGTCCGCGAAGGACTACTTCGCGCAGTGCAGGCGCGAGCCGAGCGCGGGAGTGGTCCGCTACCAGGCTGAAGCGATCGATGATC	720		
Sbjct 631	TTATCACCTAAGGACTATTTTGCACAACCTACAGGGACGGGAACCCAGGGTAGAGAGTGGAGTGCCACCGCATTTGAAAAGATCCATGATA	720		
Query 721	TCCGAGCGATGCTCGGGTACGCGACTCTGAACGGTAAAGCCGTCGAGACGACGAGCCCGCTGGTGGCGGCTGAGCCGATCCTG	810		
Sbjct 721	TCAGAGCTATGCTTGGTTACGCTACGTTAAATGGTAAACAGTGCCTGATGATGATGGGGCTCCGTTGGTGGAGCCGAGCCCATATTA	810		
Query 811	ACCCGTGAGCAGCTGGAGCGCTGCGCGCCGAGCTCGTGAAGACTCCCGGGCGAAGCCCGGCTGTCTACCCCTCGCTGCTGCTGCGG	900		
Sbjct 811	ACTAGGGAACAGCTAGAAGCTCTTAGAGCTGAATTGGTAAAGACCAGTCGAGCAAAGCCCGCTGTGCTACCCCGAGCTGCTGTTAAGG	900		
Query 901	GTGTTGTTCTGCGCGGTGTGCGGGGAGCCCGCTACAAGTTCGCCGGGGAGGACGTAAGCACCCCGCTACCCTGCGCTCGATGGGG	990		
Sbjct 901	GTCTTTTTTGTGCTGTGTGGCGAGCCAGCTTATAAGTTTGTGAGCGGAAGAAAGCACCCACGCTATAGTGTGCGAGCATGGGA	990		
Query 991	TTCCCGAAGCACTGCGGGAAACGGCACCGTGGCGATGGCCGAGTGGGACCGCTTCTGCGAGGAGCAGGTGCTGGATCTGCTCGGGACCGG	1080		
Sbjct 991	TTCCCTAAACATTGTGGAACGGTACAGTAGCAATGGCCGAGTGGGACCGCTTTTGTGAAGAAACAAGTTTGGATTGCTTGGTGTATGCA	1080		
Query 1081	GAGCGCTGAGAGAAAGTCTGGTAGCCGGCTCGGACTCCCGGTCGAACCTCGCGGAGTGAACCGGAGCTGGTGGACCTGACGTCGCTG	1170		
Sbjct 1081	GAAAGACTTGAGAAGGTTTGGTTGCCGCGAGCATTCGCTGTAGAGCTTGCCGAGTCAATGCAGAGCTGTGCGATTGACTTCACTA	1170		
Query 1171	ATCGGCTCCCGGCCACCGGGCCGGCTCTCCGACGAGAAAGCACTGGATGCCGTATTGCGGCGTGGCCCGCGGCAAGAGGAGCTG	1260		
Sbjct 1171	ATTGGATCACAGCTTACCGTGCAGGCTCTCCGCAAAAGGAAGCATTAGATGCAAGGATCGCCGCTTTAGCAGCACGGCAGGAGGAATTA	1260		
Query 1261	GAGGCTTAGAGGCTCGCCGCTGCGTGGGAGTGGCGGAGACCGGGCAGCGGTTCCGGGACTGGTGGCGGAGCAGGACACCGCGGCA	1350		
Sbjct 1261	GAAGGACTTGAGGCACGTCATCAGGATGGGAGTGGAGAGAGACAGGACAGCGTTTTTGGTACTGGTGGAGGGAACAAGATACTGCTGCA	1350		

Figura S 4. Alineamiento local de la secuencia original de la integrasa Bxb1 y la misma secuencia optimizada para uso de codones de *N. benthamiana*. Alineamiento realizado mediante la herramienta software online “basic local alignment search tool” BLAST.

