



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y
Celular de Plantas

Comparación de sistemas de edición genética y edición de
bases basados en la tecnología CRISPR/Cas9 y
CRISPR/Cas12

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Vega Sierra, Daniel

Tutor/a: Niñosles Rodenes, Regina

Director/a Experimental: VAZQUEZ VILAR, MARTA

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Comparación de sistemas de edición genética y edición de bases basados en la tecnología CRISPR/Cas9 y CRISPR/Cas12

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS

Universitat Politècnica de València

Alumno:

Daniel Vega Sierra

Tutores:

Regina Niños Rodenes

Marta Vázquez Vilar

Valencia, enero de 2024

Agradecimientos

En primer lugar, muchas gracias a Eva por tenderme su mano y acompañarme en el desarrollo de este proyecto. A mi tutora Regina por poner siempre el corazón en todo lo que hace y apoyarme profesional y personalmente siempre que lo he necesitado. A mi tutora Marta por haberme permitido desarrollar este trabajo a su lado y haberme transmitido tanto sus conocimientos como su pasión por la ciencia.

A todos mis compañeros del 1.03, a Pepe, por haberme acogido en su laboratorio con los brazos abiertos; a Susana, que apareció por el laboratorio como un terremoto y que me ha prestado su ayuda, ánimo y compañía desde entonces; a Jose, por su gran sentido del humor que ha amenizado los días durante estos meses; a Sepideh, por estar siempre disponible y por haberme aportado su experiencia y su inestimable ayuda; a Euge, por, a pesar de haber llegado en el peor momento, tener siempre una palabra de ánimo; y a Pluvi, por haber hecho todo este camino junto a mí y nunca haber dejado de ser mi apoyo dentro y fuera del laboratorio.

A todos los compañeros del 2.09 y 2.10, especialmente a Camilo, Víctor y Marta, que me han echado una mano siempre que lo he necesitado. Y a mis compañeros del máster siempre me han dado compañía y fuerza a lo largo del camino.

A todos mis amigos que siempre han estado ahí para apoyarme. A mi familia, a mis padres, que con su sacrificio me han permitido llegar hasta aquí; y a mis abuelos, que siempre han creído en mí, especialmente a mi abuelo Gumer, mi referente personal y el mejor profesor que he podido tener nunca.

Finalmente, agradecer su labor a todo el personal de servicios del IBMCP sin el que nada de esto habría sido posible.

Resumen

El hecho de que los caracteres agronómicos de interés dependan de variaciones en uno o unos pocos nucleótidos hace especialmente interesante el diseño de sistemas de edición génica para su aplicación en plantas. Es por ello, que en el presente proyecto se persigue la creación de este tipo de sistemas de edición de bases que aúnan, en una proteína de fusión, la especificidad, dada por los complejos Cas-RNA guía de los sistemas CRISPR/Cas9 y CRISPR/Cas12, y la capacidad de editar bases, procedente de enzimas capaces de modificar las bases del DNA.

Estos sistemas deben ser fáciles de construir y eficaces para el objetivo dado. En este punto es clave la Biología Sintética que permite la creación y diversificación de este tipo de sistemas al crear módulos funcionales ensamblables e intercambiables y sistemas para el ensamblaje sencillo de estos módulos. Sin embargo, la monitorización de los cambios producidos por los sistemas de edición es aún un reto, lo que limita su desarrollo y optimización.

En este contexto se plantea el presente Trabajo de Fin de Máster, en el que se generan editores de bases y editores génicos basados en los sistemas bacterianos CRISPR/Cas9 y CRISPR/Cas12 empleando los editores A3A-PBE y ABE8e. Los sistemas de edición de bases creados son evaluados empleando gRNAs que los dirigen la maquinaria de edición a distintos genes. Así se consigue evaluar su eficiencia demostrando la funcionalidad de sistemas de edición A3A-dCas12, ABE8e-nCas9 y ABE-dCas9, tanto con Cas intronizadas como con Cas sin intronizar. Con estos resultados se verifica la posibilidad de crear editores de bases de alta eficiencia en plantas basados en Cas12 y se determinan cuales las versiones de las proteínas Cas más apropiadas para la construcción de estos sistemas.

En paralelo, se sientan las bases para la creación de un sistema reportero, basado en la ruta de bioluminiscencia de *N. nambj*, que permita cuantificar la eficiencia de editado genético en plantas.

Abstract

The fact that agronomic traits of interest depend on variation in one or a few nucleotides makes the design of gene editing systems for their application in plants particularly interesting. Therefore, the present project aims to create this type of base editing systems that combine, in a fusion protein, the specificity, from Cas-RNA guide complexes of the CRISPR/Cas9 and CRISPR/Cas12 systems, and the ability to edit bases, from enzymes that modify DNA bases.

These systems should be easy to construct and effective for the given objective. At this point, Synthetic Biology plays a key role, enabling the creation and diversification of such systems by generating functional modules that are assembleable and interchangeable, along with systems for the simple assembly of these modules. However, monitoring changes induced by editing systems remains a challenge, limiting their development and optimization.

In this context, the present Master Thesis is proposed, in which base editors and gene editors based on bacterial CRISPR/Cas9 and CRISPR/Cas12 systems are generated using A3A-PBE and ABE8e editors. The base editing systems created are evaluated using gRNAs that target the editing complexes to different genes. Thus, their efficiency is evaluated and the functionality of A3A-dCas12, ABE8e-nCas9 and ABE-dCas9 editing systems is confirmed, for both intronized Cas and no-intronized Cas. These results verify the possibility of creating highly efficient Cas12-based base editors in plants and determine which versions of Cas proteins are most appropriate for the construction of these systems.

In parallel, we laid the foundations for the creation of a reporter system, based on the bioluminescence pathway of *N. nambi*, that allows quantifying the efficiency of gene editing in plants.

Objetivos de Desarrollo sostenible

El TFM realizado supone una puesta a punto de un método con numerosas aplicaciones, algunas de las cuales se comentan en el propio trabajo. La aplicación más inmediata, y para la que ya se ha empleado el “base-editing” en algunos casos, es la obtención de plantas de cultivo resistentes a herbicidas de amplio espectro, resistentes a factores de estrés, con mejores rendimientos o con mejores características nutricionales. Por este motivo, consideramos que el trabajo se alinearía bien con los ODS 2 y 3: “Hambre cero”, y “Salud y bienestar”, ya que permitiría usar en los cultivos herbicidas de amplio espectro mucho menos contaminantes que otros herbicidas, aumentar la producción de alimentos y mejorar sus propiedades.

También se alinea con el ODS 6 “Agua limpia y saneamiento” y con el OCS 15 “Vida de ecosistemas terrestres” al reducir la aplicación de herbicidas más contaminantes en los campos de cultivo y evitar, con ello, su presencia en aguas superficiales y ecosistemas terrestres.

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

Índice de contenidos

1. Introducción	1
1.1. La Biología Sintética	1
1.1.1. Concepto y fundamentos de la Biología Sintética	1
1.1.2. Biología Sintética en plantas	2
1.2. Edición genética en plantas	2
1.3. El Sistema CRISPR/Cas y sus aplicaciones	3
1.3.1. Fundamentos y componentes del sistema CRISPR/Cas	3
1.3.2. Aplicaciones del Sistema CRISPR/Cas	5
1.4. Base-editing	6
1.4.1. Fundamentos y componentes	6
1.4.2. Tipos de editores de bases	7
1.4.3. Aplicaciones de las técnicas de <i>Base-editing</i>	8
1.5. Sistemas reporteros en Biología Sintética	9
1.5.1. Importancia de los sistemas reporteros en Biología Sintética	9
1.5.2. Sistemas reporteros de edición genética y de bases	9
1.5.3. Sistemas reporteros basados en bioluminiscencia	10
1.6. Ensamblaje modular GoldenBraid	11
1.7. <i>Nicotiana benthamiana</i> como modelo vegetal	12
2. Objetivos	14
3. Materiales y métodos	15
3.1. Material vegetal	15
3.2. Cultivo y manipulación de microorganismos	15
3.2.1. Cepas bacterianas empleadas y condiciones de crecimiento	15
3.2.2. Medios de crecimiento de bacterias	15
3.2.3. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	16
3.2.4. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	16
3.3. Manipulación y purificación de ácidos nucleicos	16
3.3.1. Extracción de DNA genómico	16
3.3.2. Extracción de plásmidos	17
3.3.3. Digestión enzimática de DNA	17
3.3.4. Electroforesis en gel de agarosa	17
3.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	17
3.3.6. Purificación de productos de PCR	18
3.3.7. Secuenciación Sanger	18
3.3.8. Cuantificación de la edición de bases	18

3.4. Ensamblaje modular GoldenBraid (GB)	19
3.4.1. Ensamblaje de gRNAs de Cas12	19
3.4.2. Domesticación de secuencias iCas12 y dCas12i	20
3.4.3. Ensamblaje de módulos Cas (nivel 1)	22
3.4.4. Ensamblaje de varias unidades transcripcionales (nivel 2)	23
3.5. Transformación transitoria de células foliares de <i>N. benthamiana</i>	23
4. Resultados	25
4.1. Comparación de sistemas de <i>Base-editing</i>	25
4.1.1. Validación de resultados previos	25
4.1.2. Diseño y ensamblaje de los sistemas de <i>Base-editing</i>	26
4.1.3. <i>Base-editing</i> empleando el editor de bases A3A-PBE	29
4.1.4. <i>Base-editing</i> empleando el editor de bases ABE8e	31
4.2. Comparación de sistemas de edición genética mediante el uso de un reportero bioluminiscente	34
4.2.1. Diseño y ensamblaje de los sistemas de edición genética Cas9 y Cas12	34
4.2.2. Diseño y ensamblaje de los sistemas de edición genética Cas12 e iCas12	34
4.2.3. Ensayo de supresión de bioluminiscencia por edición génica del gen HispS empleando Cas9 y Cas12	35
4.2.4. Ensayo de supresión de bioluminiscencia por edición génica del gen HispS empleando Cas12 e iCas12	35
5. Discusión	37
6. Conclusiones	41
6. Bibliografía	42
ANEXO I. Cromatogramas L1, L2 y L3 tratadas con A3A-nCas9- gPDS-T2 a 5 dpi	48
ANEXO II. Cromatogramas L1, L2 y L3 tratadas con A3A-nCas9i-gPDS-T2 a 5 dpi	49
ANEXO III. Cromatogramas L1, L2 y L3 tratadas con A3A-dCas12-gPDS1 a 5 dpi	50
ANEXO IV. Cromatogramas L1, L2 y L3 tratadas con A3A-dCas12i-gPDS1 a 5 dpi	51
ANEXO V. Cromatogramas L1, L2 y L3 tratadas con A3A-dCas12-gFT a 5 dpi	52
ANEXO VI. Cromatogramas L1, L2 y L3 tratadas con A3A-dCas12i-gFT a 5 dpi	53
ANEXO VII. Cromatogramas L1, L2 y L3 tratadas con ABE8e-dCas12-gFT a 5 dpi	54
ANEXO VIII. Cromatogramas L1, L2 y L3 tratadas con ABE8e-dCas12i-gFT a 5 dpi	55
ANEXO IX. Cromatogramas L1, L2 y L3 tratadas con nCas9i-gPDS-T2 a 5 dpi	56
ANEXO X. Cromatogramas L1, L2 y L3 tratadas con dCas12i-gFT 5 dpi	57
ANEXO X. Cromatogramas L1, L2 y L3 tratadas con Cas12i-gPDS1 5 dpi	58
ANEXO X. Cromatogramas L1, L2 y L3 tratadas con dCas12i-gPDS1 5 dpi	59

Índice de figuras

Figura 1. Ilustración que muestra el funcionamiento general de los sistemas CRISPR/Cas9 y CRISPR/Cas12 (CRISPR/Cpf1)	4
Figura 2. Ilustración que muestra un ejemplo de los dos tipos de editores de bases empleados en el trabajo en Cas9.....	8
Figura 3. Esquema de la vía de luminiscencia de hongos (FBP) (Calvache et al., 2024)	11
Figura 4. Esquema genérico del ensamblaje de una TU en un plásmido α (nivel 1) mediante el sistema de clonaje modular GoldenBraid (Sarrión-Perdigones et al., 2013).	12
Figura 5. Esquema que muestra el ensamblaje del dímero de cebadores que componen un guía de Cas12 con el promotor de la DNA polimerasa III y la señal HDV en un vector de destino pDGB3_alpha1.....	19
Figura 6. Esquema que muestra los cebadores empleados para la reacción de cambio de sitio de iCas12/dCas12i con cada una de las partes que lo componen	20
Figura 7. Esquema que muestra la introducción del producto de PCR resultante de la reacción de cambio de sitio en un vector pUPD2.....	21
Figura 8. Cromatogramas de la secuencia complementaria al guía gPDS-T2 de la hoja 1 (L1) a 5 dpi para cada tratamiento	25
Figura 9. Cromatogramas de la región del guía gPDS-T2 y porcentajes de identidad para cada base en cada posición	26
Figura 11. Editores basados en Cas9 construidos en pDGB3_alpha1.....	27
Figura 10. Editores basados en Cas12 ensamblados en pDGB3_alpha1.....	27
Figura 12. Ejemplo de digestiones enzimáticas con BamHI de algunos de los vectores Ω 1 del trabajo	28
Figura 13. Cromatogramas de la secuencia complementaria al guía gETR23 de la hoja 1 (L1) a 5 dpi para cada tratamiento.....	29
Figura 14. Cromatogramas parciales y porcentajes de identidad para el entorno de las bases editadas (posiciones +5 a +9 respecto al PAM de gFT).	30
Figura 15. Cromatogramas parciales y porcentajes de identidad para el entorno de las bases editadas (posiciones +8 a +12 respecto al PAM de gPDS1).....	31
Figura 16. Cromatogramas de la secuencia complementaria al guía gETR23 de la hoja 1 (L1) a 5 dpi para cada tratamiento.....	32
Figura 17. Cromatogramas parciales y porcentajes de identidad para el entorno de las bases editadas (posiciones +7 a +11 respecto al PAM de gFT).	32
Figura 18. Cromatogramas parciales y porcentajes de identidad para el entorno de las bases editadas (posiciones -14 a -18 respecto al PAM de gPDS-T2).	33
Figura 19. Editores génicos construidos en pDGB3_alpha2 y ensamblados con los guías gH1_pDGB3_alpha1, gH2_pDGB3_alpha1 y gH3_pDGB3_alpha1 en un vector de destino pDGB3_Omega1.....	34
Figura 20. Editores génicos construidos en pDGB3_alpha2 y co-infiltrados junto con los guías gH1_pDGB3_alpha1.....	34
Figura 21. Diagrama de barras que muestra los ratios luminiscencia/fluorescencia (Luc/eGFP) para cada uno de los tratamientos en cis.....	35
Figura 22. Diagrama de barras que muestra los ratios luminiscencia/fluorescencia (Luc/eGFP) para cada uno de los tratamientos en trans.....	36

Índice de tablas

Tabla 1. Compuestos adicionados según requerimiento a la solución LB para la elaboración de medios de cultivo.	15
Tabla 2. Cebadores empleados para la amplificación por PCR de las secuencias diana de la edición de bases.....	18
Tabla 3. Cebadores empleados para la secuenciación Sanger de las secuencias diana de la edición de bases.....	18
Tabla 4. Cebadores empleados para la domesticación en pUPD2 de las secuencias guía del gen HispS.	19
Tabla 5. Condiciones de la reacción de restricción-ligación para el ensamblaje de módulos GoldenBraid.....	20
Tabla 6. Condiciones de la reacción de cambio de sitio de las secuencias iCas12 y dCas12i.	20
Tabla 7. Cebadores empleados para la secuenciación Sanger de iCas12_B3-B5_pUPD2 y dCas12i_B3-B5_pUPD2.....	21
Tabla 8. Módulos genéticos empleados en el trabajo.....	22
Tabla 9. Guías en pDGB3_alpha2 empleadas para la construcción de sistemas de edición de bases.	22
Tabla 10. Porcentaje de edición para cada uno de los experimentos de edición de bases que fueron realizados con éxito.	Error! Bookmark not defined.

1. Introducción

1.1. La Biología Sintética

1.1.1. Concepto y fundamentos de la Biología Sintética

La **Biología Sintética** es un campo científico multidisciplinar que resulta de la aplicación de la perspectiva de la ingeniería a la Biología. La disciplina resultante de esta unión tiene como objetivo el diseño y la construcción de sistemas biológicos que no se encuentran en la naturaleza o mejorar los ya existentes con el objeto de solucionar un problema (Benner y Sismour, 2005; Heinemann y Panke, 2006).

La Biología aporta a esta disciplina los conocimientos sobre el funcionamiento de los sistemas biológicos y sobre sus bases celulares y moleculares; mientras que la ingeniería aporta tres principios fundamentales: la estandarización, el reduccionismo y la abstracción (Benner, 2005; Endy, 2005; Wang et al., 2013).

El principio de **estandarización** consiste en la normalización y modularidad de las unidades funcionales que constituyen los sistemas biológicos, de esta forma se genera una sintaxis común que permite la compatibilidad e intercambiabilidad de las distintas unidades. Este es un principio fundamental de la Biología Sintética pues, además de facilitar y simplificar la construcción de sistemas biológicos, permite la compatibilidad y el intercambio de unidades funcionales entre las colecciones de diferentes grupos lo que, a su vez, favorece el desarrollo de circuitos genéticos más complejos y el desarrollo de la disciplina.

Por otro lado, el **reduccionismo** resulta fundamental para el desarrollo de la Biología Sintética pues permite el desglose de los problemas biológicos, que son complejos, en cuestiones más simples y fáciles de abordar. De estas cuestiones sencillas se obtienen conclusiones que, al combinarse, ofrecen un entendimiento suficiente del problema.

El tercer principio ingenieril, la **abstracción**, consiste en la simplificación de los procesos en subsistemas que abarcan una función biológica concreta. Esto permite manejar la complejidad de los sistemas biológicos al organizar procesos complejos en módulos, estos módulos se ordenan jerárquicamente en diferentes niveles en función de su complejidad.

Estos principios consiguen paliar el problema de la complejidad de los sistemas biológicos, aunque enfocar la biología desde una perspectiva ingenieril sigue siendo complicado por dos motivos: la evolución y la autoperpetuación de los organismos vivos. Esto quiere decir que los sistemas biológicos son máquinas que se autorreplican y que cometen errores en este proceso de replicación, que son la base de la evolución. Estos errores son las mutaciones y pueden producir alteraciones en el funcionamiento del sistema lo que limita la producción de “máquinas biológicas” autorreplicativas.

En cualquier caso, la Biología Sintética persigue el objetivo final de producir unidades funcionales estandarizadas e intercambiables para crear sistemas biológicos sintéticos diversificables que cumplan una función dada. Así, la Biología Sintética, a pesar de sus limitaciones, ofrece un amplio rango de aplicaciones que van desde la ciencia básica hasta aplicaciones industriales. Las aplicaciones más destacadas son la manipulación de la información genética, síntesis de circuitos genéticos, estudios de genómica funcional, optimización y diseño de transformaciones químicas, producción de biomateriales, salud humana, biorremediación o mejora vegetal (Endy, 2005).

1.1.2. Biología Sintética en plantas

Las plantas son organismos con gran adaptabilidad al entorno y una desarrollada capacidad para la detección de estímulos del ambiente, como la luz, la temperatura o señales químicas. Esto las hace idóneas para el desarrollo de circuitos génicos y sistemas biológicos sintéticos activados por estímulos externos. Además, las plantas tienen gran diversidad morfológica y una gran capacidad para sintetizar y acumular compuestos diversos, por ello son muy aptas para la producción de sustancias de interés para el ser humano. Además, el empleo de plantas para la producción de sistemas biológicos evita los problemas éticos que podrían derivarse del uso de animales (Rizzo, 2023).

En cuanto a las limitaciones de la aplicación de la Biología Sintética en el ámbito vegetal, todas ellas radican en el hecho de que las plantas son organismos pluricelulares, a diferencia de otros modelos empleados en biología sintética, como las bacterias. La pluricelularidad hace que existan numerosos estados del desarrollo y tejidos diferenciados y, además, hace que cada una de las células mantenga una relación diferente con el medio y perciba los estímulos del medio de forma diferente.

Sin embargo, el desarrollo de la Biología Sintética en plantas resulta un campo en desarrollo debido a los continuos avances en tres ámbitos: la evolución de las técnicas de clonaje molecular, que permiten el ensamblaje entre unidades funcionales para formar sistemas; la optimización de cada una de estas unidades y los avances continuos en el conocimiento de las técnicas de la mejora y fortificación vegetal.

Es por todo esto que las plantas son, a pesar de sus limitaciones, uno de los organismos con mayor potencial para enfrentarse a los retos sociales y científicos empleando la Biología Sintética (Rizzo et al., 2023; Wang y Demirer, 2023).

1.2. Edición genética en plantas

El interés del ser humano por la mejora de las variedades vegetales se remonta a hace milenios y los motores de este proceso de mejora son la variabilidad genética y la presión selectiva, origen de los procesos evolutivos. Desde la antigüedad el ser humano ha podido controlar la presión selectiva para favorecer la selección de variedades que se ajustaran a sus intereses. Sin embargo, esto prolonga los esfuerzos de obtención de estas características durante muchas generaciones. En la actualidad, se busca acortar los proyectos de mejora vegetal por lo que es necesario controlar, además de la aplicación de presión selectiva, la aparición de mutaciones en localizaciones concretas del genoma de las plantas.

Las técnicas empleadas para lograr estas mutaciones dirigidas o procesos de inserción, delección o sustitución génica en sitios específicos del genoma, en este caso del vegetal, se denominan herramientas de edición genética o de edición génica. Las primeras herramientas de este tipo que se desarrollaron se basan en un mismo mecanismo: la producción de una **rotura de doble cadena** (*Double-Strand Break*) en el DNA y la reparación de esta por parte de la maquinaria celular. La maquinaria celular de reparación no es totalmente precisa y, en muchas ocasiones, introduce errores, mutaciones, en los puntos donde se ha producido la DSB, aunque la posibilidad de errores depende del método de reparación que tenga lugar.

Lo más habitual es que la reparación se dé por **unión de extremos no homólogos** (*Non-Homologous DNA End Joining*), lo que produce modificaciones, inserciones o delecciones, respecto a la secuencia original. En otras ocasiones la reparación se produce por **homología directa** (*Homology-Directed Repair*), en estos casos la mutación es menos habitual ya que una

secuencia sirve de molde para la reparación. Sin embargo, si introducimos un DNA exógeno que funcione como molde podemos conseguir la sustitución génica (Puchta, 2005; Zhang et al., 2017).

Entre las técnicas que han sido desarrolladas para la edición genética, las de mayor extensión en plantas son: nucleasas dedos de zinc (**Zinc-Finger Nucleases**), nucleasas de actividad similar a activadores de transcripción (**Transcription Activator-like Effector Nuclease**) y sistema CRISPR/Cas (**Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated Protein**) (Mohanta et al., 2017).

El primero de estos sistemas de edición génica en aparecer fueron las **ZFNs**. Este tipo de herramientas funcionan de forma dimétrica y son capaces de reconocer una secuencia de DNA específica de 6 pb con una secuencia espaciadora inespecífica, unirse a ella y cortarla específicamente para producir una DSB. Cada uno de los monómeros que forman la ZFN se compone de un dominio de unión a DNA, formado por dominios dedos de zinc, que permite la especificidad de unión a DNA; y un dominio de restricción conformado por el dominio catalítico de la nucleasa FokI, que aporta la actividad endonucleasa. En este caso, la especificidad del corte viene dada por los determinados aminoácidos de la hélice α de los dominios de dedo de zinc, que son los que interactúan con la secuencia de DNA y los que se modifican para lograr la edición de secuencias concretas (Mohanta et al., 2017; Petolino, 2015).

Tras la aparición de las ZFNs surgieron los **TALENs**, capaces de cortar secuencias con mayor especificidad. También funcionan en dímeros y cada uno de los monómeros se compone de un dominio de reconocimiento conformado por módulos TALE, que cada uno reconoce una secuencia de nucleótidos, y, como en el caso anterior, el dominio catalítico de FokI. En este caso, la especificidad se logra por dos aminoácidos de cada uno de los módulos TALE que se encuentran en posiciones concretas e interactúan con una base nitrogenada (Mohanta et al., 2017; Cheng et al., 2013; Nemudryi, 2014).

Posteriormente, apareció el **sistema CRISPR/Cas**, donde se diferencian las herramientas CRISPR/Cas9 y CRISPR/Cas12, ambas son técnicamente más simples de generar y se tratarán de forma más detallada en la *sección 1.3* del presente trabajo.