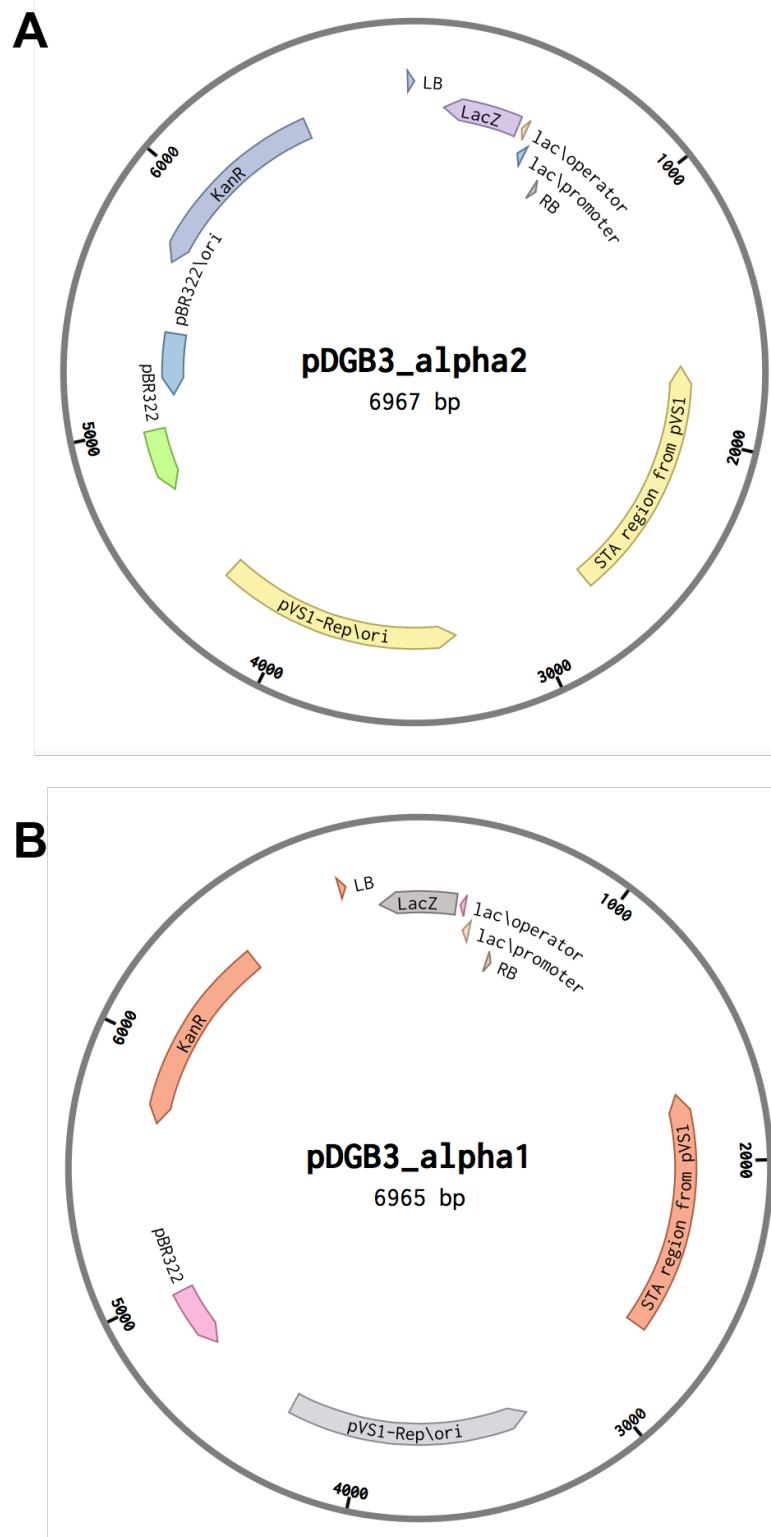


Figura S 5. Representación gráfica de los vectores de destino GoldenBraid de nivel 1: pDGB3_α1 y pDGB3_α2. Vectores Ti basado en pCAMBIA para transformación de planta mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Ambos contienen orígenes de replicación bacterianos pBR322 y pSV1 (utilizado por *A. tumefaciens*); gen marcador bacteriano de resistencia a kanamicina (KanR); región de estabilidad en *A. tumefaciens* (STA región from pSV1) y el gen LacZ flanqueado por “Left Border” (LB) y “Right Border” (RB), secuencias flanqueantes del ADN de transferencia reconocidas por los genes de virulencia causantes de la transformación. El gen LacZ es sustituido por la secuencia de interés, permitiendo su selección blanco-azul y su transferencia de *Agrobacterium* a planta.

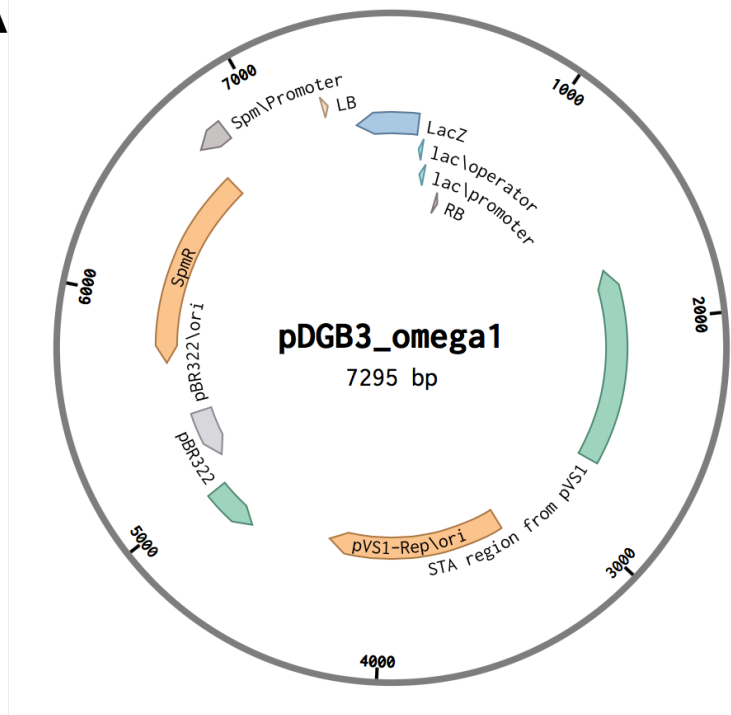
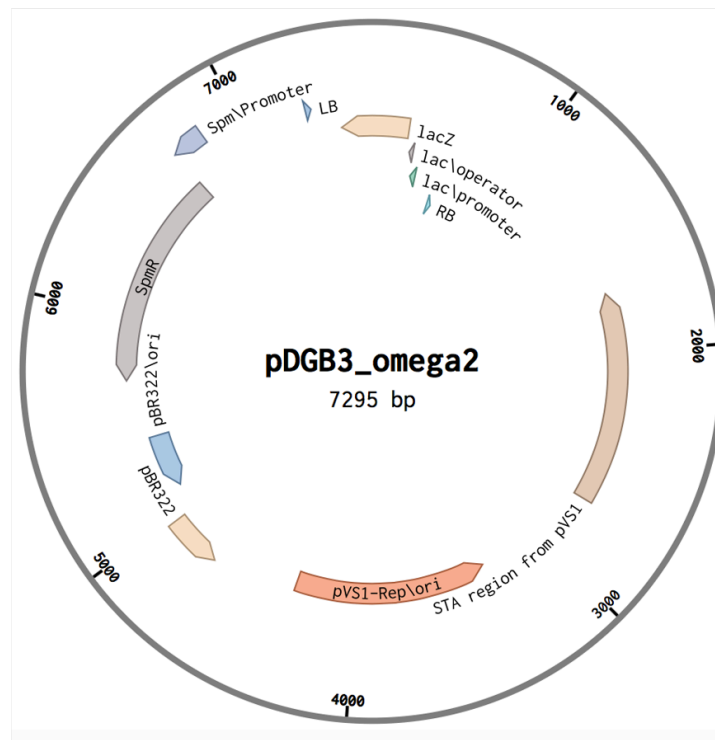
A**B**

Figura S 6. Representación gráfica de los vectores de destino GoldenBraid de nivel 2: pDGB3_Ω1 y pDGB3_Ω2. Vectores Ti basados en pCambia para transformación de planta mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Ambos contienen orígenes de replicación bacterianos pBR322 y pVS1 (utilizado por *A. tumefaciens*); gen marcador bacteriano de resistencia a espectinomicina (SpmR); región de estabilidad en *A. tumefaciens* (STA región from pVS1) y el gen LacZ flanqueado por “Left Border” (LB) y “Right Border” (RB), secuencias flanqueantes del ADN de transferencia reconocidas por los genes de virulencia causantes de la transformación. El gen LacZ es sustituido por la secuencia de interés, permitiendo su selección blanco-azul y su transferencia de *Agrobacterium* a planta.