En cualquier caso, los métodos de edición génica son, en comparación con los métodos de mutagénesis clásicos (química y física), mucho más versátiles, rápidos y específicos, aunque esto no elimina del todo la posibilidad de que se den procesos de mutación fuera de las secuencias objetivo (*offtargets*). Además, son herramientas costosas, con un diseño más complicado y difíciles de administrar a las células debido a su tamaño (Ahmar et al., 2020; Gupta y Musunuru, 2014).

1.3. El Sistema CRISPR/Cas y sus aplicaciones

1.3.1. Fundamentos y componentes del sistema CRISPR/Cas

En la actualidad, la herramienta más empleada para la edición genética es **CRISPR/Cas9**, que difiere de las técnicas anteriores en que su especificidad no es dada por la secuencia de aminoácidos de la proteína, sino por un guía de RNA. Esto la hace una herramienta de uso mucho más simple pues, para adaptarlo a las diferentes secuencias diana, solo es necesario modificar una región de 20 nucleótidos de la región protoespaciadora de este RNA y no recodificar una proteína completa. Además, este sistema, a diferencia de ZFNs y TALENs, permite dirigir la mutación a varios sitios al mismo tiempo empleando varias guías simultáneamente (Gupta y Misinuru, 2014).

Las herramientas CRISPR/Cas9 derivan del sistema CRISPR/Cas9, un sistema descubierto inicialmente en *Streptococcus pyogenes*, aunque está presente en bacterias y arqueas. Este sistema de inmunidad adaptativa y hereditario contra fagos y elementos genéticos extraños se compone de tres elementos: el RNA CRISPR (crRNA o protoespaciador), el RNA transactivador (tracrRNA) y una nucleasa Cas9 (Makarova et al., 2011).

El funcionamiento del **sistema CRISPR/Cas9 nativo** se produce en tres etapas. La primera de ellas es la inmunización, donde, al producirse una infección, pequeñas porciones de DNA exógeno se incorporan al locus CRISPR del genoma de la bacteria infectada. Una vez adquirida esta inmunidad, si produce una infección, se inicia la segunda fase la expresión del locus CRISPR. Así, se sintetiza un transcrito largo inmaduro denominado precursor de crRNA (pre-crRNA) que es procesado por la RNasa III para generar los crRNAs. Finalmente, se da la etapa de interferencia o inmunidad en la que el crRNA se combina con el tracrRNA que funciona como un andamio que permite la unión de ambos con la nucleasa Cas9. Con esta unión se conforma el complejo crRNA-tracrRNA-Cas9 que generará cortes en las secuencias que guarden homología con el crRNA gracias a los dos sitios catalíticos de Cas9 (RuvC y HNH) que generan un corte romo (*Figura 1*). Además de la especificidad dada por el crRNA, la secuencia diana debe presentar una secuencia *downstream* muy conservada, el motivo adyacente al protoespaciador (**Protospacer Adjacent Motif**), cuya secuencia habitual es NGG, aunque también puede ser NAG, siendo N cualquiera de los nucleótidos (Hsu et al., 2013; Bortesi y Fischer, 2014). En los sistemas de edición sintéticos crRNA-tracrRNA se tratan y generan como uno solo, denominado RNA guía (gRNA), que contiene las porciones conservadas del tracrRNA y el crRNA que corresponda.

Además de Cas9, una de estas proteínas Cas que también se ha empleado para el diseño de herramientas de edición genética es **Cas12a (Cpf1)**. Esta proteína ha sido estudiada en *Acidaminococcus* (AsCas12a) y *Lachnospiraceae bacterium* (LbCas12a) y se presenta como una alternativa prometedora a Cas9 (Senthilnathan et al., 2023; Hillary y Ceasar, 2023).

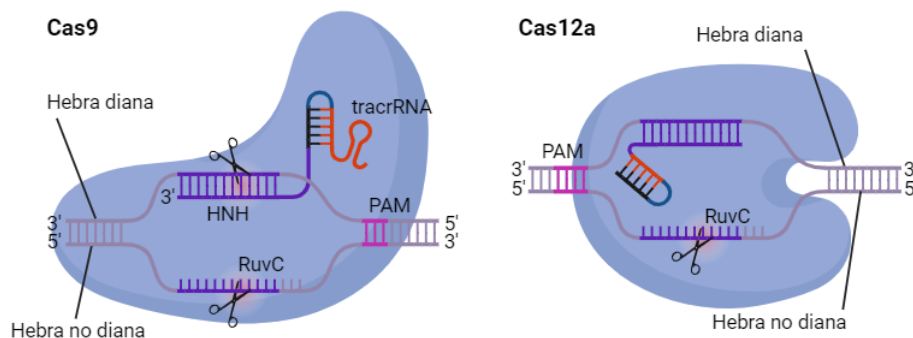


Figura 1. Ilustración que muestra el funcionamiento general de los sistemas CRISPR/Cas9 y CRISPR/Cas12 (CRISPR/Cpf1) Elaboración propia.

La nucleasa Cas12a es muy diferente a Cas9. En primer lugar, presenta un único sitio catalítico (RuvC-NUC) que produce un corte de doble cadena con extremos cohesivos (*Figura 1*). Además, Cas12a es capaz de procesar el pre-crRNA de forma autónoma sin precisar tracrRNA o RNasaIII, lo que facilita su empleo para objetivos multiplexados. Esto es gracias a que el complejo se estabiliza por la creación del bucle R con el propio DNA diana, con el que interacciona a través del crRNA, el sitio NUC de Cas12a y la secuencia PAM rica en timina (5'-TTTV-3'). Sin embargo, Cas12a presenta la desventaja de ser más flexible en la secuencia a la que se dirige, mientras que Cas9 tiene mucha más especificidad, sobre todo en las primeras 10 pb adyacentes al PAM (*seed sequence*) (Senthilnathan et al., 2023; Hillary y Ceasar, 2023; Bortesi y Fischer, 2014).

En base a este sistema nativo el ser humano ha conseguido desarrollar herramientas de edición genética eficaces que emplean Cas9 y Cas12, aunque también se han implementado sistemas con otras nucleasas como Cas13 y Cas14, en las que no nos detendremos en este trabajo. Debido a la gran variedad de proteínas Cas, cada una con unas características y particularidades concretas, existe un amplio abanico de posibilidades para el diseño de nuevos sistemas de edición genética (Marakova et al., 2011; Hillary y Ceasar, 2023).

A partir de estas proteínas Cas naturales se han desarrollado numerosas versiones optimizadas como la **endonucleasa Cas12 termotolerante** de *Lachnospiraceae bacterium* ND2006 (ttLbCas12a), que tiene alta actividad y eficiencia de corte a los 22-28 °C debido a una mutación (D156R). Estas temperaturas son las habituales de crecimiento de las plantas en laboratorio, por lo que esta versión resulta útil en plantas por su actividad en estas condiciones (Schindele y Puchta, 2020; Kleinstiver et al., 2023; Aksoy et al., 2022).

Empleando como base las Cas nativas, también se han diseñado proteínas Cas con actividades modificadas. Las más habituales son las **dead Cas** (dCas9 y dCas12), que carecen de actividad endonucleasa por poseer mutaciones en sus dominios catalíticos, pero mantienen la especificidad por la secuencia del RNA guía. La utilidad de las dCas es fusionarlas con proteínas con determinadas actividades de forma que funcionen como un vehículo para llevar estas actividades a puntos concretos del genoma. Las actividades más habituales son la modificación de bases nitrogenadas o la regulación de los procesos de transcripción (Pan et al., 2021; Kleinstiver et al., 2020).

Además de las dCas, otras Cas modificadas de amplio uso son las **nickase Cas9** (nCas9) que poseen un sitio catalítico activo y otro mutado e inactivo. La presencia de dos sitios catalíticos en Cas9 hace que existan dos nCas9 diferentes, dependiendo del sitio catalítico que ha sido inactivado, nCas9 D10A, con el sitio RuvC inactivado, y nCas9 H840A, con el sitio HNH inactivado. Estas nucleasas nCas se dice que tienen actividad nickasa, es decir, que solo pueden cortar una de las hebras del DNA bicatenario, lo que las hace apropiadas para diferentes aplicaciones. Finalmente, las secuencias que codifican para las proteínas Cas son largas (4-5 Kb) y se han incluido intrones en sus secuencias generando versiones **Cas intronizadas** (iCas9 e iCas12) para favorecer la expresión de estas Cas bacterianas en sistemas heterólogos como las plantas (Chuang et al., 2021; Kleinstiver et al., 2020, Grützner et al., 2020).

Con todas estas variantes de proteínas Cas artificiales y la diversidad de las proteínas Cas nativas el sistema CRISPR/Cas resulta muy prometedor para el diseño de diferentes herramientas de edición génica entre otras muchas aplicaciones.

1.3.2. Aplicaciones del Sistema CRISPR/Cas

La aplicación principal y más habitual del sistema CRISPR/Cas9, y por extensión, de CRISPR/Cas12, es la obtención de *knockouts* mediante la producción de **mutaciones del tipo InDel (Inserción/Delección)**, aunque en la actualidad han emergido nuevas aplicaciones derivadas de este sistema y que emplean Cas catalíticamente inactivas ya sea total o parcialmente (Hu y Li, 2022; Pickar-Oliver y Gershbach, 2019).

El empleo de estas Cas sin actividad catalítica completa impide la producción de la DSB en la secuencia diana, pero permite la acción de enzimas y otras proteínas que, fusionadas a la Cas, actúan en esta secuencia específica complementaria al guía de RNA. Así se desarrollaron distintos sistemas para diversos objetivos.

Entre estos sistemas destaca el sistema de **etiquetado de activación** (*Activation Tagging*) que, con un dominio activador de la transcripción y empleando como diana la región reguladora del gen, permiten activar la transcripción de un gen concreto. Del mismo modo, se desarrolló el sistema de **etiquetado de represión**, que, con un fundamento similar pero empleando un represor de la expresión génica, logra el efecto contrario (Tani et al, 2004; Hu y Li, 2022).

Además, a partir de estos sistemas de modulación génica permanentes o inducibles se han desarrollado sistemas que permiten el control dinámico de la transcripción de un gen diana. Esto se consigue gracias al empleo de sistemas de dos componentes. Ambos componentes se unen, en presencia de un ligando, y se reconstituye la función de la proteína activadora o represora de la transcripción (Pickar-Oliver y Gershbach, 2019).

En el campo de la edición génica se han desarrollado dos sistemas de gran importancia. El sistema de **Base-editing**, que se desarrollará con mayor extensión en la *sección 1.4*, y el sistema prime editing. El **Prime editing** emplea nCas9 (H840A) fusionada a una retrotranscriptasa (RT) junto con un RNA guía más largo que los habituales (pegRNA). El RNA permite la unión a la secuencia complementaria y, tras el corte de la secuencia complementaria por la nickasa, edita la otra hebra con ayuda de la RT (Lee et al., 2023).

De forma similar al prime editing funciona el **Click editing** que emplea la misma nickasa unida a una endonucleasa HUH humana y al fragmento de Klenow de la de la DNA polimerasa I de *E.coli*. En este caso, además del guía de RNA, se emplea un guía de DNA de cadena sencilla, que contiene la mutación a introducir en la secuencia diana. Esta secuencia se muta al ser cortada por HUH y reparada por el fragmento de Klenow empleando el DNA guía como molde (da Silva et al., *Unpublished*).

Por último, otros de los sistemas derivados de CRISPR/Cas más novedosos son los **sistemas de metilación/demetilación basados en CRISPR/Cas9** en los que se fusionan una proteína dCas9 con metilasas y demetilasas, respectivamente, para lograr modular la epigenética de la secuencia diana (Ghoshal et al., 2021).

1.4. Base-editing

1.4.1. Fundamentos y componentes

La mayoría de los rasgos agronómicos de interés y las propiedades de las proteínas vienen determinados por **cambios de un solo nucleótido** (*Single Nucleotide Polymorphisms*), cambios que resultan difícilmente alcanzables por los métodos de edición genética basados en ZFN, TALEN o CRISPR/Cas. Es por ello que surge un nuevo sistema, denominado, *Base-editing*, que busca cambios más precisos, a nivel de nucleótido, en la secuencia de DNA (Li et al., 2017; Wang y Doudna, 2023).

La técnica de *Base-editing* se presenta como una nueva herramienta que, basada en el sistema CRISPR/Cas, persigue la producción de conversiones de nucleótidos de forma dirigida y sin generar una DSB en el DNA (Li et al., 2017).

Para lograr este tipo de cambios se emplea una proteína Cas que carezca de actividad endonucleasa (dCas9 o dCas12) o que solo posea actividad nickasa (nCas9) ya que, en *Base-editing*, la función de la Cas es dirigir el complejo de edición a la secuencia diana, no producir una DSB. Sin embargo, sí algunos autores muestran un aumento de la eficacia del cambio de base al emplear nCas9 en vez de dCas9 debido a que, al romper la cadena no editada, se sesga la reparación celular hacia la base editada (Kantor et al., 2020).

El complejo de edición se compone, además de la dCas o nCas, de un RNA guía (**guide RNA**) cuyo diseño depende del tipo de Cas que se emplee (*sección 1.3.1*) y de una enzima que, fusionada con la nucleasa Cas, transforma químicamente una base en otra al modificar su estructura química. En ocasiones se pueden incorporar elementos adicionales que inhiban procesos de reparación del cambio que queremos producir, este es el caso del inhibidor de la uracil DNA glicosilasa (UGI) (Li, Y. et al., 2023; Kantor et al., 2020).

1.4.2. Tipos de editores de bases

Los sistemas de *Base-editing* pueden dirigirse a DNA o a RNA, aunque el presente trabajo solo se centra en los de DNA. Los sistemas de *Base-editing* para DNA se dividen en tres grandes grupos: editores de citosina (**Cytosine Base Editor**), editores de adenina (**Adenine Base Editor**) y editores C·G a G·C (**C·G to G·C Base Editors**).

Las primeras herramientas de *Base-editing* diseñadas fueron las **CBEs** que consisten en una citosina deaminasa de rata (rAPOBEC1) fusionada a una dCas9 y asociada al RNA guía. El complejo se une al DNA diana en el bucle R donde encuentra una ventana de edición en la que genera la desaminación de la C, que pasa a U. Posteriormente el sistema de reparación del DNA lee el U como T y produce el cambio de bases C·G>T·A. Una segunda generación de CBEs, fusiona al N-terminal de la dCas9 una UGI que evita que las uracil N-glicosilasas (UNGs) endógenas revertan el cambio producido por el editor aumentando la frecuencia del cambio. Tras esto, han ido surgiendo nuevas generaciones que incorporan nuevas mejoras de editores y nucleasas. La tercera generación emplea nCas9 en vez de la dCas9 anterior, aumentando la eficiencia de la edición y disminuyendo los de off-targets. Finalmente, la cuarta generación emplea dos proteínas UGI en el N-terminal de la nCas9 y una proteína de unión al DNA del bacteriófago Mu (GAM) unida al C-terminal del editor (Azameti y Dauda, 2021).

En el presente trabajo se emplea un editor de citosina de tercera generación con A3A-PBE, una citosina deaminasa humana, con una ventana de edición de 17 pb (*Figura 2*). Esto supone una ventaja frente a la de rata (rAPOBEC1) cuya ventana de edición es de solo 5 pb y que resulta ineficaz en secuencias ricas en GC (Zong et al., 2018; Gehrke et al., 2018).

Por otro lado, los **ABEs** se componen de una adenina deaminasa sintética unida a una nCas9 y al RNA guía. En este caso, el complejo se une al ssDNA y produce la desaminación de la A a inosina, que se lee como guanina, lo que produce el cambio A·T>G·C. En este caso no es necesario un inhibidor de la actividad de la alquil adenin DNA glicosilasa (AAG). La primera generación de ABEs surgió a partir de los CBEs de tercera generación, al sustituir APOBEC1 por una adenina deaminasa natural de *Escherichia coli* (TadA) y eliminar UGI. Posteriormente se fueron sucediendo generaciones de ABEs donde la eficiencia de desaminación para secuencias más diversas va aumentando progresivamente (Mishra et al., 2020; Gaudelli et al., 2017).

En este trabajo se emplea el editor ABE8e (*Figura 2*), desarrollado por evolución asistida por fagos a partir del TadA de séptima generación y con menor producción de *off-targets* que este (Richter et al., 2020; Sheriff et al., 2022).

Finalmente, se desarrollaron los **CGBEs**, en los que no nos detendremos en este trabajo, pero que produce transversiones (C·G>G·C) gracias al empleo de una citosina deaminasa y un UNG unidos a una nCas9 (D10A).

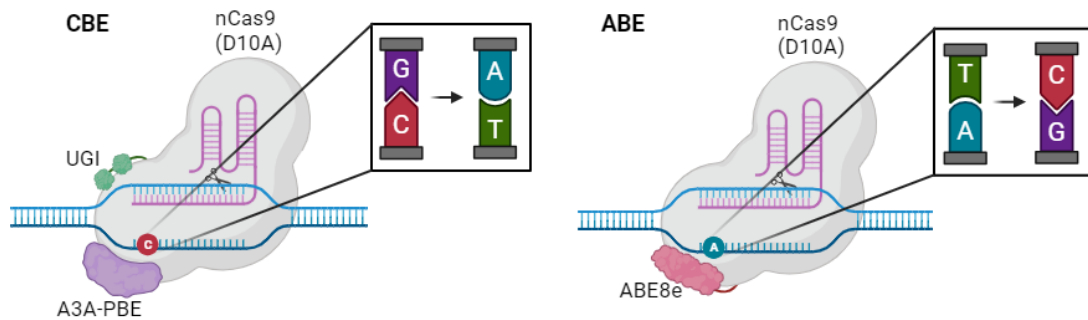


Figura 2. Ilustración que muestra un ejemplo de los dos tipos de editores de bases empleados en el trabajo en Cas9 con cada una de sus componentes y los cambios que realiza cada uno en la cadena a la que se une el guía y en la complementaria. Elaboración propia.

Estos tipos de editores de bases de DNA se pueden emplear de forma individual en el caso del *single-base-editing*, o combinarse para producir cambios de índole más compleja en el caso del *multi-base-editing*. La técnicas *multi-base* combinan en una misma proteína Cas varios editores diferentes que producirán cambios en una misma secuencia diana; así combinando una citosina deaminasa y una adenina deaminasa se podrían generar simultáneamente los cambios C·G>T·A y A·T>G·C (Sakata et al., 2020).

Además, las técnicas de edición de bases se pueden combinar con las producción de InDels como en el caso de la herramienta SWISS (*Simultaneous Wide-editing Induced by a Single System*), una herramienta muy novedosa que ha permitido mutar 3 secuencias del genoma de arroz de forma simultánea, cada una de ellas con una mutación diferente: ABE, CBE e InDel (Li et al., 2020).

1.4.3. Aplicaciones de las técnicas de *Base-editing*

En el contexto de la Biotecnología Vegetal las aplicaciones más destacas del *Base-editing* son la genómica funcional de plantas y la mejora vegetal (Azameti y Dauda, 2021).

En cuanto a la **genómica funcional**, las técnicas de *Base-editing*, al igual que otras técnicas de mutagénesis, permiten alterar la secuencia génica de un gen concreto y, con ello, la funcionalidad del producto de dicho gen. Esto es interesante a la hora de estudiar los sitios de acción de hormonas o ligandos o los sitios catalíticos de enzimas, que serán posteriormente dianas de los proyectos de mejora (Sun et al., 2016; Bahrat et al., 2020; Azameti y Dauda, 2021).

En el caso de la **mejora vegetal**, las técnicas de *Base-editing* resultan muy prometedoras debido a que, como se comentó en la *sección 1.4.1*, la mayoría de los rasgos agronómicos de interés dependen de SNPs. Estas técnicas han permitido acortar los programas de mejora vegetal en multitud de especies vegetales de interés. Algunas de las especies donde se ha avanzado más significativamente son el arroz, el maíz, el algodón, la colza, el tomate, la fresa o la sandía; y los campos de mayor avance son el aumento del rendimiento, el aumento de la resistencia a estrés, aumento de la resistencia a herbicidas y modificación de la calidad y composición nutricional de plantas de interés alimentario (Li, J. et al., 2023).

1.5. Sistemas reporteros en Biología Sintética

1.5.1. Importancia de los sistemas reporteros en Biología Sintética

El desarrollo de reporteros cuantitativos que funcionen como outputs de circuitos biosintéticos es fundamental para el campo de la Biología Sintética. Este tipo de reporteros, fluorescencia, luminiscencia o absorbancia, permiten traducir los parámetros del sistema a datos numéricos que se pueden tratar matemáticamente. A diferencia de los datos cualitativos, los datos numéricos aportan información más objetiva, fiel y robusta sobre el sistema y se pueden someter a análisis de tipo estadístico, por lo que estos reporteros son la mejor opción a la hora de entender y monitorizar sistemas biológicos sintéticos (Wang et al., 2013; Calvache et al., 2023).

1.5.2. Sistemas reporteros de edición genética y de bases

El gran avance de la técnica CRISPR ha llevado asociado el desarrollo de numerosas herramientas de edición génica y de bases que permiten acelerar los programas de mejora vegetal. Sin embargo, la detección de la edición llevada a cabo por parte de estos sistemas basados en CRISPR sigue siendo un cuello de botella, tanto para la selección de los organismos que han sido editados, como para la determinación de la eficiencia de estas herramientas es un cuello de botella en la mejora.

En la actualidad resulta sencilla la selección de sistemas biológicos donde se haya producido la integración y expresión de un transgén, como por ejemplo un transgén que codifica para un sistema de edición, pues basta con incluir en el mismo T-DNA un gen reportero o un marcador de selección. Sin embargo, no resulta tan sencilla la selección de los sistemas biológicos en los que la edición genética o de bases derivada de la expresión de dicho transgén ha tenido lugar.

Es por ello, que el reto actual para el avance de la creación y optimización de sistemas de edición génica y de bases es el desarrollo de herramientas capaces de informar de la funcionalidad y eficiencia de los guías. Estos reporteros deben ser capaces de transformar los cambios en señales que sean estables, sencillas y baratas de detectar, cuantificables, con amplio rango dinámico y ortólogas a los mecanismos de regulación del organismo en el que se emplean (Engstrom y Pflieger, 2017; Zeng et al., 2019; Schaumberg et al., 2016).

Con respecto a los **editores genéticos**, la frecuencia de InDels se cuantifica frecuentemente por técnicas como el TILLING (*Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*), que detecta *mismatches*; RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que emplea enzimas de restricción para la detección de mutaciones en los sitios de restricción; o la PCR fluorescente, los ensayos de DNA *melting* o la secuenciación masiva (Till et al., 2004; Hendel et al., 2015).

Estas técnicas están siendo sustituidas en la actualidad por otras que requieren un menor coste temporal; en el caso de las plantas, destacan aquellas que emplean señales de fluorescencia o luminiscencia. Ambos sistemas reporteros de InDels se basan en el mismo principio, al producirse la edición en una proteína fluorescente o en una luciferasa que se encuentra fuera del marco de lectura, esta restaura su funcionalidad. Además, en este tipo de sistemas se debe incluir un control positivo de la expresión, normalmente una proteína fluorescente, que permita estimar los eventos de edición y los de transformación (Jiang et al., 2013; Budhagatapalli et al., 2015). Actualmente, se está trabajando con la probabilidad de ejercer el cambio inverso y lograr la reducción de la señal de un reportero funcional cuando este es mutado. Este tipo de planteamientos requieren una gran eficacia en la edición, ya que la supresión de la señal es más difícil de evaluar que su aparición.

Sin embargo, este tipo de sistemas no son capaces de evaluar dianas específicas, sino aquellas que se encuentren en los reporteros que se emplean, es por ello que se han desarrollado nuevos sistemas que fusionan la proteína con la secuencia de interés *upstream* a estos reporteros fuera del marco de lectura, de forma que su funcionalidad se restaura cuando muta la proteína de interés (Tálas et al., 2017).

Actualmente, se ha desarrollado un sistema denominado BETLE (**Bivalent Enhanced Traffic Light Reporter**) que no solo permiten monitorizar la eficiencia de edición para cualquier secuencia, sino que ofrecen información sobre las células donde se da la edición, la especificidad del guía por la diana, el efecto de la NHEJ sobre la pauta de lectura y si se produce o no HDR en el caso de incorporar un DNA exógeno.

Los **sistemas de edición de bases** también precisan este tipo de reporteros de los cambios de base, ya que la secuenciación del DNA genómico es la única técnica de amplio uso para su detección (Coelho et al., 2018).

En este caso, se han planteado diversos sistemas reporteros de este tipo de cambios, pero ninguno de los presentes actualmente en la bibliografía tiene la versatilidad para permitir la evaluación de una guía cualquiera sino que se evalúan atendiendo al efecto que los cambios de base concretos tienen en la proteína final.

En el caso de que el cambio de base se de en un codón clave para la traducción de una proteína reportera podríamos evaluar el cambio en base a la señal del reportero, pues esta se vería mermada. Este es el caso del sistema CRISPR *Start-loss*, donde el cambio de base conduce a la eliminación del codón de inicio de la traducción (Chen et al., 2020), y el del sistema CRISPR-STOP, donde el cambio de base lleva a la aparición de un codón de STOP (Kuscu et al., 2017).

Del mismo modo, si el cambio de base se da en el un codón de gran importancia para la actividad de la proteína reportera también podríamos evaluarlo. Este es el caso de eGFP (**Enhanced Green Fluorescent Protein**), que se ha empleado para evaluar ciertos sistemas CBE que dirigen la edición a tres a codones clave para su actividad (Martin et al., 2019). En este ámbito destaca el sistema BE-FLARE (**Base Editng Fluorescence Activity Reporter**) que permite evaluar sistemas ABE dirigidos al centro catalítico de eBFP (**Enhanced Blue Fluorescent Protein**), ya que el cambio de base produce el desplazamiento de la fluorescencia de esta proteína hacia la del eGFP (Coelho et al., 2018).

Con todo esto resulta sencillo deducir la importancia que tiene el desarrollo de estos sistemas reporteros de edición genética y de bases, ya que del avance de los sistemas de monitorización de los cambios genéticos y de bases depende el desarrollo de los propios sistemas que dan lugar a este tipo de cambios.

1.5.3. Sistemas reporteros basados en bioluminiscencia

En el presente trabajo se emplean dos sistemas reporteros, el de fluorescencia, que emplea proteína verde fluorescente mejorada (eGFP), como estándar, y el de bioluminiscencia (Luc), basado en la ruta de bioluminiscencia del hongo *Neonothopanus nambi*.

La vía de bioluminiscencia de hongos o ***fungus bioluminiscence pathway (FBP)*** es una ruta circular con cuatro pasos catalizados por cuatro enzimas que no poseen homólogos en plantas (*Figura 3*). Sin embargo, sí que emplea como sustrato un metabolito muy abundante en plantas, el ácido cafeico, muy presente en *N. benthamiana* (Calvache et al., 2023).

La FBP, partiendo del ácido cafeico, es transformada por la **enzima hispidina sintasa (Hisps)** en hispidina que, posteriormente se transforma en 3-hidroxihispidina por acción de la hispidina-3-hidroxilasa. La 3-hidroxihispidina es transformada por la luciferasa (LUC) en ácido cafeilpirúvico en un proceso que libera un fotón, que es el causante de la producción de bioluminiscencia en la reacción. Finalmente, la última enzima, la cafeilpiruvato hidroxilasa (CPH) cierra el ciclo al descomponer el ácido cafeilpirúvico en ácido cafeico y ácido pirúvico (Klotobay et al., 2018; Calvache et al., 2023).

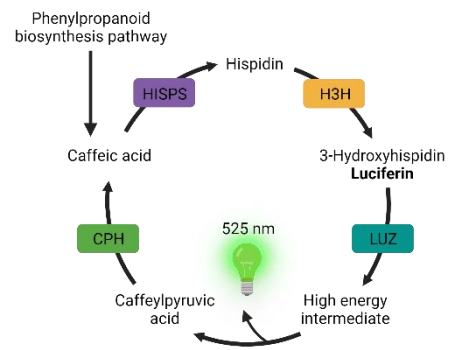


Figura 3. Esquema de la vía de luminiscencia de hongos (FBP) (Calvache et al., 2024)

Este sistema reportero emplea el gen *Hisps* como conexión entre el sistema reportero y el resto de elementos upstream del circuito sintético. Así, el sistema reportero que emplea el cociente Luc/eGFP, resulta un sistema de amplio rango dinámico para el estudio del funcionamiento de sistemas sintéticos. Es por esto por lo que el gen *Hisps* resulta el gen clave de la ruta de bioluminiscencia y, por ello, se emplea como diana de los sistemas de edición génica en el presente trabajo (Calvache et al., 2023).

1.6. Ensamblaje modular GoldenBraid

El clonaje modular es una estrategia de amplio uso en Biología Sintética que permite la creación de nuevas secuencias de DNA empleando unidades estandarizadas obtenidas previamente. El ensamblaje de estas piezas se logra mediante un proceso de estandarización que permita el diseño de los módulos de forma que sean compatibles e intercambiables. Esto permite la creación de circuitos genéticos complejos de una forma técnicamente simple, rápida, versátil y con bajo coste y, con ello, el establecimiento de colecciones de módulos genéticos funcionales que pueden ser compartidas por distintos grupos de investigación de forma sencilla (Ellis et al., 2011; Hughes et al, 2017; Heinemann y Panke, 2006).

Entre las diversas técnicas de clonaje modular en el presente trabajo se empleará el **sistema GoldenBraid**, basado en el sistema GoldenGate, para la creación de editores genéticos y de bases. Esta tecnología permite el ensamblaje de varios módulos génicos en una sola reacción de restricción-ligación, de forma eficiente, reusable y sin producir cicatrices (Sarrión-Perdigones et al., 2013).

GoldenBraid emplea **enzimas de restricción tipo IIS**, concretamente BsmBI y BsaI, que son las que, gracias al diseño estandarizado de las unidades, permiten que los ensamblajes se den sin cicatrices y de forma reusable. Estas enzimas son capaces de reconocer una secuencia determinada, como todas las enzimas de restricción tipo II, sin embargo, no cortan en el punto de reconocimiento, sino en una secuencia adyacente. Así, con el corte, se producen extremos cohesivos de 4 nucleótidos, que son la base de la gramática del sistema pues están diseñados para permitir el ensamblaje modular.

El sistema de ensamblaje GoldenBraid comienza con la domesticación de las piezas (nivel 0), que consiste en la normalización de la secuencia respecto a la gramática del sistema. Este proceso consiste en la introducción, a ambos lados de la secuencia de interés, de sitios de reconocimiento BsmBI y la eliminación de todos los sitios internos de la secuencia que puedan ser reconocidos por esta enzima y por BsaI. Además, se añade a la secuencia, en una posición más interna que los sitios de reconocimiento de BsmBI, una secuencia de 4 nucleótidos, que identifica a la pieza

dentro de la gramática GoldenBraid. Una vez domesticada la secuencia, se clona en un vector pUPD2 empleando la enzima BsmBI y una ligasa. Cuando la secuencia se encuentra insertada en el vector pUPD2 queda flanqueada por dos sitios de reconocimiento Bsal de dicho vector, que orientan el corte de esta enzima hacia los 4 nucleótidos añadidos en la domesticación.

Posteriormente, estas secuencias domesticadas en nivel 0 pueden empujarse en un ensamblaje multipartito (nivel 1) para formar unidades transcripcionales (TUs). Este ensamblaje está mediado por Bsal, que libera cada una de las piezas de los vectores de nivel 0, y T4 ligasa, que sella la unión entre las secuencias que tienen los 4 nucleótidos flanqueantes complementarios. En esta reacción participa un vector de destino, donde se incorporan las unidades ensambladas y que posee, por tanto, complementariedad con los extremos 5' y 3' de la primera y la última unidad, respectivamente (Figura 4). Este vector de destino se denomina α y posee sitios de reconocimiento por Bsal que se liberan del vector nativo con el corte, lo que hace estable la unión TU-vector α . Además, contiene dos sitios de reconocimiento BsmBI que permanecen en el vector tras la ligación y flanquean la TU, permitiendo su escisión en el siguiente paso.

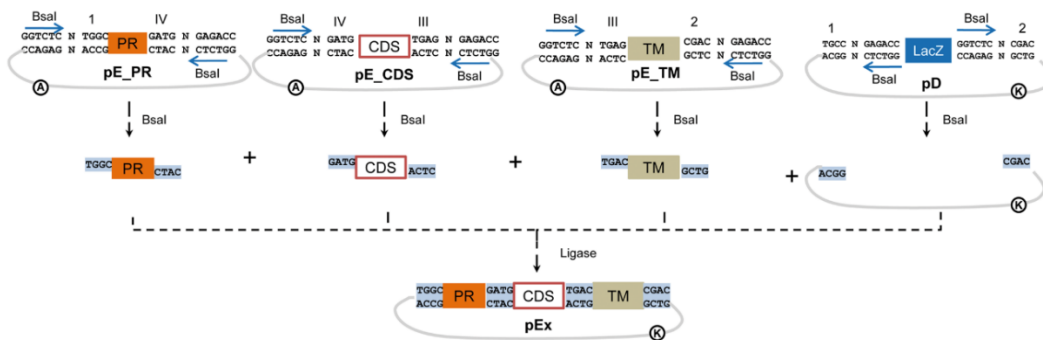


Figura 4. Esquema genérico del ensamblaje de una TU en un plásmido α (nivel 1) mediante el sistema de clonaje modular GoldenBraid (Sarrión-Perdigones et al., 2013).

Una vez llegados al nivel 1 podemos continuar con el ensamblaje de dos TU en nivel 2. En este proceso participan BsmBI, que escinde las TU de dos vectores α , y T4 ligasa, que une las TU por la complementariedad de uno de sus extremos. Los dos extremos que quedan libres tras la unión de las TU se unen, de nuevo por complementariedad, a un nuevo vector de destino, vector Ω , que permite comenzar un nuevo ciclo de ensamblaje (Sarrión-Perdigones et al., 2013).

1.7. *Nicotiana benthamiana* como modelo vegetal

Nicotiana benthamiana es una planta de la familia de las Solanáceas endémica de Australia y descrita por primera vez por Benjamin Bynoe en 1837. Taxonómicamente, es considerada una especie derivada de un alotetraploide generado por la combinación de genomas diploides de la sección *Sylvestres* y *Noctiflorae* (Goodin et al., 2008; Knapp et al., 2004).

N. benthamiana es una planta modelo cuya importancia ha sido bien apreciada desde hace décadas al ser empleada como modelo para interacciones planta-patógeno y proteína-proteína. Esto es debido a su idoneidad como organismo para la infección viral y la expresión de genes exógenos, lo que la ha llevado a ser el organismo de elección para el empleo de vectores víricos, estudios de genética reversa por silenciamiento génico inducido por virus, síntesis de proteínas exógenas y expresión transitoria por agroinfiltración de hoja. Todas estas aplicaciones radican en dos aspectos en los que *N. benthamiana* destaca en sobremanera: la susceptibilidad a la infección de gran multitud de virus y la facilidad para la expresión de genes exógenos (Bally et al., 2018).

La razón por la que esta planta es el modelo empleado en el presente trabajo es por su capacidad para la **expresión de genes exógenos** y su **simplicidad de agroinfiltración**. *N. benthamiana* es capaz de expresar los transgenes que se le introducen por infiltración con *Agrobacterium tumefaciens* de forma rápida y elevada en 2-3 días tras la inoculación, Una expresión que se puede mantener durante varios días. Además, la hoja de *N. benthamiana* tiene un buen tamaño y se infiltra con facilidad (Bally et al., 2018).

Esta expresión rápida y elevada de genes exógenos es la que la hace interesante para estudios de edición génica y *Base-editing*, debido a que es capaz de expresar los genes que codifican el sistema CRISPR/Cas de forma transitoria con gran eficacia. Así, los efectos en el genoma de la acción de estos sistemas se pueden observar en *N. benthamiana* sin necesidad de hacer transformación estable. Un segundo aspecto por el que se ha seleccionado esta planta es por la existencia de un genoma de calidad para *N. benthamiana*, lo que permite el diseño de RNA guías de forma fiable (Ranawaka et al., 2023). Por estas razones, *N. benthamiana* permite la comparación y optimización de sistemas de *Base-editing* de forma rápida.

2. Objetivos

Este Trabajo de Fin de Máster tiene como objetivo general la creación y evaluación de sistemas de edición génica y de bases basados en la tecnología CRISPR/Cas9 y CRISPR/Cas12.

Con este objetivo general surgen varios objetivos específicos:

- Diseño, construcción y evaluación de la eficiencia de editores de adenina y citosina.
- Comparación de sistemas de edición basados en nCas9 (D10A) y nCas9 (H840A).
- Comparación de los sistemas de edición basados en nCas9 y dCas12.
- Comparación de los sistemas de edición basados en Cas intronizadas y Cas sin intronizar.
- Evaluación del empleo de la ruta de la bioluminiscencia como sistema reportero de edición genética.

3. Materiales y métodos

3.1. Material vegetal

En el presente trabajo se emplean plantas de *Nicotiana benthamiana* LAB strain (Kurotani et al., 2023).

3.2. Cultivo y manipulación de microorganismos

3.2.1. Cepas bacterianas empleadas y condiciones de crecimiento

En los procesos de clonación de plásmidos se emplea *Escherichia coli* DH5 α (*E. coli*), una cepa que posee ciertas mutaciones que favorecen su transformación y manejo permitiendo una mayor estabilidad del DNA exógeno, un mayor rendimiento en la recuperación del DNA y la posibilidad de emplear un método de screening blanco/azul en medio con IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido).

Por otro lado, para los procesos de agroinfiltración en *Nicotiana benthamiana* se emplea *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (*A. tumefaciens*), una cepa con alta eficiencia de transformación.

3.2.2. Medios de crecimiento de bacterias

El crecimiento de las bacterias se realiza en todos los casos en medios cuya base es el caldo LB (Luria Bertani), que consiste en una disolución acuosa de triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1% a pH 7.

A esta solución base se adiciona, en el caso de los medios sólidos, un 2% de agar bacteriológico americano. Además, se incorporan al medio, tras el proceso de esterilización por autoclave, los antibióticos y compuestos requeridos en cada caso como marcadores de selección. Estos compuestos y su concentración final de uso figuran en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Compuestos adicionados según requerimiento a la solución LB para la elaboración de medios de cultivo y su concentración final en dicho medio.

Compuesto	Concentración
Cloranfenicol	50 mg/L
Ampicilina	100 mg/L
Kanamicina	50 mg/L
Espectinomicina	100 mg/L
Rifampicina	50 mg/L
X-Gal	40 mg/l
IPTG	0.5 mM

Por otro lado, en los protocolos de transformación de *E. coli* se emplea un medio adicional que maximiza la eficacia de los procesos de transformación bacterianos, el medio SOC. Este medio líquido consiste en una disolución acuosa con un 2% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, 10 mM, 2.5 mM de KCL, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20 mM de glucosa.

3.2.3. Transformación de *Escherichia coli*

Para la transformación de *E. coli* con los plásmidos generados en este trabajo se emplea el kit *Mix & Go!* (Zymo Research).

En el proceso se transforma una alícuota de 80 μL de células quimiocompetentes empleando 1 μL de plásmido, en el caso de plásmidos obtenidos de miniprep, o 5 μL de producto de reacción de ensamblaje GoldenBraid. Tras la adición de este volumen se incuba 5 minutos en hielo antes de añadir 300 μL de SOC e incubar la mezcla durante 1 hora y 30 minutos a 37 °C y agitación a 225 rpm. Finalmente, se toman 100-300 μL de esta mezcla y se siembran en placas con 25 mL de LB sólido con los suplementos correspondientes para la selección de las colonias transformadas.

Una vez obtenida una colonia positiva y verificada la identidad de su plásmido por digestión enzimática con enzimas de restricción, es inventariada y almacenada a -80 °C en forma de stock de glicerol 20%.

3.2.4. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación de las células de *A. tumefaciens* se realiza por electroporación empleando 25 μL de células electrocompetentes a las que se añaden 25 μL de glicerol 2% y 1 μL de plásmido. Posteriormente, se transfiere la mezcla a una cubeta de electroporación y se aplica una corriente de 1440 V durante 5 ms. Tras esto se recuperan las células con 300 μL de SOC y se incuban a 28 °C y en agitación a 225 rpm durante 2 horas.

Finalmente, se toma todo el volumen y se siembra en una placa de 25 mL de LB sólido con los suplementos correspondientes para seleccionar las colonias transformadas. Una vez obtenida una colonia positiva y verificada la identidad de su plásmido por digestión enzimática, esta es inventariada y almacenada a -80 °C en forma de stock de glicerol 20%.

3.3. Manipulación y purificación de ácidos nucleicos

3.3.1. Extracción de DNA genómico

El material de partida para la extracción del DNA genómico son tres discos de hoja, obtenidos con un sacabocados de 1 cm de diámetro de las hojas 1, 2 y 3 (en sentido acrópeto) de una planta de *Nicotiana benthamiana* e inmediatamente congelados con nitrógeno líquido.

Para la extracción del DNA genómico se emplea el protocolo de extracción con CTAB. En primer lugar, las muestras son trituradas en un homogeneizador de tejidos (*Retsch Mill MM400*) en 3 ciclos de 30 s y frecuencia de agitación de 30 s^{-1} . Al polvo resultante se le añaden 600 μL de tampón CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) 2% (m/v), Tris-HCl 100 mM pH 8, ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 20 mM pH 8, NaCl 1.4 M, polivinilpirrolidona (PVP) 1% y 2% (v/v) β -mercaptoetanol) y se incuba 45 minutos a 65 °C mezclando por inversión cada 10-15 minutos.

Tras la incubación se añaden 600 μL de cloroformo:isoamilalcohol (24:1) y se agita vigorosamente en vortex; se centrifuga 15 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente y se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio. En este nuevo tubo se añade un volumen de isopropanol frío, se mezcla por inversión y se deja 5 minutos en hielo. Posteriormente se centrifuga 10 minutos a 13.000 rpm y a 4 °C, se elimina el sobrenadante y se lava el pellet con 600 μL etanol 80% frío centrifugando de nuevo 5 minutos a 13.000 rpm. Finalmente, tras eliminar el sobrenadante, se deja secar el pellet y se resuspende en 30-40 μL de agua miliQ estéril.

Hecho esto, se mide la concentración y pureza del DNA extraído en el *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer v3.8.1* (*NanoDrop Technologies, Inc.*).

3.3.2. Extracción de plásmidos

Para la extracción de DNA plasmídico se parte de un cultivo líquido bacteriano y se sigue el protocolo de kit comercial. En el caso de *E. coli* se emplea el kit *NZYMiniprep (NZYTech)* y, para *A. tumefaciens*, el kit *PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen)*.

En ambos casos se siguen los protocolos y especificaciones dictadas por la casa comercial y, posteriormente, la concentración y pureza de las muestras se miden en *el NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer v3.8.1 (NanoDrop Technologies, Inc.)*.

3.3.3. Digestión enzimática de DNA

Con el objeto de verificar que las construcciones se obtienen conforme al diseño experimental se emplea la digestión por enzimas de restricción.

Previamente a cada una de las digestiones se simula una digestión *in silico* empleando el software *Benchling (www.benchling.com)* donde obtenemos la digestión teórica de nuestro plásmido creada virtualmente y el resultado de correr el producto de la digestión en gel de agarosa.

La digestión enzimática de los plásmidos se realiza empleando 10-20 U de la enzima de restricción y 1.5 μ L del buffer correspondiente en un volumen total de 15 μ L donde se añaden 200-450 ng de plásmido. La reacción se realiza durante 1 h a 37 °C.

3.3.4. Electroforesis en gel de agarosa

La visualización de los fragmentos de DNA resultantes de los procesos de digestión de plásmidos se realiza por electroforesis en gel de agarosa del resultado de cada reacción de digestión.

Los geles empleados se preparan con TAE 1x (40 mM Tris-acetato y 1 mM de EDTA), 1% bromuro de etidio y 1-1.5% de agarosa, en función del tamaño de fragmento esperado. Para la carga de la muestra se empleó el tampón de carga *Gel Loading Bye Purple 6x (New England Biolabs)* y como marcador de peso molecular, *Gene ruler kb Plus DNA Ladder (ThermoScientific)*. Las condiciones de la electroforesis fueron 90-100 V, 400 mA y 30-45 minutos, según se requiriera.

3.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se emplea, tanto para la modificación de secuencias de fusión de secuencias en vectores pUPD2, como para la amplificación específica de los fragmentos editados del DNA genómico de *N. benthamiana*.

En el primer caso, la domesticación de los sitios de fusión de iCas12 y dCas12i, se emplea una polimerasa de alta fidelidad, *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific)* cuyo Este procedimiento de cambio de sitio se detalla en la *sección 3.4.2* del trabajo.

Finalmente, para la amplificación de los fragmentos de DNA editados se empleó una tercera enzima, *MyTaq DNA Polymerase (Bioline)*. La reacción se lleva a cabo en un volumen total de 50 μ L con 0.1 U/ μ L *MyTaq DNA Polymerase*, 10 μ L *MyTaq Reaction Buffer 5x (Bioline)*, 2 μ L de cada uno de los cebadores (10 μ M) y 200 ng de DNA molde. En este caso, los cebadores están especialmente diseñados para la amplificación específica de la secuencia diana de la edición evitando la amplificación de sus homeólogos (*Tabla 2*). Esta especificidad se logró empleando los softwares *Benthamania (www.nbenth.com)* y *Sol Genomic Network (www.solgenomics.net)* para la obtención de secuencias y las herramientas *Benchling (www.benchling.com)* y *Primer3 versión 4.1.0 (www.primer3.ut.ee)* para el diseño de los cebadores específicos para la amplificación de la secuencia de interés. Para el diseño de los cebadores se optó preferentemente por aquellos que tuvieran una longitud de 18-22 nucleótidos, un contenido de

GC del 40-60%, una temperatura de melting de en torno a 55 °C y que sus productos de reacción fueran menores a 900 pb. Este mismo procedimiento se siguió para el diseño de los cebadores de secuenciación que figuran en la *Tabla 3* de la sección 3.3.7.

Tabla 2. Cebadores empleados para la amplificación por PCR de las secuencias diana de la edición de bases.

Cebador	Secuencia
ETR forward	TGCAGTTATGTTTCAGTGTCTGATTC
ETR reverse	ATTCACGATCAAGCCGTGC
FT forward	CTAGAAAACCTATGGCTATAAGGG
FT reverse	GTTCTCGAGAGGTATAATATAGGC
PDS1 forward	CAGCGTTGATTATGCAAACCTCC
PDS1 reverse	CTAACATGATTTACAGCTTTGGTAG
PDS-T2 forward	AAAGAGAGAGAGGTGCTTTATCC
PDS-T2 reverse	TGTTCTTACACTATGAGAAAAATTAGCC

En todos los casos las PCR se realizaron en un equipo termociclador *SureCycler 8800* (*Agilent technologies*) y las condiciones de PCR fueron las indicadas por la casa comercial de la enzima polimerasa empleada y atendiendo a las características de los cebadores que fueron sintetizados por *Integrated DNA Technologies*.

3.3.6. Purificación de productos de PCR

Las secuencias de DNA genómico de *N. benthamiana* amplificadas por PCR, tras verificar la correcta amplificación por electroforesis en gel de agarosa, se someten a un protocolo comercial de purificación empleando el kit *NucleoSpin Gel and PCR clean-up* (Macherey-Nagel).

Una vez purificado se mide la concentración y calidad del DNA purificado empleando NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer v3.8.1 (*NanoDrop Technologies, Inc.*).

3.3.7. Secuenciación Sanger

La secuenciación de plásmidos y de los fragmentos de DNA editados, amplificados y purificados de las hojas de *N. benthamiana* fue realizada por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC) empleando los cebadores, mostrados en la *Tabla 3*, y sintetizados por *Integrated DNA Technologies*.

Tabla 3. Cebadores empleados para la secuenciación Sanger de las secuencias diana de la edición de bases.

Cebador	Secuencia
ETR seq	ATTCACGATCAAGCCGTGC
PDS1 seq	GCAATGAACACCTCATCTGTCA
PDS-T2 seq	ATAAGCAAAGAAGGAAAAGCAAATACTA
FT seq	AGGTACGAAGGTCATCTCCTC

3.3.8. Cuantificación de la edición de bases

La cuantificación del porcentaje de edición para cada una de las posiciones de la secuencia del RNA guía se realizó analizando los resultados de la secuenciación Sanger empleando el software EditR (www.baseeditr.com) (Kluesner et al., 2018).

3.4. Ensamblaje modular GoldenBraid (GB)

3.4.1. Ensamblaje de gRNAs de Cas12

El primer paso para lograr la introducción de la secuencia guía en un plásmido pUPD2 apto para el clonaje GoldenBraid es la domesticación. Este proceso de domesticación consiste en la adaptación de la secuencia a introducir, en este caso el gRNA para Cas12, a la gramática GoldenBraid.