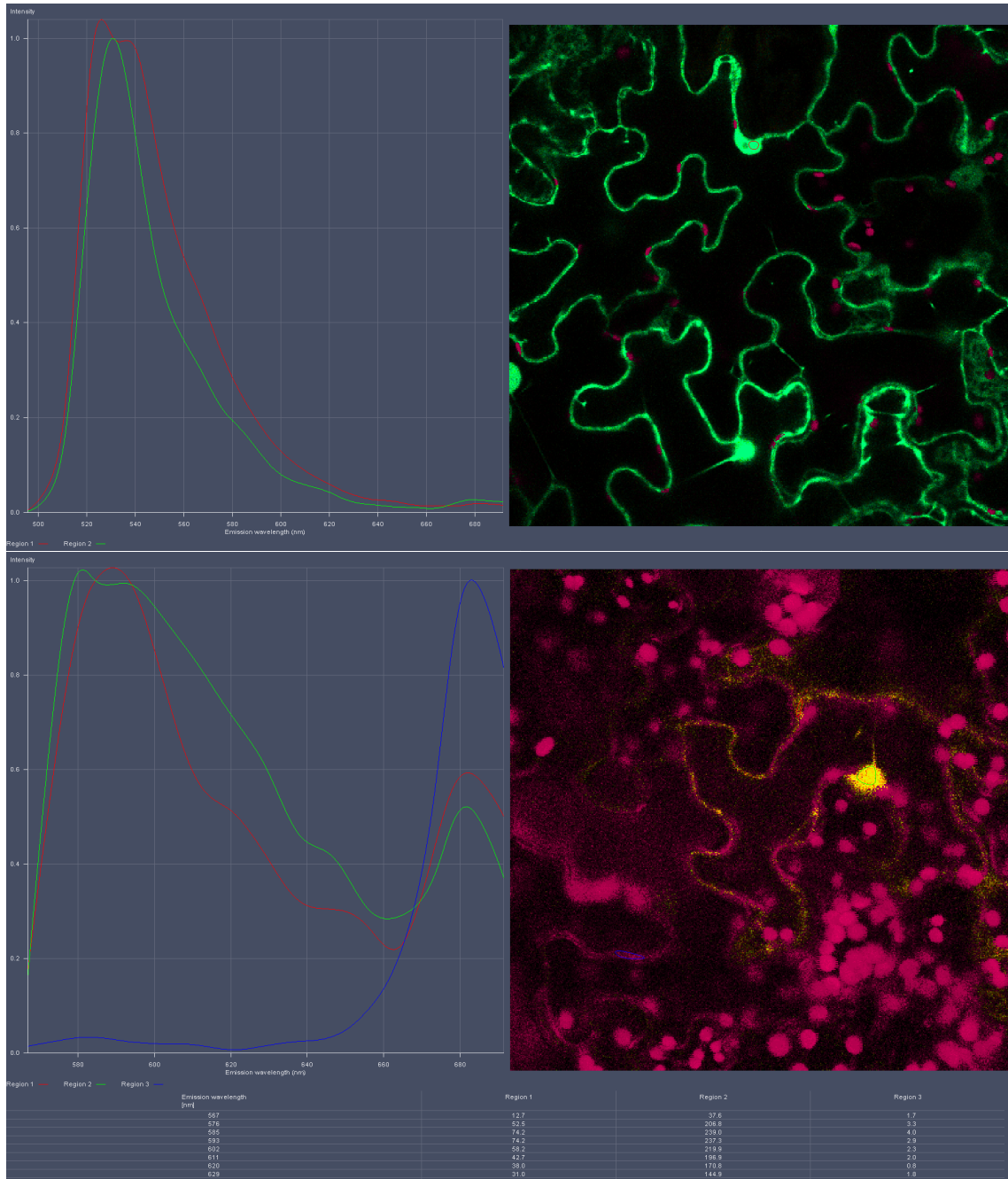


Figura S 8. “Lamda scan” de detección de GFP y DsRed por microscopía confocal de fluorescencia. Fluorescencia detectada en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con el reportero BP, expresión de GFP (arriba), y el Reportero LR, expresión de DsRed (abajo). Picos de emisión detectados a 509 y 585 nm (abajo, línea roja).