En el caso concreto de la domesticación de una guía no es precisa la introducción de la secuencia en un plásmido pUPD2 de nivel 0, sino que la guía se introduce directamente en un vector pDGB3_alpha1 empleando dos cebadores solapantes con la secuencia a introducir y con los extremos cohesivos al punto de inserción en la construcción GoldenBraid. Los cebadores empleados para la clonación de los guías fueron diseñados para las secuencias dianas del gen HISPS gracias al software de GB clonning (www.gbcloning.upv.es) y se muestran en la *Tabla 4*. En negrita se resaltan las partes de la secuencia que corresponden a los extremos cohesivos correspondientes a la gramática GoldenBraid.

Tabla 4. Cebadores empleados para la domesticación en pUPD2 de las secuencias guía del gen HispS.

Nombre	Cebador forward	Cebador reverse
gH1 (Cas12)	AGAT ATCCTCACCAAAGCACAATCCCG	GGCC CGGGATTGTGCTTTGGTGAGGAT
gH2 (Cas12)	AGAT TGCTGGGAGGCCTTAAGGCCCTG	GGCC CAGGGCCTTAAGGCCTCCCAGCA
gH3 (Cas12)	AGAT CGAGTCCTCCCTTATATCAAGAG	GGCC CTTTGATATAAGGGAGGACTCG
gH1 (Cas9)	GATT GACGGGATGACCAGGCAAGA	AAACT TTCCTGGTCATCCCGTC
gH2 (Cas9)	GATT GAATGTTAAGATCACATGCA	AAACT GCATGTGATCTTAACATTC
gH3 (Cas9)	GATT GGACGGTTGGGATCGGGGAA	AAACT TCCCCGATCCCAACCGTCC

En este caso el punto de inserción es la posición B2e-B6c entre el promotor de la DNA polimerasa III (GB1443) que se encuentra en posición A1-B2e y la señal de procesamiento 3' de la ribozima hammerhead del virus de la hepatitis delta (GB1444) en posición B6c-C1. El ensamblaje de las distintas unidades en el vector de destino se produce en una única reacción de restricción-ligación donde BsaI genera los extremos cohesivos correspondientes entre cada uno de los elementos como se muestra en la *Figura 5*.

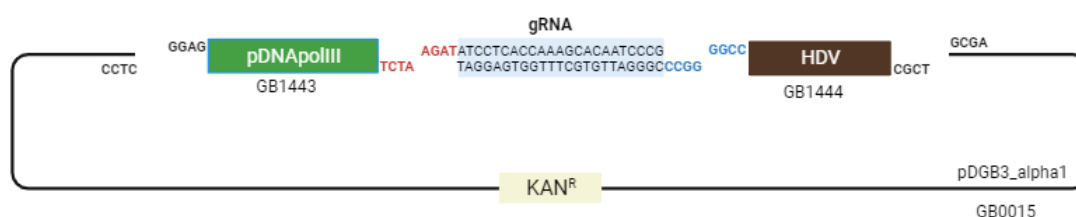


Figura 5. Esquema que muestra el ensamblaje del dímero de cebadores que componen un guía de Cas12 con el promotor de la DNA polimerasa III y la señal HDV en un vector de destino pDGB3_alpha1. Los guías de Cas9 fueron elaborados en un trabajo previo de Marta Vázquez Vilar. Elaboración propia.

La reacción de ensamblaje de los elementos en el vector final se realiza en presencia de 20 fmol de cada uno de los plásmidos (GB0015, GB1443 y GB1444), 0.6 μ L de una mezcla de los cebadores (0.5 μ M cada uno) (*Integrated DNA Technologies*), 8 U de BsaI-HFv2 (*New England Biolabs*), 4 U T4 ligasa (*Promega Corporation*), 1.5 μ L T4 ligase buffer 10x (*Promega Corporation*) y 0.1 mg/mL BSA en un volumen final de 15 μ L. Las condiciones de la reacción se muestran en la *Tabla 5*.

Tabla 5. Condiciones de la reacción de restricción-ligación para el ensamblaje de módulos GoldenBraid.

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

3.4.2. Domesticación de secuencias iCas12 y dCas12i

Las secuencias disponibles de iCas12 y dCas12i en vectores nivel 0 se encontraban adaptadas a la gramática GoldenBraid pero las necesidades del diseño experimental requirieron un proceso que modificara un sitio de fusión B4 (TTCG) por uno B5 (GCTT). Para lograr este tipo de cambio se realiza una PCR con una polimerasa de alta fidelidad *Phusion HF DNA Polymerase* (ThermoFisher Scientific). Para la reacción se emplean 0.02 U/ μ L de *Phusion HF DNA Polymerase*, 10 μ L *Phusion HF Buffer 10x* (ThermoFisher Scientific), 1 μ L dNTPs (10 mM), 2.5 μ L de cada uno de los cebadores (10 μ M), 3% DMSO y 1 ng de DNA molde; todo en un volumen total de 50 μ L. Las condiciones de la reacción se muestran en la *Tabla 6*.

Tabla 6. Condiciones de la reacción de cambio de sitio de las secuencias iCas12 y dCas12i.

Etapas	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Desnaturalización inicial	1	98	30
Desnaturalización	35		63.5
Alineamiento		30	
Elongación		72	150
Elongación final	1		600

En este caso los cebadores deben ser diseñados para que su porción 3' alinee con las porciones a conservar de la secuencia molde e incluir, en su extremo 5', las secuencias a añadir. Estos cebadores, que se muestran en la *Figura 6*, se diseñaron de tal forma que permiten, por un lado, la amplificación de la secuencia de iCas12 y dCas12i con sitios B3-B5; y, por otro lado, flanquear esta secuencia con las secuencias de reconocimiento y corte específicas para su clonación en un vector pUPD2 empleando BsmBI, además de con 3 nucleótidos adicionales que mejoran la eficiencia de corte.

En el primer reverse se incluye el codón de STOP ópalo (UGA), que pone fin a la traducción de la proteína, ya que este no está presente en las secuencias B3-B4 pues se emplean para producir proteínas de fusión en C-terminal.

	Secuencia	Tm
Cebador forward	TGA CGTCTC A CTCG AATG CTGCAGCCTAAGAAGAAG	55.0 °C
Cebador reverse	TAG CGTCTC G CTCA AAGC TCA CTTTTTCTTTTTTGCCTGGCCG	55.9 °C

3 nts adicionales

Sec. reconocimiento BsmBI

1 nt adicional

Sec. corte BsmBI

Sec. de fusión B3/B5

Codón STOP

Secuencia iCas12/dCas12i

Figura 6. Esquema que muestra los cebadores empleados para la reacción de cambio de sitio de iCas12/dCas12i con cada una de las partes que lo componen. Elaboración propia.

El producto de PCR, una vez sintetizado, se introduce en un vector pUPD2 (*Figura 7*) donde queda flanqueado por sitios de reconocimiento Bsal. Para lograr este plásmido inserto-pUPD2, se emplea una reacción de restricción-ligación (*Tabla 5 sección 3.4.1*) en la que intervienen 60 fmol del producto de PCR purificado, 20 fmol de plásmido pUPD2 vacío (GB0307), 8 U de BsmBI-HFv2 (*New England Biolabs*), 4 U T4 ligasa (*Promega Corporation*), 1.5 µL T4 ligase buffer 10x (*Promega Corporation*) y 0.1 mg/mL BSA en un volumen final de 15 µL.

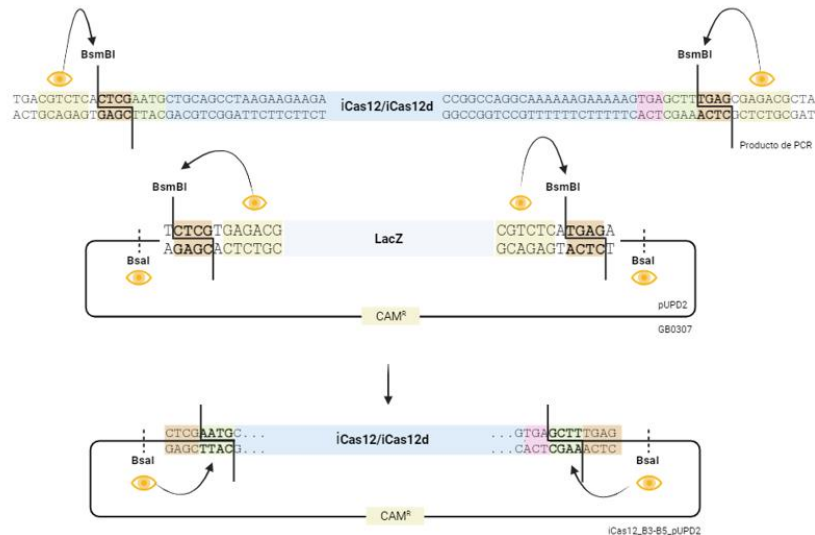


Figura 7. Esquema que muestra la introducción del producto de PCR resultante de la reacción de cambio de sitio en un vector pUPD2. Elaboración propia

La correcta incorporación de la secuencia con el nuevo sitio de fusión (B5) al vector pUPD2. se comprueba por digestión enzimática con enzimas de restricción (sección 3.3.3) y la ausencia de mutaciones en la secuencia clonada por secuenciación Sanger (sección 3.3.7). Para la secuenciación se emplean múltiples cebadores que cubrieran las 5 Kb de la iCas12 y dCas12i, espaciados unos 500-700 pb. En algunos casos se diseñan cebadores adicionales para secuencias problemáticas; todos ellos se muestran en la *Tabla 7*.

Tabla 7. Cebadores empleados para la secuenciación Sanger de iCas12_B3-B5_pUPD2 y dCas12i_B3-B5_pUPD2.

Cebador	Secuencia
pUPD2 forward	GCTTTCGCTAAGGATGATTCTGG
iCas12 forward	GCTGCAGCCTAAGAAGAAGAGAAAG
iCas12 reverse	TGAAGCTCAGGTAGTACCGATCC
iCas12 seq 1	CAAAGAGAAGATCCTGAACTCCGAC
iCas12 seq 2	GCGGAAGTCCTCAAGAAGATAGG
iCas12 seq 3	CGACAAGGATGATGTGAACGGC
iCas12 seq 4	GCATAAATGTACTTCAAGCTGCT
iCas12 seq 5	GTATTTGGCGTCAAATGAGTTTGCT
iCas12 seq 6	GCATTAACGAGAACTTGACCCGG
iCas12 seq 7	GGCTGGGACAAAGACAAAGAGAC
iCas12 seq 8	GGTACCATCCTGCGGTAC
iCas12 seq 9	AGGCAGAACTGGACTTCTATCG
iCas12 seq 10	GGCGATTCGTGCTGGCTTA
iCas12 seq 11	GCATAAATGTACTTCAAGCTGCT
iCas12 seq 12	CCCGAAGAAAACAACGTGTTTC
pUPD2 reverse	CAGGGTGGTGACACCTTGCC
pUPD2 reverse 2	GCGAGGAAGCCTGCATAACG

3.4.3. Ensamblaje de módulos Cas (nivel 1)

Una vez las secuencias se encuentran domesticadas e introducidas en vectores de nivel 0 es el momento de unir las secuencialmente en vectores de nivel 1, ya sean alpha 1 (GB0015) o alpha 2 (GB0017), para lograr ensamblar una unidad transcripcional completa (promotor-CDS-terminador). Cada uno de los elementos a unir están adaptados a la gramática GoldenBraid, lo que permite que cada elemento se ensamble en un orden concreto dependiendo de la categoría a la que pertenece.

Las unidades a ensamblar se corresponden, tanto con secuencias domesticadas en este trabajo, como con secuencias previamente domesticadas e introducidas en vectores de nivel 0 en otros proyectos (Grützner et al., 2020) o incluidas en la colección de GoldenBraid (*Tabla 8*).

Tabla 8. Módulos genéticos empleados en el trabajo especificando su descripción, categoría en la gramática GoldenBraid y origen.

Nombre del plásmido o ID	Descripción	Categoría GB	Autor
pAGM47523	iCas9	B3-B5	Grützner et al.
pAGT6469	nCas9i (D10A)	B3-B4	Grützner et al.
pAGM14759	nCas9i (D10A)	B3-B5	Grützner et al.
pAGT8162	dCas12i	B3-B4	Grützner et al.
pAGT8163	iCas12	B3-B4	Grützner et al.
dCas12i_B3-B5_pUPD2	dCas12i	B3-B5	Este trabajo
iCas12_B3-B5_pUPD2	iCas12	B3-B5	Este trabajo
GB0030	p35S	A1-B2	Colección GB
GB0036	t35S	B6-C1	Colección GB
GB0037	tnos	B6-C1	Colección GB
GB0222	p2x35S	A1-B2	Colección GB
GB0552	p35S (no ATG)	A1-B1	Colección GB
GB1690	nCas9 (D10A)	B3-B4	Colección GB
GB1691	nCas9 (D10A)	B3-B5	Colección GB
GB1820	UGI	B5	Colección GB
GB3876	ttLbCas12a	B3-B5	Colección GB
GB4420	dtLbCas12a	B3-B5	Colección GB
GB4423	ABE8e	B2	Colección GB
GB4425	ApoBEC3A	B2	Colección GB

En el caso del ensayo de Base Editing los editores se ensamblan en un vector pDGB3_alpha1 y los guías, elaboradas en el trabajo de Eva Hoyas Sánchez, se encuentran en pDGB3_alpha2 (*Tabla 9*). Por el contrario, para el ensayo de la bioluminiscencia como reportero CRISPR/Cas las proteínas Cas se ensamblan en pDGB3_alpha2 y los guías, construidas como se indica en la *sección 3.4.1*, en pDGB3_alpha1.

Tabla 9. Guías en pDGB3_alpha2 empleadas para la construcción de sistemas de edición de bases con una breve descripción, vector en el que se encuentran y secuencia diana.

Nombre	Descripción	Vector	Secuencia diana
gPDS-T2 (Cas9)	pU626:gPDST2	pDGB3_alpha2	TGCAAATTGAGTTGGGAGTG
gFT (Cas9)	pU626:gFT	pDGB3_alpha2	GGCCAATAGATCTTGTA AAA
gETR23 (Cas9)	pU626:gETR	pDGB3_alpha2	AACTGCACAAGAACCCATCTATA
gPDS1 (Cas12)	pU626:DR:gFT:HDV	pDGB3_alpha2	TCATCCAGTCCTTAACACTTAAAC
gFT (Cas12)	pU626:DR:gPDS1:HDV	pDGB3_alpha2	CAAGATCTATTGGCCTAAGA

En la reacción se emplean 20 fmol de cada uno de los plásmidos implicados, incluyendo el vector de destino (GB0015 o GB0017), 8 U de BsaI-HFv2 (*New England Biolabs*), 4 U T4 ligasa (*Promega Corporation*), 1.5 μ L T4 ligase buffer 10x (*Promega Corporation*) y 0.1 mg/mL BSA en un volumen final de 15 μ L. Las condiciones para la reacción son las que se muestran en la *Tabla 5* de la sección 3.4.1.

3.4.4. Ensamblaje de varias unidades transcripcionales (nivel 2)

Una vez se dispone de las unidades transcripcionales ensambladas en vectores de nivel 1 compatibles, alpha 1 y alpha 2, se produce una nueva reacción de restricción-ligación que permite la unión de ambas unidades transcripcionales en un nuevo vector de destino de nivel 2, en nuestro caso pDGB3_omega1 o pLX-B3_omega1.

La elección entre ambos vectores obedece a la dificultad de lograr la clonación de todos los elementos en un vector que se replique en *E. coli*. De esta forma, los vectores con construcciones más complejas pueden comprometer la supervivencia de la célula si esta produce un gran número de copias; es por ello que en estos casos se emplea pLX-B3_omega1, un vector de bajo número de copias, como vector de destino.

En cualquier caso la composición de la reacción de restricción-ligación para la unión de las unidades transcripcionales en el vector de destino es la misma: en un volumen total de 15 μ L se añaden 20 fmol de ambos vectores de nivel 1 (alpha 1 y alpha 2) y 20 fmol del vector de destino, ya sea pDGB3_omega1 (GB0019) o pLX-B3_omega1 (GB0307). Además, en la reacción se incluyen 8 U de BsmBI-HFv2 (*New England Biolabs*), 4 U T4 ligasa (*Promega Corporation*), 1.5 μ L T4 ligase buffer 10x (*Promega Corporation*) y 0.1 mg/mL BSA. Las condiciones de reacción se muestran en la *Tabla 5* de la sección 3.4.1.

3.5. Transformación transitoria de células foliares de *N. benthamiana*

La comprobación de la capacidad de edición génica o de mutación InDel, según corresponda, se realiza por un ensayo de expresión transitoria de las construcciones realizadas en células de hoja de *N. benthamiana*.

Esta expresión se logra mediante la co-infección mediante agroinfiltración de 3 hojas consecutivas de una planta al mismo tiempo con dos o más cepas de *A. tumefaciens*, una o dos con la construcción de interés, dependiendo de si los elementos están en cis o en trans, y otra que codifica el inhibidor del silenciamiento génico p19 bajo promotor constitutivo pCoMV35S (35S:p19:tnos). En los casos en que, para una misma secuencia diana se empleen construcciones en cis y en trans, se agroinfiltra en cis la construcción con la Cas, el guía y 35S:p19:tnos; y en trans se infiltra con la construcción Cas-guía, 35S:p19:tnos y un vector vacío que suple a uno de los vectores cis haciendo comparables los resultados.

El protocolo de agroinfiltración comienza preparando un precultivo de las cepas de *A. tumefaciens* a emplear en el ensayo. Este precultivo se realiza en 5 mL de medio LB líquido con los antibióticos correspondientes y la incubación se prolonga durante 36 h a 28 °C. Hecho esto se refresca el cultivo inoculando 20-50 μ L de este en un nuevo medio estéril igual al anterior y se incuba durante 16 h a 28 °C.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se centrifugan los cultivos a 4.500 rpm durante 15 minutos y el pellet se resuspende en 10 ml de buffer de agroinfiltración (MES 10 mM p.5.6, 10 mM MgCl₂ and 0.2 mM acetosiringona), a partir de este momento la solución debe mantenerse protegida de la luz. La solución resultante de la resuspensión de las células se incuba en agitación 2-6 h.

Transcurrido el tiempo de incubación se mide la OD ($\lambda=600\text{nm}$) de la solución de *A. tumefaciens* y se ajusta a una OD 0.1 con buffer de agroinfiltración. Para la co-infiltración, se combinan cada una de estas soluciones de cepas con OD 0.1 mezclándolas a partes iguales en un volumen final de 9-12 mL. Finalmente, empleando jeringuillas estériles sin aguja, se infiltra el envés de 3 hojas consecutivas por planta con cada una de las mezclas.

En el caso de la edición de bases, tras 5 días post infiltración (5 dpi), se recogen 3 discos de hoja de un diámetro de 1.6 cm de cada hoja infectada y se congelan en nitrógeno líquido. Estas muestras se conservan a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el inicio del proceso de extracción de DNA genómico.

En el caso de la edición genética la toma de muestra se hace un día después de la infiltración (1 dpi). Los discos de hoja tienen un diámetro que permite depositarlos en pocillos de placas de 96 pocillos junto con $300\text{ }\mu\text{L}$ de medio Murashige y Skoog (MS) sin sacarosa. Cada día hasta los 6 dpi se mide la fluorescencia (luz azul) y la luminiscencia (10 s de tiempo de integración) empleando un equipo luminómetro estándar (*Glomax Multi+*, *Promega Corporation*).

4. Resultados

4.1. Comparación de sistemas de *Base-editing*

4.1.1. Validación de resultados previos

Como punto de partida del presente trabajo se realizó la verificación de los resultados obtenidos en un Trabajo de Fin de Máster previo elaborado por Eva Hoyas Sánchez en el mismo laboratorio.

En el trabajo previo se diseñaron y evaluaron diversos sistemas de edición de bases, *single-base* and *multi-base*, basados tanto en CRISPR/Cas9 como en CRISPR/Cas12, observando el resultado mediante secuenciación Sanger de las secuencias diana en las hojas infiltradas a 3 días post infiltración (dpi). En este trabajo, el tiempo esperado para tomar la muestra tras la agroinfiltración se amplió a 5 dpi, buscando la obtención de resultados de edición más evidentes con las construcciones del trabajo previo.

En primer lugar, se replicaron los ensayos *single-base-editing* basados en Cas9 realizados por Eva Hoyas. Se emplearon construcciones que unían en cis cada uno de los editores, A3A-PBE y ABE8e, con nCas9 H840A, y el guía gPDS-T2, que dirige el sistema al gen *PHYTOENE DESATURASE* de *N. benthamiana*. En el trabajo anterior se observó que ninguna de las combinaciones producía edición a 3 dpi, lo que se verificó en este trabajo a 5 dpi (*Figura 8 b-c*). En la *Figura 8* se muestran los cromatogramas a 5 dpi para una de las hojas tras la transformación con ambas construcciones junto a dos cromatogramas control: un control negativo de edición y un control positivo de InDels, que muestran la ausencia de funcionalidad en los sistemas editores y la funcionalidad el guía, respectivamente.

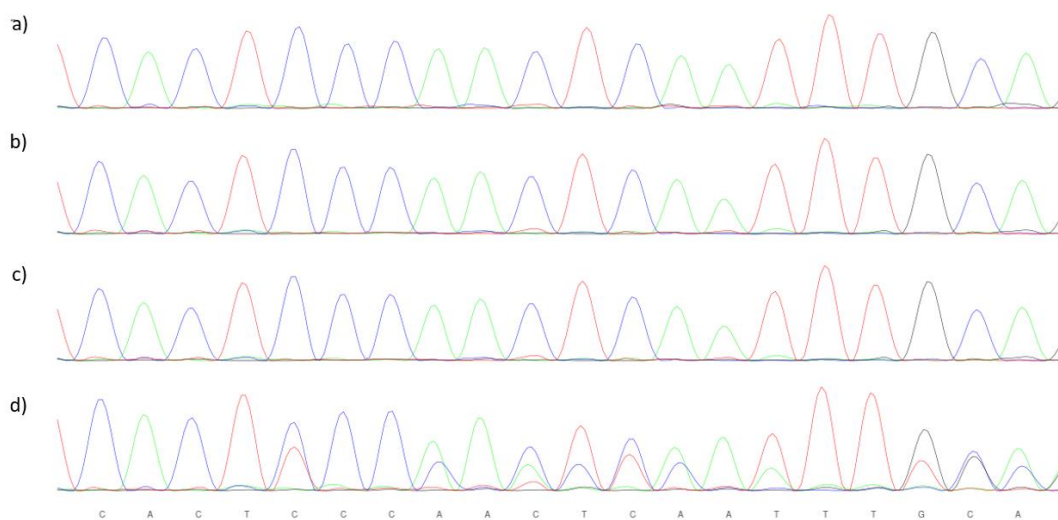


Figura 8. Cromatogramas de la secuencia complementaria al guía gPDS-T2 de la hoja 1 (L1) a 5 dpi para cada tratamiento: **a)** control negativo de la edición nCas9i-gPDS-T2, **b)** A3A-nCas9(H840A)-gPDS-T2, **c)** ABE8e-nCas9(H840A)-gPDS-T2 y **d)** Cas9i-gPDS-T2.

En el proyecto previo el sistema de *single-base-editing* basado en Cas12 sí arrojó resultados positivos a 3 dpi para la edición de bases por la citosina deaminasa A3A-PBE empleando el guía gPDS1 en cis con el editor de bases. Este guía dirige el sistema al gen de la *PHYTOENE DESATURASE*, al igual que gPDS-T2, pero es específico de Cas12. Partiendo de estos resultados, se empleó la misma construcción (A3A-dCas12-gPDS1) para verificar este resultado a 5 dpi (*Figura 9*). En la *Figura 9* se observan dobles picos de C y T en dos posiciones consecutivas del

cromatograma (posiciones +10 y +11 respecto al PAM de gPDS1), indicativo de la edición G>A en la cadena complementaria al gRNA guía gPDS1 por la acción del editor A3A-dCas12.

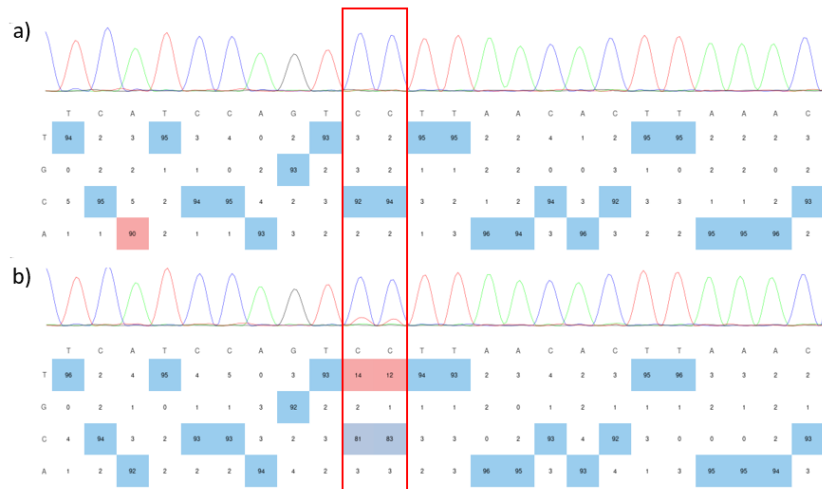


Figura 9. Cromatogramas de la región del guía gPDS-T2 y porcentajes de identidad para cada base en cada posición. Se muestran los cambios de base (C>T) que se dan en la cadena no complementaria al guía en la hoja 3 (L3) a los 5 dpi tras la agroinfiltración con: **a)** el control negativo de la edición dCas12-gPDS1 y **b)** A3A-dCas12-gPDS1.

Por otro lado, en el proyecto anterior se desarrollaron sistemas *multi-base-editing*, basados en CRISPR/Cas9 y CRISPR/Cas12, que no consiguieron dar ningún resultado que evidenciara la edición de bases a 3 dpi. Tampoco se consiguieron resultados positivos para la edición de bases a 5 dpi con estos editores (datos no mostrados).

Con el conocimiento previo, y tras reproducir los resultados del trabajo anterior a 5 dpi, se emprende el presente proyecto que limita sus esfuerzos al diseño y evaluación de sistemas *single-base-editing* basados en CRISPR/Cas12 y CRISPR/Cas9. En este último caso, se emplea nCas9 D10A, en vez de nCas9 H840A, esperando obtener mejores resultados. Además, se prolonga el tiempo para la toma de muestra a 5 dpi obteniendo resultados de edición más evidentes. También, se incorporan versiones intronizadas de las Cas (iCas) para comprobar si es posible la obtención de mejores niveles de editado (*sección 3.3.1*).

4.1.2. Diseño y ensamblaje de los sistemas de *Base-editing*

Para el diseño y ensamblaje de las herramientas de editado de bases empleadas en este proyecto se parte de los RNA guía previamente ensamblados en vectores pDGB3_alpha2 en el Trabajo de Fin de Máster de Eva Hoyas Sánchez. Estos guías son tres para Cas9, gPDS-T2, gFT y gETR23, que se dirigen a los genes *PHYTOENE DESATURASE* (PDS), *FLOWERING LOCUS T* (FT) y *ETHYLENE RESPONSE* (ETR), respectivamente; y dos para Cas12, gPDS1 y gFT que se dirigen a PDS y FT. Todos ellos se muestran en la *Tabla 9* de la *sección 3.4.3*.

En este trabajo se construyeron en pDGB3_alpha1 (nivel 1) nuevos vectores que ensamblan los nuevos editores que contienen nCas9 (D10A), iCas9, nCas9i (D10A), iCas12 y dCas12i, que se muestran, junto con otras construcciones que se emplean en este proyecto, en la *Figuras 10 y 11*.

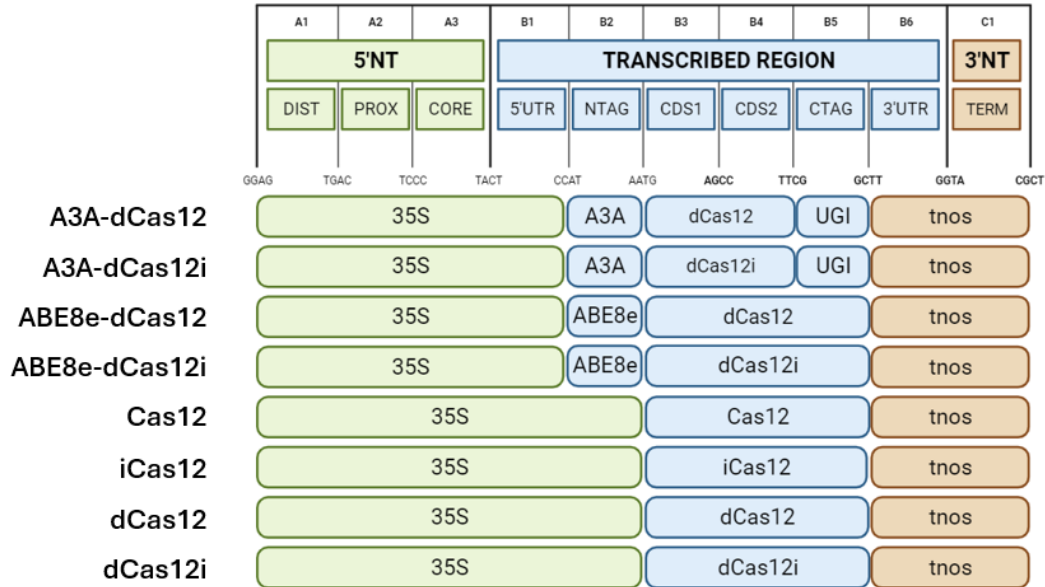


Figura 10. Editores basados en Cas12 ensamblados en pDGB3_alpha1. . Las construcciones con Cas12 y dCas12 fueron tomadas de un trabajo previo elaborado por Eva Hoyas Sánchez. Abreviaturas: 35S: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; ABE8e: adenina deaminasa sintética; A3A: adenina deaminasa humana (ApoBEC3A); UGI: inhibidor de la uracil-DNA glicosilasa del fago PBS1 de *Bacillus subtilis*; tnos: terminador de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens*; dCas12: dead Cas12a termotolerante (D156R) (E925Q) de *Lachnospiraceae bacterium*; Cas12: Cas12a termotolerante (D156R) de *L. bacterium*; dCas12i: dead Cas12a termotolerante (D156R) (E925Q) de *L. bacterium* con 9 intrones de *Zea mays*; iCas12: Cas12a termotolerante (D156R) de *L. bacterium* con 9 intrones de *Zea mays*.

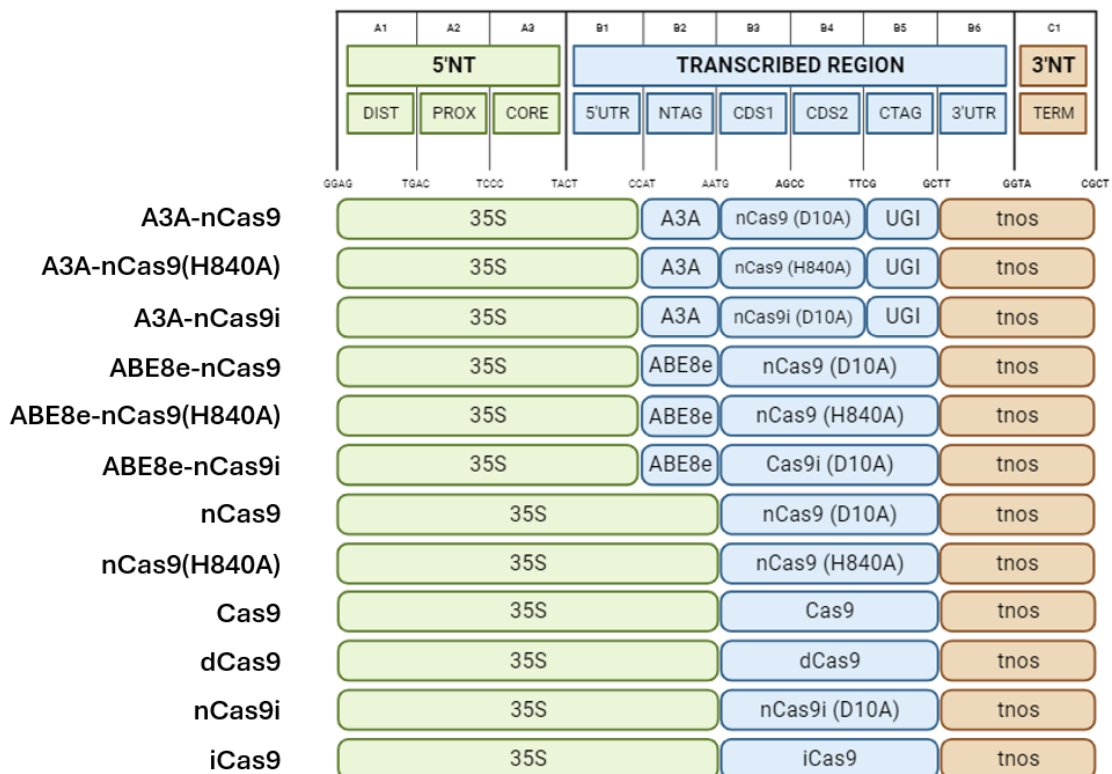


Figura 11. Editores basados en Cas9 construidos en pDGB3_alpha1. Las construcciones con A3A-nCas9(H840A), ABE8e-nCas9, Cas9 y dCas9 fueron tomadas de un trabajo previo elaborado por Eva Hoyas Sánchez. Abreviaturas: 35S: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; ABE8e: adenina deaminasa sintética; A3A: adenina deaminasa humana (ApoBEC3A); UGI: inhibidor de la uracil-DNA glicosilasa del fago PBS1 de *Bacillus subtilis*; tnos: terminador de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens*; nCas9: nickasa Cas9 (D10A/H84A) de *Streptococcus pyogenes*; Cas9: Cas9 de *S. pyogenes*; dCas9: dead Cas9 (D10A) (H840A) de *S. pyogenes*; nCas9i: nickasa Cas9 (D10A) de *S. pyogenes* con 9 intrones de *Zea mays*; iCas9: Cas9 de *S. pyogenes*; con 9 intrones de *Z. mays*.

Los vectores pUPD2 empleados para la conformación de las unidades transcripcionales en nivel 1 (*Figuras 10 y 11*) proceden del repositorio de GBcloning (www.gbcloning.upv.es), a excepción de los vectores nivel 0 que contienen las CDS de las proteínas Cas intronizadas, que proceden de un trabajo previo (Grützner et al., 2020) y se muestran en la *Tabla 8* de la *sección 3.4.3*.

Los requerimientos experimentales exigieron modificar dos de los vectores procedentes de este trabajo. Este requerimiento derivó de que las CDS de iCas12 y dCas12i en los vectores pAGT8163 y pAGT8162 (Grützner et al., 2020) tenían sitios de fusión B3-B4 para la gramática GoldenBraid. El diseño experimental también precisaba de estas secuencias con sitios de fusión B3-B5, pues son fundamentales para la construcción de los editores ABE8e-dCas12i, -iCas12 y -dCas12i (*Figura 10*). La modificación de estos sitios de fusión se llevó a cabo por PCR, como se describe en la *sección 3.4.2* de este trabajo.

Finalmente, los vectores que contienen los guías en pDGB3_alpha2, se combinan con los editores en pDGB3_alpha1 empleando vectores de destino pDGB3_omega1. Los vectores finales se comprobaron por digestión enzimática como se muestra en la *Figura 12*. Sin embargo, esto no fue posible en todos los casos (A3A-nCas9i-gPDS-T2 y A3A-nCas9i-gETR23). Para estas combinaciones de editor y guía se recurrió a la co-infiltración de dos cepas de *Agrobacterium* distintas, una con el vector del editor y otra con el vector de la guía (agroinfiltración en trans).

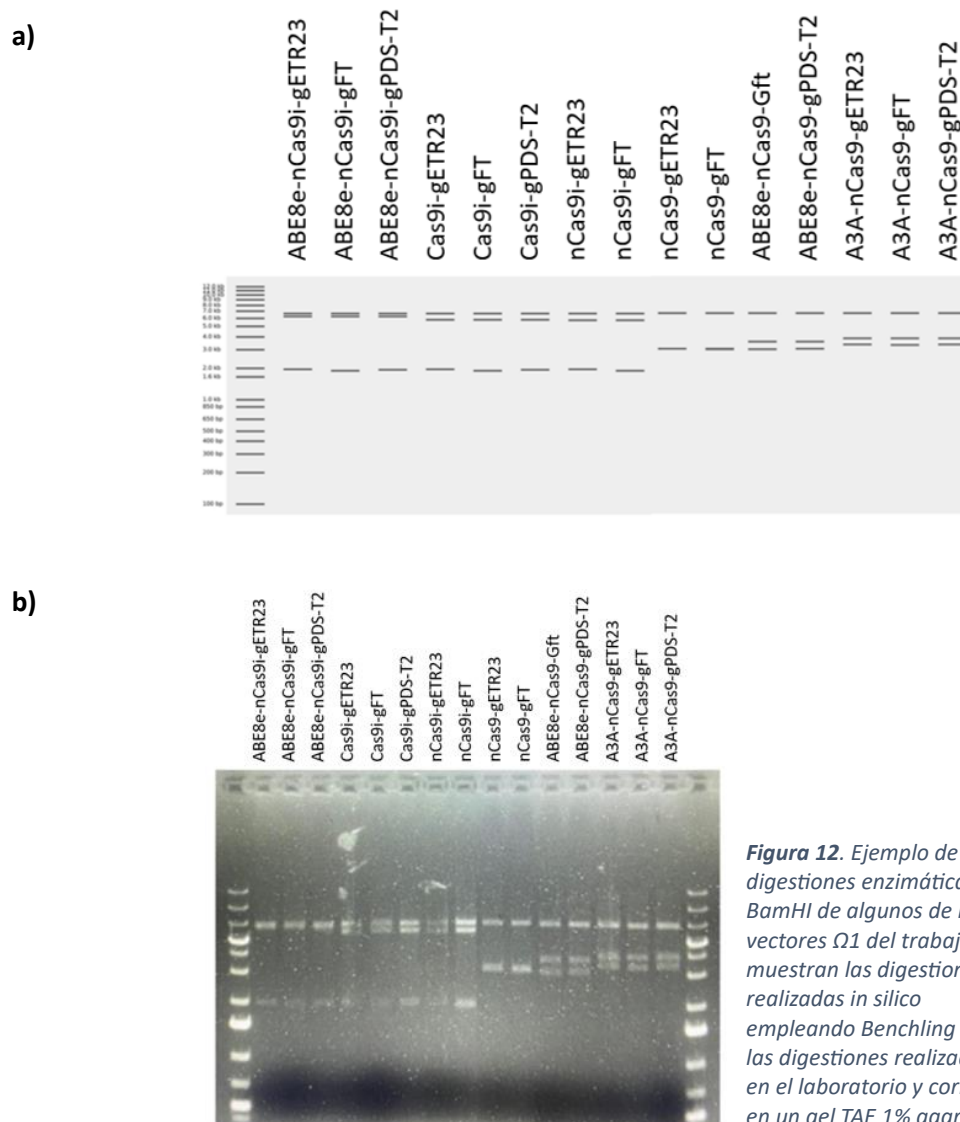


Figura 12. Ejemplo de digestiones enzimáticas con BamHI de algunos de los vectores $\Omega 1$ del trabajo. Se muestran las digestiones realizadas in silico empleando Benchling (a) y las digestiones realizadas en el laboratorio y corridas en un gel TAE 1% agarosa (b).

4.1.3. Base-editing empleando el editor de bases A3A-PBE

El empleo del editor de bases de citosina A3A-PBE fusionado, junto con UGI, a proteínas Cas con actividad endonucleasa nula o nickasa persigue la obtención de cambios de bases **C•G>T•A**, lo que quiere decir que se observa el cambio C>T en la cadena igual al guía y G>A en la complementaria.

En este trabajo se realizan construcciones con este editor y la proteína nCas9 (D10A) o dCas12, que se ensamblan en cis con distintos guías que corresponden a cada una de ellas. En el caso de Cas9, los guías son dos, gETR23 y gPDS-T2, que tienen como dianas ETR y PDS; para Cas12 los guías son gFT y gPDS1, que se dirigen a FT y PDS, respectivamente.

En las *Figuras 13-15* se muestran los cromatogramas de las secuencias diana de la edición a 5 dpi para cada uno de los genes diana, a excepción de las correspondientes a gPDS-T2, que no arrojaron resultados concluyentes. Se muestra la ausencia aparente de edición en la secuencia diana de ETR (*Figura 13*). Aunque puede observarse una señal basal correspondiente a TTT en lugar de CCC (nts -14 a-16 respecto al PAM de gETR23) en algunas de las muestras tratadas con A3A-nCas9-gETR23 y A3A-nCas9i co-infiltrada con gETR23 (*Figura 13 b- c*), esta señal también está presente en el control negativo (*Figura 13 a*).

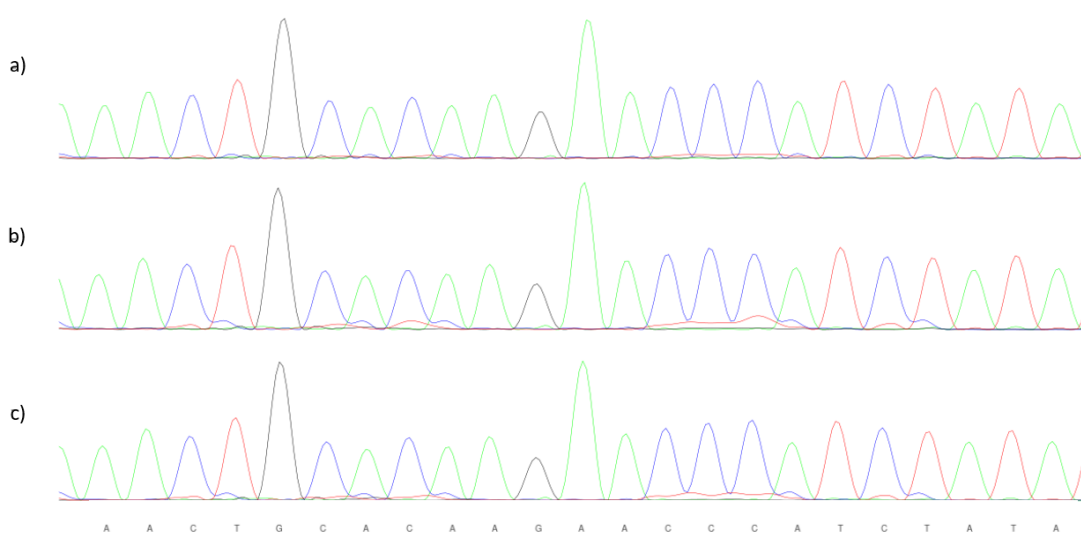


Figura 13. Cromatogramas de la secuencia complementaria al guía gETR23 de la hoja 1 (L1) a 5 dpi para cada tratamiento: a) control negativo de la edición nCas9i-gETR23, b) A3A-nCas9-gETR23, c) A3A-nCas9i + gETR23.

En el caso del gen diana FT los resultados muestran edición en hojas de *N. benthamiana* infiltradas con las construcciones A3A-dCas12-gFT y A3A-dCas12i-gFT (*Figura 14 b-c*) y ausencia de edición en el control negativo (*Figura 14 a*) para una hoja ejemplo (L1). La base en la que se observó el cambio de G a A está indicada con un cuadro verde y corresponde al nucleótido +7 respecto al PAM de gFT.

La secuenciación Sanger del gen FT en la región de la secuencia diana de gFT fue compleja por la presencia de múltiples secuencias repetidas. Este problema se subsanó parcialmente empleando cebadores específicos y PCR touchdown para la amplificación de la secuencia y un cebador de secuenciación que evitara zonas repetitivas. A pesar de esto no disponemos de resultados para la hoja 2 (L2) con el tratamiento A3A-dCas12i-gFT.

Considerando solo los datos de L1 y L3 para este tratamiento, se observa un aumento significativo de la proporción media de edición cuando emplea el editor A3A-dCas12i ($42\pm 4\%$) que cuando se emplea editor equivalente con dCas12 no intronizada ($25\pm 2\%$) (Figura 14 d).

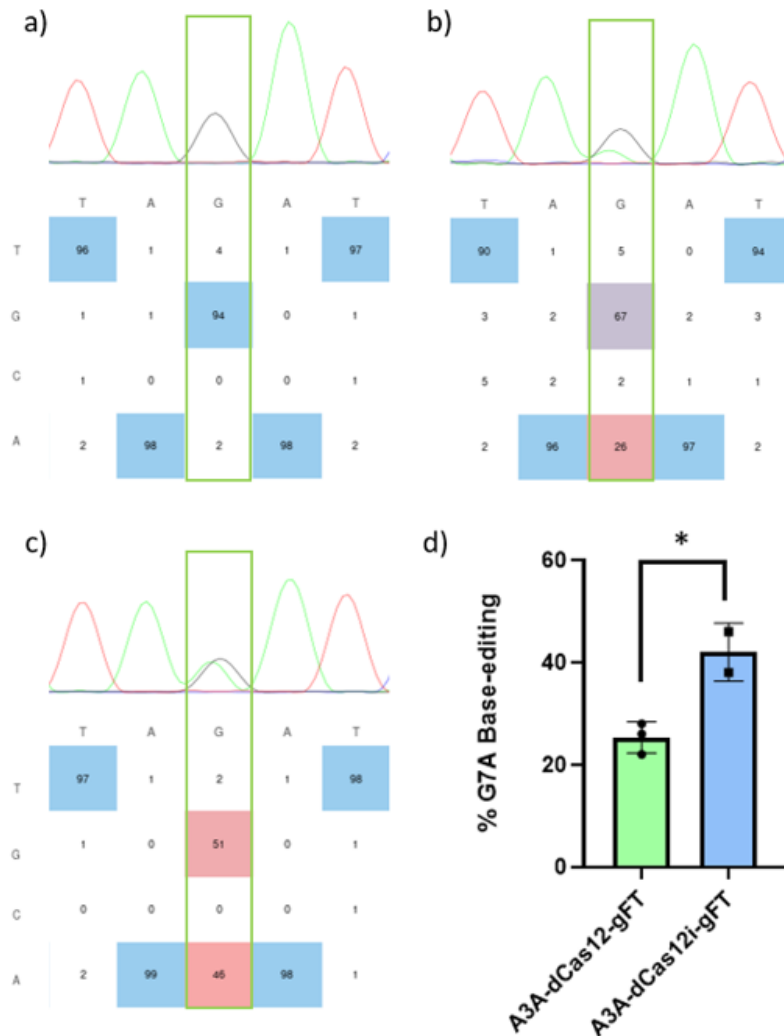


Figura 14. Cromatogramas parciales y porcentajes de identidad para el entorno de las bases editadas (posiciones +5 a +9 respecto al PAM de gFT). Se muestran los cambios de base (G>A) que se dan en la cadena complementaria al guía en la hoja 1 (L1) a 5 dpi tras la transformación parcial con: **a)** control negativo de la edición dCas12i-gFT, **b)** A3A-dCas12-gFT, **c)** A3A-dCas12i-gFT. **d)** muestra los porcentajes medios de edición para cada construcción para la posición +7 respecto al PAM de todas las hojas infiltradas (L1, L2 y L3) excepto L2 con el tratamiento A3A-dCas12i, pues carecemos de datos de secuenciación.

Para el gen diana PDS los resultados de la secuenciación Sanger apenas presentan ruido de fondo y se aprecia de forma evidente el cambio de C a T (posiciones señaladas con un cuadro rojo) empleando A3A-dCas12-gPDS1 y A3A-dCas12i-gPDS1 (Figura 15 b-c) respecto al control negativo de la edición (Figura 15 a). El cambio se observa en dos Cs consecutivas que ocupan las posiciones +10 y +11 respecto al PAM de gPDS1. Además, hay una mayor proporción de editado al emplear dCas12i ($23\pm 2\%$ y $21\pm 1\%$) respecto a dCas12 ($21\pm 1\%$ para ambas posiciones), aunque la diferencia no es significativa para ninguna de las posiciones (Figura 15 d-e).

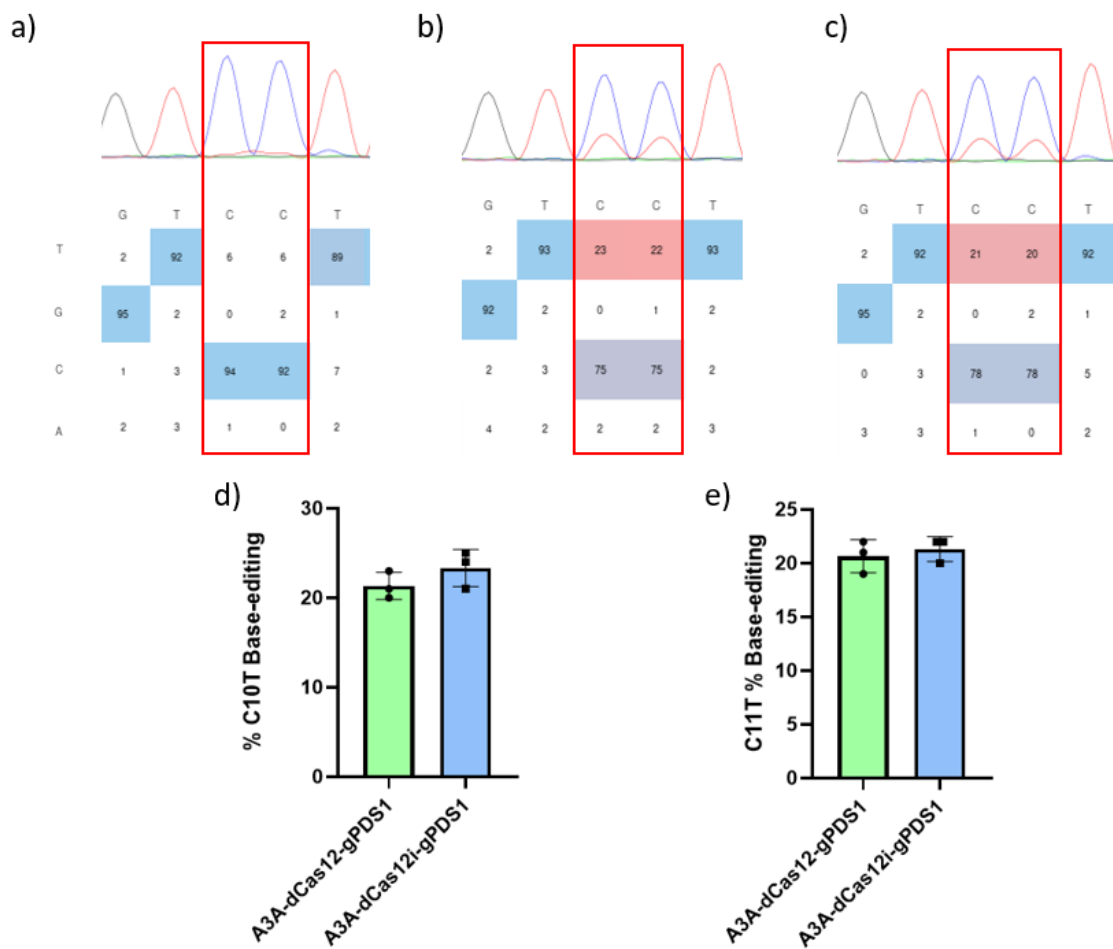


Figura 15. Cromatogramas parciales y porcentajes de identidad para el entorno de las bases editadas (posiciones +8 a +12 respecto al PAM de gPDS1). Se muestran los cambios de base (C>T) que se dan en la cadena no complementaria al guía en la hoja 3 (L3) a 5 dpi tras la transformación parcial con: a) control negativo de la edición dCas12i-gPDS1, b) A3A-dCas12-gPDS1, c) A3A-dCas12i-gPDS1. d) y e) muestran los porcentajes medios de edición para cada construcción de todas las hojas infiltradas (L1, L2 y L3) para cada posición, +10 y +11 respecto al PAM, respectivamente

4.1.4. Base-editing empleando el editor de bases ABE8e

El empleo del editor de bases de adenina ABE8e fusionado con las proteínas Cas catalíticamente inactivas de forma total o parcial permite la obtención de mutaciones del tipo **A•T>G•C**. Esto supone una transición A>G en la cadena que es idéntica al guía y un cambio T>C en la complementaria al guía.

Análogamente a lo que se ha mostrado en la *sección 4.1.3*, se realizaron las construcciones con el editor ABE8e y las diferentes proteínas Cas, con cada uno de los guías que les corresponden.

Las construcciones ABE8e-nCas9-gPDS-T2, ABE8e-dCas12i-gFT, ABE8e-dCas12i-gPDS1 y nCas12i-gPDS1 se encuentran ensambladas en el vector pLX-B3_omega1. Este vector. A diferencia del habitual pDGB3_omega1 tiene un origen de replicación de bajo número de copias para *E. coli*, lo que facilita el clonaje de construcciones grandes (Pasin et al., 2017).

En las *Figuras 16-18* se muestran los resultados de la secuenciación Sanger de las secuencias diana de la edición para cada guía en cada una de las hojas tratadas con cada uno de los editores.

El tratamiento de edición de bases que se dirige al gen ETR no produce en las hojas tratadas con las construcciones ABE8e-nCas9-gETR23 o ABE8e-nCas9i-gETR23 (Figura 16 b-c) ningún evento claro de edición génica en comparación con el control negativo (Figura 16 a).

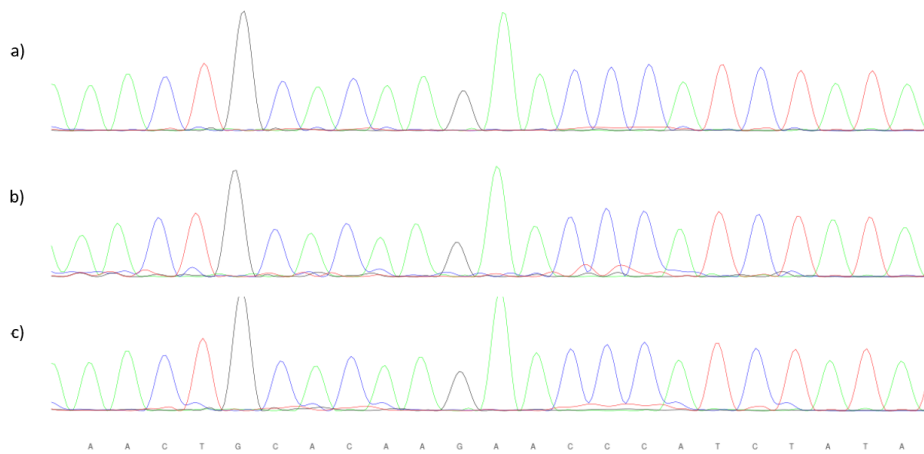


Figura 16. Cromatogramas de la secuencia complementaria al guía gETR23 de la hoja 1 (L1) a 5 dpi para cada tratamiento: a) control negativo de la edición nCas9i-gETR23, b) ABE8e-nCas9-gETR23, c) ABE8e-nCas9i-gETR23

Por otro lado, en el caso de la edición de FT con ABE8e nos encontramos el problema ya mencionado anteriormente para obtener resultados sin ruido de fondo en la secuenciación. Tras superar parcialmente estas dificultades como se expone en el apartado anterior, se obtuvieron los cromatogramas de la Figura 17.

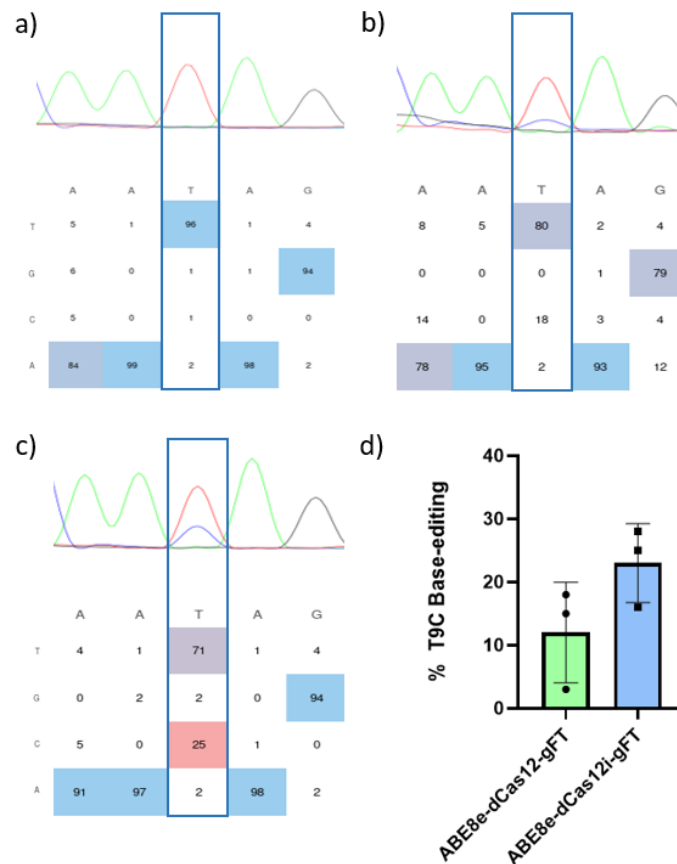


Figura 17. Cromatogramas parciales y porcentajes de identidad para el entorno de las bases editadas (posiciones +7 a +11 respecto al PAM de gFT). Se muestran los cambios de base (T>C) que se dan en la cadena complementaria al guía en la hoja 1 (L1) a 5 dpi tras la transformación parcial con: a) control negativo de la edición dCas12i-gFT, b) ABE8e-dCas12-gFT, c) ABE8e-dCas12i-gFT. d) muestra los porcentajes medios de edición en todas las hojas infiltradas (L1, L2 y L3) para cada construcción en la posición +9 respecto a la PAM.

En este caso la presencia de edición resulta evidente a pesar del ruido de fondo para las construcciones, ABE8e-dCas12 ($12\pm 6\%$) y ABE8e-dCas12i ($23\pm 5\%$) (Figura 17 b-c), al compararlas con el control negativo de edición (Figura 17 a). En este caso el cambio de base se da en la posición +9 respecto al PAM de gFT, el porcentaje medio de editado con cada construcciones en esta posición se muestra en la Figura 17 d.

El editado con ABE8e del gen PDS se intentó con editores basados en Cas9 y editores basados en Cas12. Con el guía de Cas12 gPDS1 no se obtiene edición, ni con ABE8e-dCas12-gPDS1 ni con ABE8e-dCas12i-gPDS1 (datos no mostrados). Con el guía de Cas9 gPDS-T2 se obtienen niveles de editado elevados, tanto con el editor que incorpora la versión intronizada de la Cas9 nickasa no intronizada (ABE8e-nCas9-gPDS-T2, Figura 18 b), como con el editor que incorpora la versión intronizada (ABE8e-nCas9i co-infiltrado con gPDS-T2, Figura 18 c) respecto al control negativo (Figura 18 a). En este caso el cambio T>C se observa en tres Ts consecutivas que se encuentran en las posiciones -15 a -17 respecto al PAM de gPDS-T2. Los porcentajes medios de edición con ABE8e-nCas9-gPDS-T2 son de $30\pm 6\%$, $31\pm 6\%$ y $32\pm 5\%$ para T-15, T-16 y T-17, respectivamente. Para ABE8e-nCas9i-gPDS-T2 los porcentajes son de $35\pm 2\%$, $36\pm 2\%$ y $37\pm 2\%$ para T-15, T-16 y T-17, respectivamente (Figura 18 d-f).

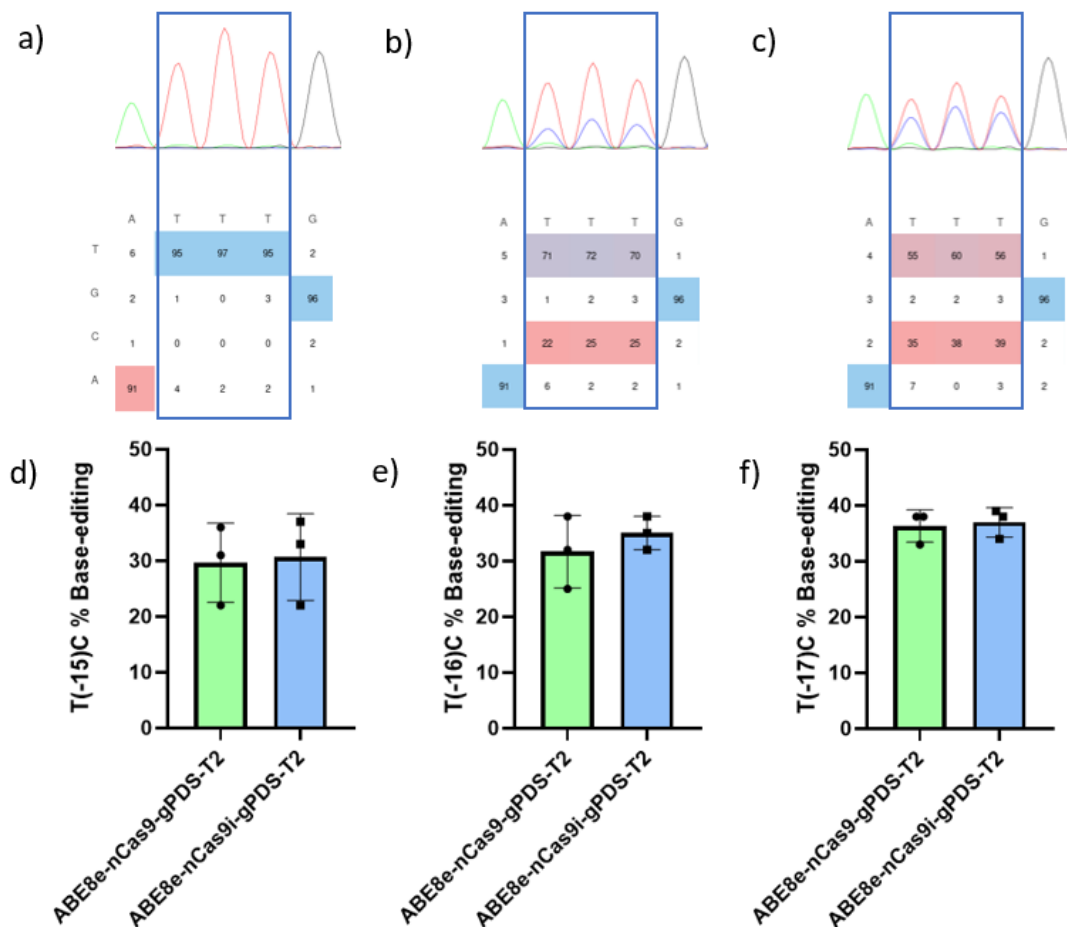


Figura 18. Cromatogramas parciales y porcentajes de identidad para el entorno de las bases editadas (posiciones -14 a -18 respecto al PAM de gPDS-T2). Se muestran los cambios de base (T>C) que se dan en la cadena complementaria al guía en la hoja 1 (L1) a 5 dpi tras la transformación parcial con: a) control negativo de la edición nCas9i-gPDS-T2, b) ABE8e-nCas9-gPDS-T2, c) ABE8e-nCas9i-gPDS-T2. d), e) y f) muestran los porcentajes medios de edición en todas las hojas infiltradas (L1, L2 y L3) para cada construcción en las posiciones -15, -16 y -17 respecto a la PAM, respectivamente.

4.2. Comparación de sistemas de edición genética mediante el uso de un reportero bioluminiscente

4.2.1. Diseño y ensamblaje de los sistemas de edición genética Cas9 y Cas12

En este diseño se busca la comparación de los niveles de edición genética para el gen diana HispS entre dos sistemas de edición, Cas9 y Cas12, ensamblados en cis con el guía de RNA.

Los tres guías empleados para cada Cas (gH1, gH2 y gH3) se diseñaron y construyeron específicamente para este trabajo en un vector de destino gDGB3_alpha1. Del mismo modo, las unidades transcripcionales Cas se diseñaron y ensamblaron en pDGB3_alpha2 como se muestra en la *Figura 19*. Ambos vectores de nivel 1 se combinaron en un vector pDGB3_omega1 dando lugar a las construcciones finales. Todas ellas se coinfiltran junto a el reportero de bioluminiscencia (Calvache et al., 2024).

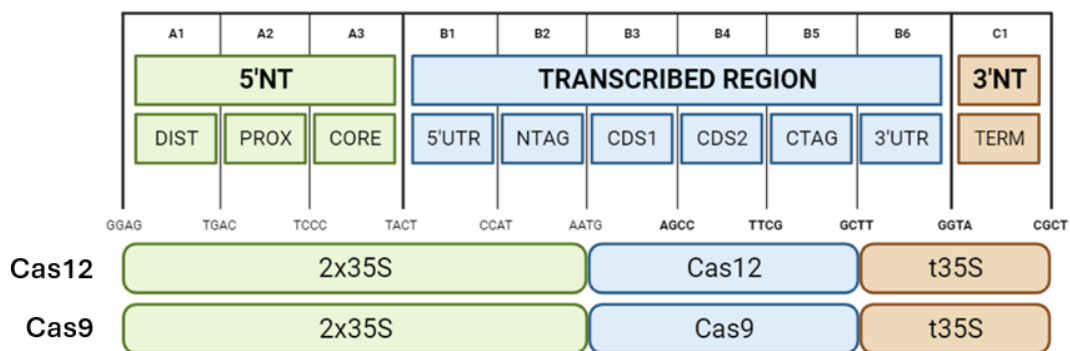


Figura 19. Editores génicos construidos en pDGB3_α2 y ensamblados con los guías gH1_pDGB3_α1, gH2_pDGB3_α1 y gH3_pDGB3_α1 en un vector de destino final pDGB3_Ω1. Abreviaturas: 2x35S: doble promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; Cas12: Cas12a termotolerante (D156R) de *L. bacterium*; Cas9: Cas9 de *S. pyogenes*.

4.2.2. Diseño y ensamblaje de los sistemas de edición genética Cas12 e iCas12

En este caso se comparó la eficiencia de edición entre Cas12 e iCas12 empleando dos construcciones co-infiltradas en trans, junto al reportero de bioluminiscencia (Calvache et al., 2024). Una de estas construcciones se corresponde con los mismos guías empleados en la *sección 4.2.1.* y la otra, con los plásmidos que contienen Cas12 e iCas12 ensambladas, como en el caso anterior, con un promotor 2x35S y un terminador 35S en pDGB3_alpha2. En la *Figura 20* se muestran ambas construcciones.

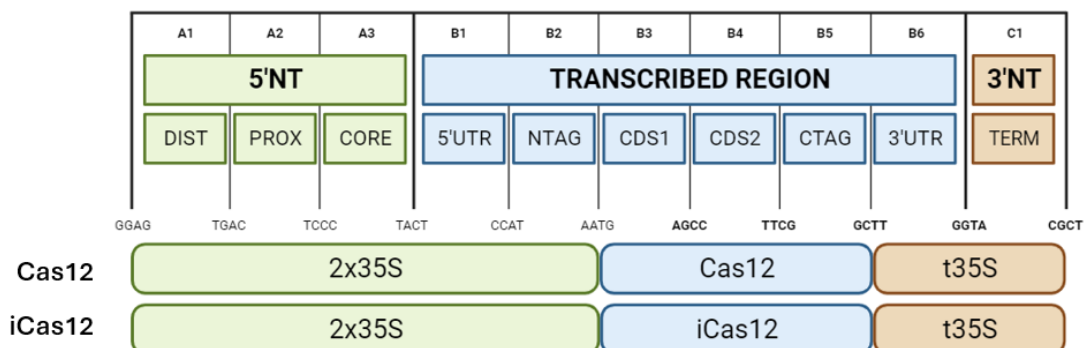


Figura 20. Editores génicos construidos en pDGB3_α2 y co-infiltrados junto con los guías gH1_pDGB3_α1. Abreviaturas: 2x35S: doble promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor; Cas12: Cas12a termotolerante (D156R) de *L. bacterium*; iCas12: Cas12 termotolerante (D156R) de *L. bacterium* intronizada con 9 intrones de *Zea mays*.

4.2.3. Ensayo de supresión de bioluminiscencia por edición génica del gen *HispS* empleando Cas9 y Cas12

Los resultados de la luminiscencia, normalizada frente a la fluorescencia, a 6 dpi para los discos de hoja infiltrados con las construcciones en cis se muestran en la *Figura 21*. Se observa una gran variabilidad en los datos, pero el ratio luminiscencia/fluorescencia desciende significativamente para la construcción iCas12-gH3. Las demás construcciones no muestran diferencias significativas con el control.

En total se miden un total de 12 discos por tratamiento, 3 de ellos, uno por hoja, corresponden a la construcción control negativo que consiste en el editor ensamblado a un guía para un gen que no se relaciona con la ruta de fluorescencia ni con la de bioluminiscencia; y los otros 9 corresponden a 3 replicados por hoja tratada con cada editor (Cas9 o Cas12) ensamblado con cada uno de los guías diseñados para el gen *HispS* (gH1, gH2 y gH3). En todos los casos se incorpora a la solución de infiltración una construcción que expresa el inhibidor del silenciamiento génico p19 (35S:p19tnos) en cis con el reportero de bioluminiscencia (Calvache et al., 2024).

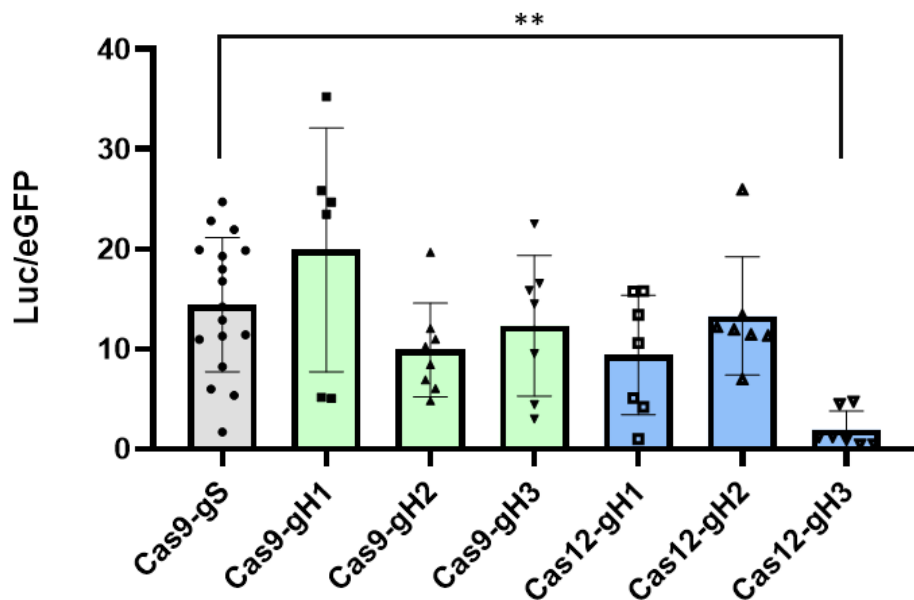


Figura 21. Diagrama de barras que muestra los ratios luminiscencia/fluorescencia (Luc/eGFP) en unidades arbitrarias (u.a.) con las barras de error para cada uno de los tratamientos en cis, incluyendo el control negativo (Cas9-gS), dirigido al gen ajeno a la ruta de bioluminiscencia (*SU1*).

4.2.4. Ensayo de supresión de bioluminiscencia por edición génica del gen *HispS* empleando Cas12 e iCas12

Los resultados de la luminiscencia, normalizada frente a la fluorescencia, a 6 dpi para los discos de hoja co-infiltrados con las construcciones en trans se muestran en la *Figura 22*. Para todos los datos la variabilidad es demasiado elevada, lo que impide sacar conclusiones.

Como en el caso anterior, se midieron 12 discos de hoja por tratamiento, 3 discos, uno por hoja, de la mitad de hoja infiltrada con el control y 9 discos, tres por hoja, de la mitad de hoja co-infiltrada con las construcciones editor y guía. En todos los casos se co-infiltra además con una construcción que expresa el supresor del silenciamiento génico p19 (35S:p19:tnos) en cis con el reportero de bioluminiscencia (Calvache et al., 2024).

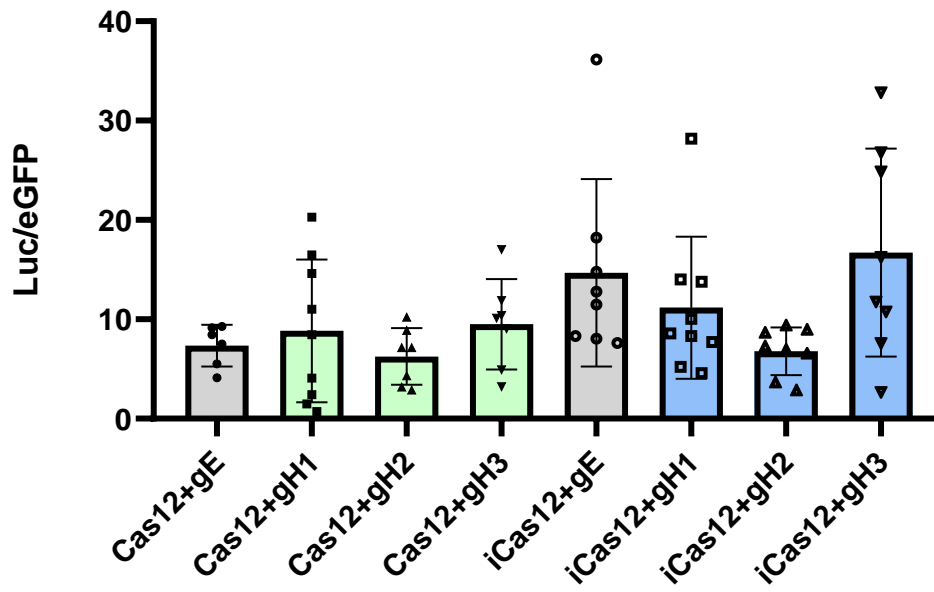


Figura 22. Diagrama de barras que muestra los ratios luminiscencia/fluorescencia (Luc/eGFP) en unidades arbitrarias (u.a) con las barras de error para cada uno de los tratamientos en trans, incluyendo el control negativo (Cas9-gE), dirigido al gen ajeno a la ruta de bioluminiscencia (*ETR*).

5. Discusión

En el presente Trabajo de Fin de Máster se han construido un total de 11 vectores para comprobar la eficiencia de los editores de bases, 7 de estas construcciones se basan en Cas9 y 4, en Cas12. Estas construcciones se ensamblan con 3 RNAs guía en el caso de Cas9 (gETR23, gFT y gPDS-T2), y con 2 gRNAs en el caso de Cas12 (gFT y gPDS1). Así se generaron un total de 27 construcciones resultantes de la unión de los editores de Cas9 y los guías en cis, debido a que 2 no se pudieron ensamblar y se recurrió a la co-infiltración; y 8 construcciones que unen los editores basados en Cas12 con sus respectivas guías. Con todo esto, el diseño experimental de edición de bases suma un total de 27 construcciones en vectores omega y 3 en vectores alpha, un editor (A3A-nCas9i) y dos guías (gETR23 Y gPDS-T2) que se co-infiltran en trans. Esto equivale a un total de 29 tratamientos de agroinfiltración diferentes. Adicionalmente, se usan como controles las construcciones editor-guía que emplean Cas9, Cas12 y dCas12 ensambladas por Eva Hoyas Sánchez en un trabajo previo, además de las indicadas en la *sección 4.1.1*, que son el punto de partida de este proyecto.

Con todos estos tratamientos, los que han resultado finalmente funcionales son aquellos que figuran en la *Tabla 10*, es decir, el editor A3A con dCas12 y dCas12i; y el editor ABE8e tanto con nCas9 y nCas9i como con dCas12 y dCas12. Sin embargo, no podemos descartar que el editor A3A sea funcional con nCas9 y nCas9i debido a que este tipo de construcciones son habituales y funcionales en la bibliografía y que solamente se comprobó con uno de los guías, gETR23. Como se desarrollará más tarde, este guía puede ser el causante de la ausencia de funcionalidad. Lo ideal sería testar este tipo de construcción con otro guía como gFT, que era la idea inicial del trabajo. Sin embargo, las limitaciones temporales han hecho las construcciones A3A-nCas9-gFT y A3A-nCas9i-gFT, al igual que ABE8e-nCas9-gFT y ABE8e-nCas9i-gFT, no hayan podido ser infiltradas en *N. benthamiana* a pesar de haber sido ensambladas en este trabajo.

Con respecto a la eficiencia de editado lograda en los ensayos de edición de bases empleando A3A-PBE, esta es bastante elevada en comparación con los trabajos previos llevados a cabo en Cas9 en el laboratorio y con otros estudios que emplean el mismo editor en transitoria en *N. benthamiana* y con una metodología similar (Luo et al., 2023). Para de Luo et al. la máxima eficiencia de edición alcanzada con A3A-nCas9 es del 12.33%, mientras que en este trabajo se llega al 42% de eficiencia empleando A3A-dCas12i. Para el editor ABE8e con Cas9 y Cas12 se obtienen mejores resultados que en otros trabajos similares que emplean Cas9 (Wang et al., 2021). En otras especies también se obtienen resultados comparables a los generados en este trabajo como por ejemplo en tomate con el editor A3A (Veillet et al., 2018) y en arroz con el editor ABE8e (Wang et al., 2020).

Resulta difícil comparar nuestros resultados con otros resultados de editado de bases con Cas12, pues, por lo novedoso del uso de esta proteína en editado de bases, las referencias bibliográficas en plantas aún son escasas. Sin embargo, existe otro trabajo en plantas que obtiene unas eficiencias de edición que podrían ser comparables, aunque usa otros sistemas para la cuantificación (Gaillochet et al., 2023); además, nuestros resultados se acercan a los generados por otros autores en mamíferos (Chen et al., 2022).

Atendiendo a los resultados positivos para la edición de bases obtenidos en este trabajo, que se sintetizan en la *Tabla 10*, y teniendo en cuenta los resultados de la validación de los resultados previos de *single-base-editing* obtenidos en el trabajo de Eva Hoyas Sánchez; se pone patente que la nickasa más apropiada para el editado de bases es la D10A y no la H840A. El uso de la nCas9 D10A es avalado por multitud de trabajos previos (Li J et al., 2023; Bhuyan et al., 2023)

y ha permitido la edición en estable de *N. benthamiana* (Khan et al., 2017) y de un gran número de especies de interés agronómico como el arroz (Li C et al., 2018). La razón de la mayor eficiencia de editado de esta nickasa (D10A) con el sitio RuvC inactivo y el HNH activo podría obedecer a que al formarse el complejo de edición el guía se une a la hebra complementaria a dicho guía en el DNA y esta es cortada por HNH, mientras que la hebra no complementaria al guía es editada. De esta forma se introduce un nick en la hebra no editada que favorece que la resolución del *mismatch* generado se produzca a favor de la edición (Komor et al., 2016).

Precisamente, el corte de la cadena no editada parece el factor principal que apoya el uso de la nCas9 (D10A) frente a nCas9 (H840A) o dCas9 (Komor et al., 2016). Sin embargo, aunque no sea posible la comparación efectiva de las construcciones que emplean nCas9 (D10A) y dCas12, por tener distintas PAM y, por tanto, usar distintas guías, estas parecen tener una eficiencia similar a la hora de emplearse en sistemas de edición de bases con los guías del trabajo. Esto ocurre a pesar de que dCas12 no produce el nick en la cadena no editada. Cas12 tiene un único sitio catalítico que genera la DSB, por lo que es imposible generar versiones nickasas de esta proteína y comprobar si de este modo se podrían mejorar los editores de bases basados en Cas12. Los editores basados en dCas12 se desarrollaron recientemente y son todavía pocos los ejemplos de su uso en plantas (Gailloch et al., 2023; Chen et al., 2023).

Tabla 10. Porcentaje de edición para cada uno de los experimentos de edición de bases que fueron realizados con éxito. Se muestra el editor, Cas y guía empleado en cada caso además del cambio detectado en la secuenciación, el porcentaje de edición y la secuencia diana de la edición. En la secuencia diana se señala el PAM (en rojo y negrita) y el nucleótido editado en cada caso para dar lugar al cambio observado (en negrita). Se debe tener en cuenta que el cambio que se da y el detectado puede no ser el mismo debido a que en algunos casos se secuencia la cadena complementaria al guía y no la cadena que es igual a este. Estos casos se indican con * en la columna “cambio detectado”

Editor	Cas	RNAguía	Cambio detectado	% Edición	Secuencia diana de la edición
A3A	dCas12	gFT	G7A*	25±2%	TTT CAAGATCT ATTGGCCTAAGA
	dCas12i		G7A*	42±4%	
	dCas12	gPDS1	C10T	21±1%	TTT CTCATCCAGTCT TAACTTAAAC
	dCas12i		C10T	23±2%	
	dCas12		C11T	21±1%	
	dCas12i		C11T	21 ±1%	
ABE8e	nCas9	gPDS-T2	T(-15)C*	30±6%	TGCAAATTGAGTTGGGAGTG AGG
	nCas9i		T(-15)C*	35±2%	
	nCas9		T(-16)C*	31±6%	TGCAAATTGAGTTGGGAGTG AGG
	nCas9i		T(-16)C*	36±6%	
	nCas9		T(-17)C*	32±5%	TGCAAATTGAGTTGGGAGTG AGG
	nCas9i		T(-17)C*	37±2%	
	dCas12	gFT	T9C*	12±6%	TTT CAAGATCT ATTGGCCTAAGA
	dCas12i		T9C*	23 ±5%	

Observando de nuevo los resultados de la edición de bases en nuestro trabajo (Tabla 10 y Figuras 13d, 14d-e, 16d y 17d-e) se observa una tendencia al aumento de la proporción de editado en los tratamientos que emplean versiones intronizadas de las proteínas Cas. Esta tendencia al alza se mantiene para la media de eficiencia de edición en todas las posiciones editadas a pesar de ser significativa solamente en el caso del tratamiento con A3A-dCas12i-gFT respecto al tratamiento con A3A-dCas12-gFT (Figura 13d). Esto podría indicar que, como se había propuesto al comienzo del trabajo, el empleo de Cas intronizadas favorece la expresión de estas proteínas de origen bacteriano en plantas y que, con ello, aumenta su actividad y la eficiencia de la edición.

El aumento de la eficiencia de edición génica en la producción de InDels ya había sido reportado previamente (Grützner et al., 2021), pero se carecía de datos para edición de bases.

A pesar de todos estos resultados positivos no se pudo realizar, como se ha comentado anteriormente, la comprobación de la eficiencia de las construcciones para la edición de FT basadas en Cas9, debido a la limitación temporal del proyecto. Además, no se obtuvieron resultados concluyentes de la edición con A3A-PBE de la diana del guía gPDS-T2 debido a errores en la construcción de los plásmidos.

Por otro lado, hubo combinaciones editor-guía con las que no fue posible lograr resultados de edición evidente. Estos casos son en los que se emplea el guía gETR23 con nCas9/nCas9i y ambos editores, y en los que se emplea el guía gPDS1 con dCas12/dCas12i con el editor ABE8e.

La ausencia de edición con gETR23 empleando los editores A3A-PBE (Figura 12) y ABE8e (Figura 15) podría ser indicativo de un mal funcionamiento del editor o de la guía. Sin embargo, los mismos editores han sido utilizados como parte de otras construcciones que sí son funcionales, por lo que este no parece ser el problema. Es por ello, que parece más coherente pensar que la falta de editado se deba al diseño de la guía gETR23. La secuencia diana de este guía procede de un trabajo previo (Hsu et al., 2021) que la emplea para la edición de bases con CBE de forma satisfactoria en *N. benthamiana* y que, a su vez, toma este guía de otro trabajo (Shimatani et al., 2017) que la usa como guía para generar mutaciones *knockout* en arroz y tomate. Por ello, el problema de funcionamiento del sistema podría encontrarse en la generación de la propia guía dirigida a la secuencia extraída de Hsu et al., 2017 o su ensamblaje en el laboratorio, por lo que habría que verificar su funcionamiento recurriendo a un control positivo de InDel. Este control se creó en el presente trabajo y se introdujo en *Agrobacterium*, pero no se infiltró por la confianza en el diseño del guía y en estos trabajos previos.

Por otro lado, para analizar la ausencia de edición al emplear el editor ABE8e de Cas12 con el guía gPDS1 (datos no mostrados) debemos tener en cuenta dos resultados. Estos resultados son, por un lado, la comprobación de un control positivo de InDel (Cas12-gPDS1) que verifica la funcionalidad del guía; y, por otro lado, la presencia de edición de bases para este mismo guía empleando el otro editor, A3A-PBE. Esto nos lleva a pensar que el problema en este caso es la secuencia diana de la edición, que se corresponde con la secuencia del gRNA. Esta secuencia que, figura en la Tabla 10, cuenta con bases de A en las posiciones +3, +7, +14, +15, +17, +21, +22 y +23 respecto al PAM. Sin embargo, la bibliografía nos indica que la ventana de edición para Cas12 se reduce a una porción del bucle R que se encuentra entre las posiciones 8-13 respecto al PAM (Porto et al., 2020), donde no encontramos ninguna base de A.

En paralelo a los experimentos de edición de bases, se crearon 3 construcciones de editores génicos para la producción de InDels basados en Cas9, Cas12 e iCas12. Los dos primeros se combinaron en cis con tres guías dirigidas al gen *HispS*, clave en la ruta de bioluminiscencia del hongo *N. nambii*. El objetivo de estas construcciones era evaluar el uso de un reportero bioluminiscente para comparar la eficiencia de distintas proteínas Cas, en este caso Cas9 y Cas12. El tercero de los editores (iCas12) se empleó, junto con la Cas12 no intronizada, para comparar empleando co-infiltración y expresión en trans, la eficiencia de formación de InDel de Cas12 e iCas12.

En estos experimentos de edición genética del gen *HispS*, cabe señalar que solamente una de las construcciones editor-guía en cis (Cas12-gH3, Figura 20) produce un descenso significativo del ratio Luc/eGFP. Esto indicaría que este guía conduce a la edición de una parte crucial de la función proteica y disminuye la bioluminiscencia que se genera. Sin embargo, debido a que este guía

(gH3) no muestra mayor efectividad en el descenso del ratio Luc/eGFP en los tratamientos con editor y guía en trans (iCas12+gH3 y Cas12+gH3, Figura 21), probablemente debido a la elevada variabilidad del ensayo, lo más conveniente sería modificar el diseño experimental. Estas modificaciones deben ir dirigidas a aumentar el número de réplicas para minimizar la variabilidad y/o a evitar la coinfiltración de reportero, que genera la bioluminiscencia, y sistema de edición (Cas y guía, ya sea en cis o en trans). Esta segunda opción se refiere al cambio de esta cotransformación por la infiltración de los sistemas de edición en hojas de plantas transgénicas de *N. benthamiana* que presenten bioluminiscencia de forma estable, con una señal constante. Además, sería interesante en el futuro el diseño de un reportero de bioluminiscencia en el cual la generación de InDels o el editado de base resultase en una ganancia de bioluminiscencia en lugar de una pérdida, ya que esta es más difícil de detectar.

6. Conclusiones

Las conclusiones que se extraen del presente Trabajo de Fin de Máster son:

- Es posible la construcción de sistemas de edición de bases de elevada eficiencia en plantas, no solo basados en nCas9 (D10A) sino en dCas12
- Los sistemas de edición de bases que emplean nCas9 (D10A) ofrecen una mayor eficiencia que los que emplean nCas9 (H840A).
- Es posible la construcción de sistemas de edición de bases basados en dCas12 con una eficiencia comparable a los construidos con nCas9, aunque no han podido compararse ambos sistemas con guías dirigidas a la misma secuencia diana.
- Los sistemas de edición de bases que emplean Cas intronizadas presentan una mayor eficiencia que los que emplean Cas no intronizadas.
- No disponemos de datos suficientes que avalen el uso de la ruta de bioluminiscencia como herramienta reportera de edición genética en plantas.

6. Bibliografía

Ahmar, S., Saeed, S., Khan, M. H. U., Ullah Khan, S., Mora-Poblete, F., Kamran, M., ... & Jung, K. H. (2020). A revolution toward gene-editing technology and its application to crop improvement. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5665. Aksoy, E., Yildirim, K., Kavas, M., Kayihan, C., Yerlikaya, B. A., Çalik, I., ... & Demirel, U. (2022). General guidelines for CRISPR/Cas-based genome editing in plants. *Molecular Biology Reports*, 49(12), 12151-12164.

Azameti MK, Dauda WP. Base Editing in Plants: Applications, Challenges, and Future Prospects. *Front Plant Sci*. 2021 Jul 27;12:664997. doi: 10.3389/fpls.2021.664997. PMID: 34386023; PMCID: PMC8353127.

Benner, S. A., & Sismour, A. M. (2005). Synthetic biology. *Nature reviews genetics*, 6(7), 533-543.

Bharat, S. S., Li, S., Li, J., Yan, L., & Xia, L. (2020). Base editing in plants: Current status and challenges. *The Crop Journal*, 8(3), 384-395.

Bhuyan, S. J., Kumar, M., Devde, P. R., Rai, A. C., Mishra, A. K., Singh, P. K., & Siddique, K. H. (2023). Progress in gene editing tools, implications and success in plants: a review. *Frontiers in Genome Editing*, 5..

Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology advances*, 33(1), 41-52.

Budhagatapalli, N., Schedel, S., Gurushidze, M., Pencs, S., Hiekel, S., Rutten, T., ... & Hensel, G. (2016). A simple test for the cleavage activity of customized endonucleases in plants. *Plant Methods*, 12(1), 1-10.

Calvache, C., Vazquez-Vilar, M., Moreno-Giménez, E., & Orzaez, D. (2024). A quantitative autonomous bioluminescence reporter system with a wide dynamic range for Plant Synthetic Biology. *Plant Biotechnology Journal*, 22(1), 37-47.

Pan, C., Sretenovic, S., & Qi, Y. (2021). CRISPR/dCas-mediated transcriptional and epigenetic regulation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 60, 101980.

Chen, F., Lian, M., Ma, B., Gou, S., Luo, X., Yang, K., ... & Lai, L. (2022). Multiplexed base editing through Cas12a variant-mediated cytosine and adenine base editors. *Communications Biology*, 5(1), 1163..

Chen, K., & Gao, C. (2013). TALENs: customizable molecular DNA scissors for genome engineering of plants. *Journal of Genetics and Genomics*, 40(6), 271-279.

Chen, S., Xie, W., Liu, Z., Shan, H., Chen, M., Song, Y., ... & Li, Z. (2020). CRISPR start-loss: a novel and practical alternative for gene silencing through base-editing-induced start codon mutations. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 21, 1062-1073..

Cheng, Y., Zhang, Y., Li, G., Fang, H., Sretenovic, S., Fan, A., ... & Qi, Y. (2023). CRISPR–Cas12a base editors confer efficient multiplexed genome editing in rice. *Plant Communications*. Chuang C-K, Lin W-M. Points of View on the Tools for Genome/Gene Editing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(18):9872. <https://doi.org/10.3390/ijms22189872>

Coelho, M. A., Li, S., Pane, L. S., Firth, M., Ciotta, G., Wrigley, J. D., ... & Taylor, B. J. (2018). BE-FLARE: a fluorescent reporter of base editing activity reveals editing characteristics of APOBEC3A and APOBEC3B. *BMC biology*, *16*(1), 1-11.

da Silva, J. F., Tou, C. J., King, E. M., Eller, M. L., Ma, L., Rufino-Ramos, D., & Kleinstiver, B. P. (2023). Click editing enables programmable genome writing using DNA polymerases and HUH endonucleases. *bioRxiv*.

Ellis, T., Adie, T., & Baldwin, G. S. (2011). DNA assembly for synthetic biology: From parts to pathways and beyond. *Integrative Biology*, *3*(2), 109-118. <https://doi.org/10.1039/c0ib00070a>

Endy, D. (2005). Foundations for engineering biology. *Nature*, *438*(7067), 449-453.

Engstrom, M. D., & Pfeleger, B. F. (2017). Transcription control engineering and applications in synthetic biology. *Synthetic and systems biotechnology*, *2*(3), 176-191.

Gaillochot, C., Peña Fernández, A., Goossens, V., D'Halluin, K., Drozdzecki, A., Shafie, M., ... & Jacobs, T. B. (2023). Systematic optimization of Cas12a base editors in wheat and maize using the ITER platform. *Genome biology*, *24*(1), 6.

Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., Packer, M. S., Badran, A. H., Bryson, D. I., & Liu, D. R. (2017). Programmable base editing of A• T to G• C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, *551*(7681), 464-471.

Gehrke, J. M., Cervantes, O., Clement, M. K., Wu, Y., Zeng, J., Bauer, D. E., ... & Joung, J. K. (2018). An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities. *Nature biotechnology*, *36*(10), 977-982.

Ghoshal, B., Picard, C. L., Vong, B., Feng, S., & Jacobsen, S. E. (2021). CRISPR-based targeting of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* by a bacterial CG-specific DNA methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(23), e2125016118.

Goodin, M. M., Zaitlin, D., Naidu, R. A., & Lommel, S. A. (2008). *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant–pathogen interactions. *Molecular plant-microbe interactions*, *21*(8), 1015-1026.

Grützner, R., Martin, P., Horn, C., Mortensen, S., Cram, E. J., Lee-Parsons, C. W., ... & Marillonnet, S. (2021). High-efficiency genome editing in plants mediated by a Cas9 gene containing multiple introns. *Plant Communications*, *2*(2).

Gupta, R. M., & Musunuru, K. (2014). Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *The Journal of clinical investigation*, *124*(10), 4154-4161.

Heinemann, M., & Panke, S. (2006). Synthetic biology—putting engineering into biology. *Bioinformatics*, *22*(22), 2790-2799.

Hendel, A., Fine, E. J., Bao, G., & Porteus, M. H. (2015). Quantifying on-and off-target genome editing. *Trends in biotechnology*, *33*(2), 132-140.

Hillary, V. E., & Ceasar, S. A. (2023). A review on the mechanism and applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 proteins utilized for genome engineering. *Molecular Biotechnology*, *65*(3), 311-325.

Hsu, C. T., Lee, W. C., Cheng, Y. J., Yuan, Y. H., Wu, F. H., & Lin, C. S. (2021). Genome editing and protoplast regeneration to study plant–pathogen interactions in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Genome Editing*, *2*, 627803.

Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., ... & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology*, *31*(9), 827-832.

Hu, Y., & Li, W. (2022). Development and application of CRISPR-cas based tools. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*, 834646.

Hui Zhang, Jinshan Zhang, Zhaobo Lang, José Ramón Botella & Jian-Kang Zhu (2017) Genome Editing—Principles and Applications for Functional Genomics Research and Crop Improvement, *Critical Reviews in Plant Sciences*, *36*:4, 291-309, DOI: 10.1080/07352689.2017.1402989

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*, *337*(6096), 816-821.

Khan, A. A., El-Sayed, A., Akbar, A., Mangravita-Novo, A., Bibi, S., Afzal, Z., ... & Ali, G. S. (2017). A highly efficient ligation-independent cloning system for CRISPR/Cas9 based genome editing in plants. *Plant Methods*, *13*(1), 1-13.

Kleinstiver, B. P., Sousa, A. A., Walton, R. T., Tak, Y. E., Hsu, J. Y., Clement, K., & Welch, M. M. (2020). Publisher Correction: Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing. *Nature Biotechnology*, *38*(7), 901-902.

Kluesner, M. G., Nedveck, D. A., Lahr, W. S., Garbe, J. R., Abrahante, J. E., Webber, B. R., & Moriarity, B. S. (2018). EditR: a method to quantify base editing from Sanger sequencing. *The CRISPR journal*, *1*(3), 239-250.

Knapp, S., Chase, M. W., & Clarkson, J. J. (2004). Nomenclatural Changes and a New Sectional Classification in *Nicotiana* (Solanaceae). *Taxon*, *53*(1), 73–82. <https://doi.org/10.2307/4135490>

Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A., & Liu, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, *533*(7603), 420-424.

Kotlobay, A. A., Sarkisyan, K. S., Mokrushina, Y. A., Marcet-Houben, M., Serebrovskaya, E. O., Markina, N. M., ... & Yampolsky, I. V. (2018). Genetically encodable bioluminescent system from fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(50), 12728-12732.

Kurotani, K. I., Hirakawa, H., Shirasawa, K., Tanizawa, Y., Nakamura, Y., Isobe, S., & Notaguchi, M. (2023). Genome sequence and analysis of *Nicotiana benthamiana*, the model plant for interactions between organisms. *Plant and Cell Physiology*, *64*(2), 248-257.

Kuscu, C., Parlak, M., Tufan, T., Yang, J., Szlachta, K., Wei, X., ... & Adli, M. (2017). CRISPR-STOP: gene silencing through base-editing-induced nonsense mutations. *Nature methods*, *14*(7), 710-712.

Lee, J., Lim, K., Kim, A., Mok, Y. G., Chung, E., Cho, S. I., ... & Kim, J. S. (2023). Prime editing with genuine Cas9 nickases minimizes unwanted indels. *Nature Communications*, *14*(1), 1786.

Li, C., Zong, Y., Jin, S., Zhu, H., Lin, D., Li, S., ... & Gao, C. (2020). SWISS: multiplexed orthogonal genome editing in plants with a Cas9 nickase and engineered CRISPR RNA scaffolds. *Genome biology*, *21*, 1-15.

Li, C., Zong, Y., Wang, Y., Jin, S., Zhang, D., Song, Q., ... & Gao, C. (2018). Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome biology*, *19*, 1-9.

Li, J., Sun, Y., Du, J., Zhao, Y., & Xia, L. (2017). Generation of targeted point mutations in rice by a modified CRISPR/Cas9 system. *Molecular plant*, *10*(3), 526-529.

Li, Y., Liang, J., Deng, B., Jiang, Y., Zhu, J., Chen, L., ... & Li, J. (2023). Applications and Prospects of CRISPR/Cas9-Mediated Base Editing in Plant Breeding. *Current Issues in Molecular Biology*, *45*(2), 918-935.

Li, J., Zhang, C., He, Y., Li, S., Yan, L., Li, Y., ... & Xia, L. (2023). Plant base editing and prime editing: The current status and future perspectives. *Journal of Integrative Plant Biology*, *65*(2), 444-467.

Luo, J., Abid, M., Tu, J., Cai, X., Zhang, Y., Gao, P., & Huang, H. (2023). Cytosine base editors (CBEs) for inducing targeted DNA base editing in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Plant Biology*, *23*(1), 1-10.

Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Horvath, P., ... & Koonin, E. V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(6), 467-477.

Martin, A. S., Salamango, D. J., Serebrenik, A. A., Shaban, N. M., Brown, W. L., & Harris, R. S. (2019). A panel of eGFP reporters for single base editing by APOBEC-Cas9 editosome complexes. *Scientific reports*, *9*(1), 497.

Mishra, R., Joshi, R.K. and Zhao, K. (2020), Base editing in crops: current advances, limitations and future implications. *Plant Biotechnol J*, *18*: 20-31. <https://doi.org/10.1111/pbi.13225>

Mohanta, T. K., Bashir, T., Hashem, A., Abd_Allah, E. F., & Bae, H. (2017). Genome editing tools in plants. *Genes*, *8*(12), 399..

Nemudryi, A. A., Valetdinova, K. R., Medvedev, S. P., & Zakian, S. M. (2014). TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems: tools of discovery. *Acta Naturae (англоязычная версия)*, *6*(3 (22)), 19-40.

Rizzo, P., Chavez, B. G., Dias, S. L., & D'Auria, J. C. (2023). Plant synthetic biology: from inspiration to augmentation. *Current Opinion in Biotechnology*, *79*, 102857.

Pasin, F., Bedoya, L. C., Bernabé-Orts, J. M., Gallo, A., Simón-Mateo, C., Orzaez, D., & García, J. A. (2017). Multiple T-DNA delivery to plants using novel mini binary vectors with compatible replication origins. *ACS Synthetic Biology*, *6*(10), 1962-1968.

Petolino, J. F. (2015). Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *51*, 1-8.

Pickar-Oliver, A., & Gersbach, C. A. (2019). The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(8), 490-507.

Porto, E. M., Komor, A. C., Slaymaker, I. M., & Yeo, G. W. (2020). Base editing: advances and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(12), 839-859.

Puchta, H. (2005). The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *Journal of experimental botany*, 56(409), 1-14.

Ranawaka, B., An, J., Lorenc, M. T., Jung, H., Sulli, M., Aprea, G., ... & Waterhouse, P. M. (2023). A multi-omic *Nicotiana benthamiana* resource for fundamental research and biotechnology. *Nature Plants*, 9(9), 1558-1571.

Richter, M. F., Zhao, K. T., Eton, E., Lapinaite, A., Newby, G. A., Thuronyi, B. W., ... & Liu, D. R. (2020). Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity. *Nature biotechnology*, 38(7), 883-891..

Rizzo, P., Chavez, B. G., Dias, S. L., & D'Auria, J. C. (2023). Plant synthetic biology: from inspiration to augmentation. *Current Opinion in Biotechnology*, 79, 102857.

Sakata, R. C., Ishiguro, S., Mori, H., Tanaka, M., Tatsuno, K., Ueda, H., ... & Yachie, N. (2020). Base editors for simultaneous introduction of C-to-T and A-to-G mutations. *Nature biotechnology*, 38(7), 865-869.

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), 1618-1631.

Schaumberg, K. A., Antunes, M. S., Kassaw, T. K., Xu, W., Zalewski, C. S., Medford, J. I., & Prasad, A. (2016). Quantitative characterization of genetic parts and circuits for plant synthetic biology. *Nature methods*, 13(1), 94-100.

Schindele, P., & Puchta, H. (2020). Engineering CRISPR/LbCas12a for highly efficient, temperature-tolerant plant gene editing. *Plant Biotechnology Journal*, 18(5), 1118.

Senthilnathan, R., Ilangovan, I., Kunale, M., Easwaran, N., Ramamoorthy, S., Veeramuthu, A., & Kodiveri Muthukaliannan, G. (2023). An update on CRISPR-Cas12 as a versatile tool in genome editing. *Molecular Biology Reports*, 50(3), 2865-2881.

Sheriff, A., Guri, I., Zebrowska, P., Llopis-Hernandez, V., Brooks, I. R., Tekkela, S., ... & Jacków, J. (2022). ABE8e adenine base editor precisely and efficiently corrects a recurrent COL7A1 nonsense mutation. *Scientific reports*, 12(1), 19643.

Shimatani, Z., Kashojiya, S., Takayama, M., Terada, R., Arazoe, T., Ishii, H., ... & Kondo, A. (2017). Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nature biotechnology*, 35(5), 441-443.

Tani, H., Chen, X., Nurmberg, P., Grant, J. J., SantaMaria, M., Chini, A., ... & Loake, G. J. (2004). Activation tagging in plants: a tool for gene discovery. *Functional & integrative genomics*, 4, 258-266.

Till, B. J., Burtner, C., Comai, L., & Henikoff, S. (2004). Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases. *Nucleic acids research*, 32(8), 2632-2641.

Veillet, F., Perrot, L., Chauvin, L., Kermarrec, M. P., Guyon-Debast, A., Chauvin, J. E., ... & Mazier, M. (2019). Transgene-free genome editing in tomato and potato plants using agrobacterium-mediated delivery of a CRISPR/Cas9 cytidine base editor. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 402.

Wang, J. Y., & Doudna, J. A. (2023). CRISPR technology: A decade of genome editing is only the beginning. *Science*, 379(6629), eadd8643.

Wang, M., Xu, Z., Gosavi, G., Ren, B., Cao, Y., Kuang, Y., ... & Zhou, H. (2020). Targeted base editing in rice with CRISPR/ScCas9 system. *Plant Biotechnology Journal*, 18(8), 1645.

Wang, Y. H., Wei, K. Y., & Smolke, C. D. (2013). Synthetic biology: advancing the design of diverse genetic systems. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 4, 69-102.

Wang, Z., Liu, X., Xie, X., Deng, L., Zheng, H., Pan, H., ... & Zhong, C. (2021). ABE8e with polycistronic tRNA-gRNA expression cassette significantly improves adenine base editing efficiency in *Nicotiana benthamiana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5663.

Wang, Y., & Demirel, G. S. (2023). Synthetic biology for plant genetic engineering and molecular farming. *Trends in Biotechnology*.

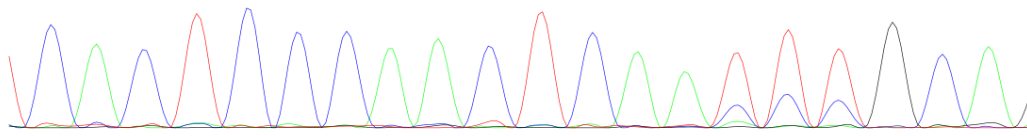
Wettengel, J. M., Hansen-Palmus, L., Yusova, S., Rust, L., Biswas, S., Carson, J., ... & Burwitz, B. J. (2023). A Multifunctional and Highly Adaptable Reporter System for CRISPR/Cas Editing. *International journal of molecular sciences*, 24(9), 8271.

Zeng, J., Banerjee, A., Kim, J., Deng, Y., Chapman, T. W., Daniel, R., & Sarpeshkar, R. (2019). A novel bioelectronic reporter system in living cells tested with a synthetic biological comparator. *Scientific reports*, 9(1), 7275.

Zong, Y., Song, Q., Li, C., Jin, S., Zhang, D., Wang, Y., ... & Gao, C. (2018). Efficient C-to-T base editing in plants using a fusion of nCas9 and human APOBEC3A. *Nature Biotechnology*, 36(10), 950-953.

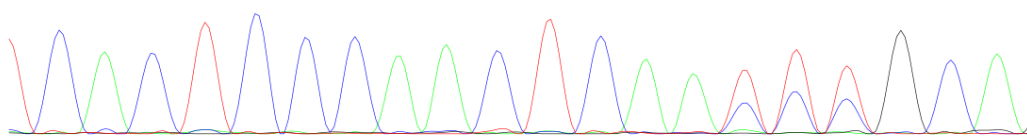
ANEXO I. Cromatogramas correspondientes a las hojas 1, 2 y 3 (L1, L2 y L3) tratadas con A3A-nCas9- gPDS-T2 a 5 dpi

L1



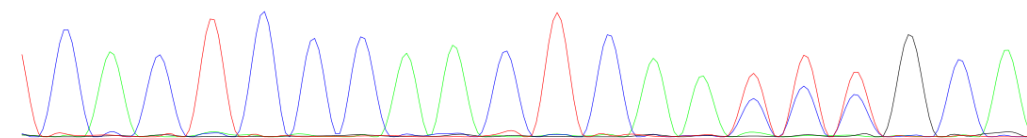
	C	A	C	T	C	C	C	A	A	C	T	C	A	A	T	T	T	G	C	A
T	4	4	5	92	2	1	0	3	0	8	95	3	3	5	71	72	70	1	1	0
G	0	1	2	0	0	0	2	1	3	1	0	0	2	3	1	2	3	96	4	6
C	94	6	91	3	96	95	95	3	4	89	2	93	3	1	22	25	25	2	92	2
A	2	89	2	4	2	4	3	93	93	2	2	4	93	91	6	2	2	1	3	92

L2



	C	A	C	T	C	C	C	A	A	C	T	C	A	A	T	T	T	G	C	A
T	3	2	3	93	2	0	1	1	0	6	96	3	3	4	64	65	63	1	1	0
G	0	1	1	0	1	2	2	1	2	2	0	0	2	1	1	1	3	96	3	5
C	95	6	93	3	97	96	95	3	4	90	2	95	2	2	31	33	32	2	94	1
A	2	92	2	4	0	3	2	96	94	2	2	2	93	93	4	1	2	1	2	94

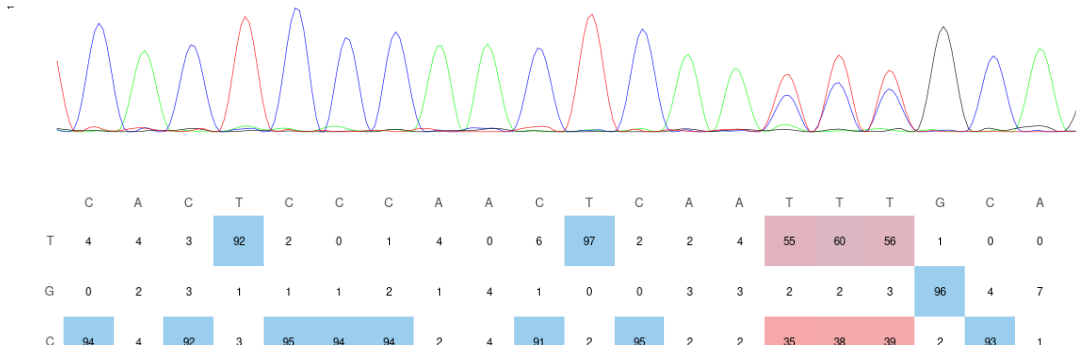
L3



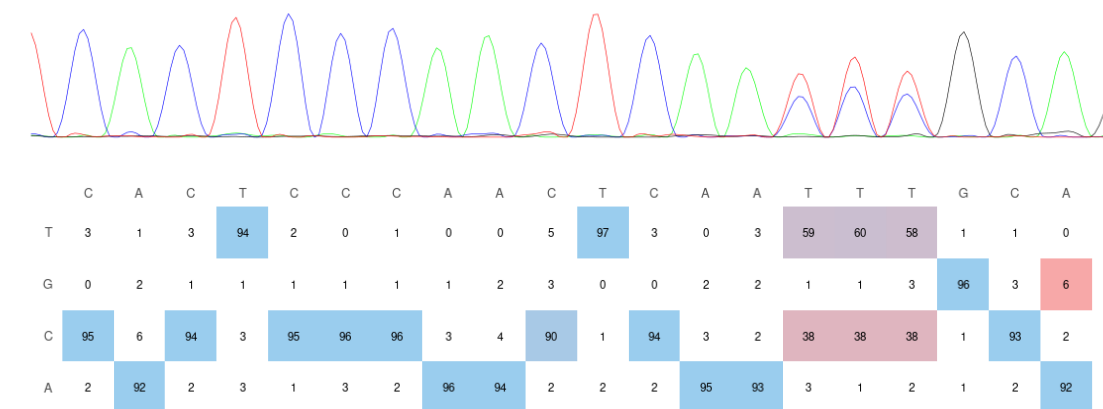
	C	A	C	T	C	C	C	A	A	C	T	C	A	A	T	T	T	G	C	A
T	4	2	4	93	2	1	0	1	0	7	96	3	3	4	59	60	58	1	2	0
G	0	1	2	0	0	0	2	1	3	1	0	0	3	2	1	2	3	96	3	5
C	95	5	92	3	96	96	96	3	4	90	2	95	3	2	36	37	38	2	93	2
A	2	91	2	4	2	3	2	94	94	2	2	2	91	92	4	1	2	1	2	93

ANEXO II. Cromatogramas correspondientes a las hojas 1, 2 y 3 (L1, L2 y L3) tratadas con A3A-nCas9i-gPDS-T2 a 5 dpi

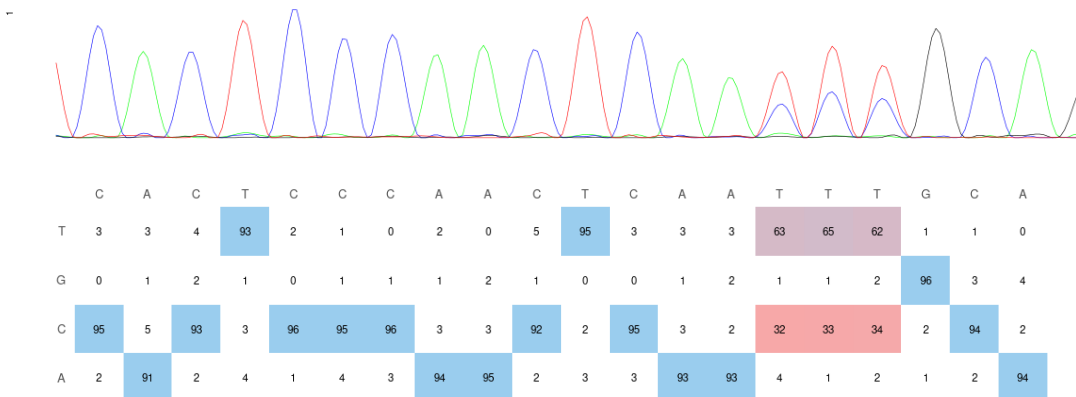
L1



L2

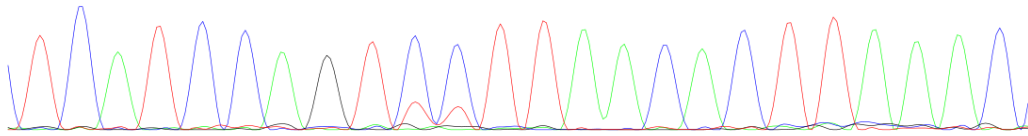


L3



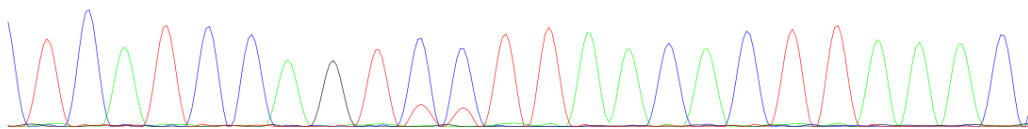
ANEXO III. Cromatogramas correspondientes a las hojas 1, 2 y 3 (L1, L2 y L3) tratadas con A3A-dCas12-gPDS1 a 5 dpi

L1



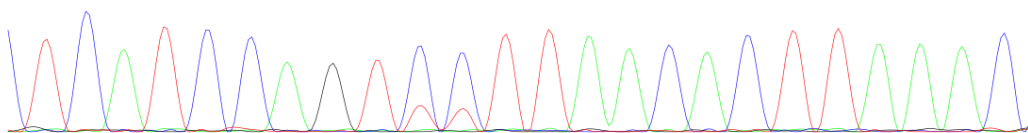
	T	C	A	T	C	C	A	G	T	C	C	T	T	A	A	C	A	C	T	T	A	A	A	C
T	94	2	4	95	4	4	3	3	90	21	21	95	94	2	1	3	0	3	92	86	2	2	3	2
G	3	2	0	2	0	1	7	91	1	5	3	1	4	0	0	0	1	3	0	4	5	5	2	6
C	2	94	3	2	93	93	2	4	4	72	76	3	0	1	2	94	3	93	5	5	7	5	4	90
A	1	2	94	2	3	2	88	2	5	2	0	2	2	97	98	3	95	1	3	5	86	88	91	2

L2



	T	C	A	T	C	C	A	G	T	C	C	T	T	A	A	C	A	C	T	T	A	A	A	C
T	92	2	2	96	3	2	0	2	93	20	19	94	96	2	1	1	0	2	93	94	2	1	0	1
G	3	1	2	0	1	1	3	93	2	0	2	1	0	1	1	0	2	1	2	1	2	2	2	0
C	2	96	3	2	96	96	2	2	2	79	79	2	1	1	2	96	3	95	2	1	0	0	2	97
A	4	1	93	2	0	1	95	3	3	1	0	4	3	96	96	3	94	1	3	3	95	97	95	2

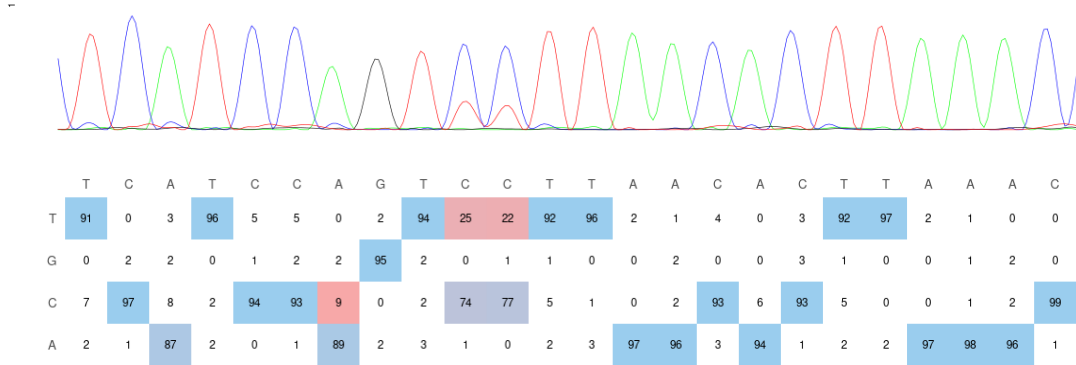
L3



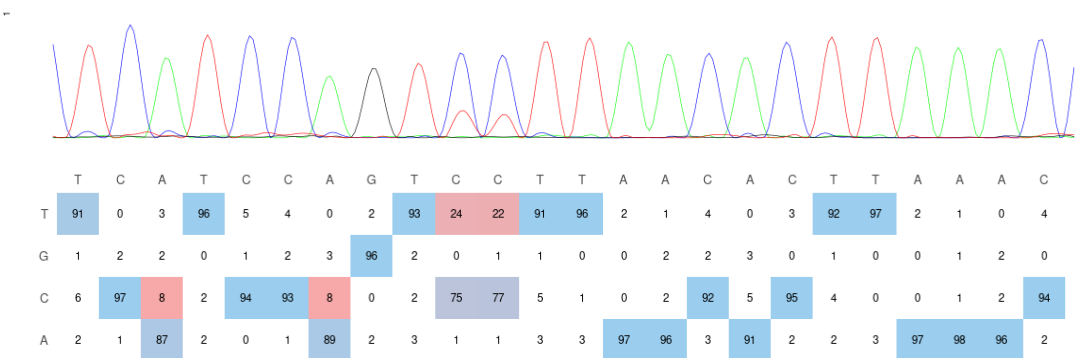
	T	C	A	T	C	C	A	G	T	C	C	T	T	A	A	C	A	C	T	T	A	A	A	C
T	91	2	2	95	2	4	0	2	93	23	22	93	97	2	1	1	0	2	93	94	2	1	0	4
G	5	2	2	0	1	2	3	92	2	0	1	2	0	3	1	0	2	2	1	1	2	3	2	0
C	2	96	3	2	97	92	2	2	3	75	75	2	0	1	2	96	3	94	3	2	3	2	3	95
A	3	1	93	3	0	2	94	4	2	2	2	3	3	95	96	3	94	2	2	3	93	94	95	1

ANEXO IV. Cromatogramas correspondientes a las hojas 1, 2 y 3 (L1, L2 y L3) tratadas con A3A-dCas12i-gPDS1 a 5 dpi

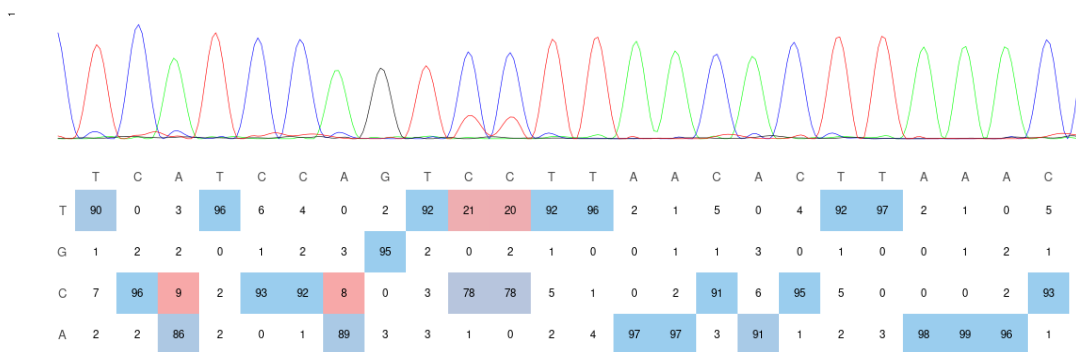
L1



L2

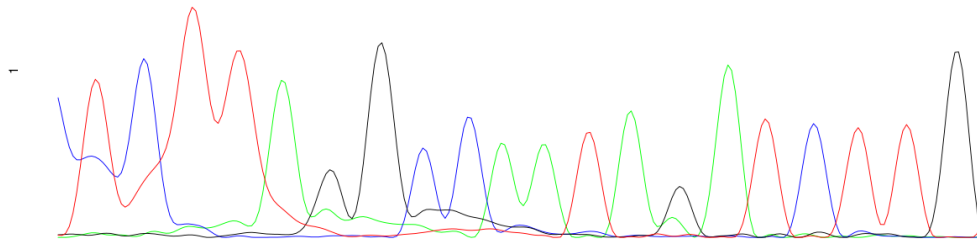


L3



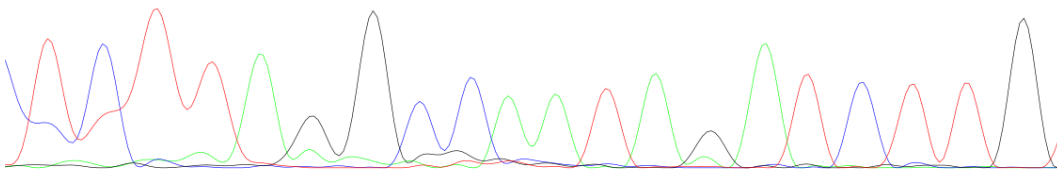
ANEXO V. Cromatogramas correspondientes a las hojas 1, 2 y 3 (L1, L2 y L3) tratadas con A3A-dCas12-gFT a 5 dpi

L1



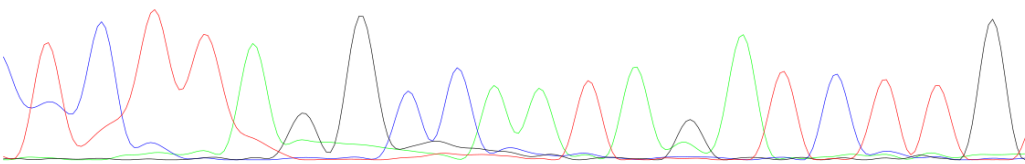
	T	C	T	T	A	G	G	C	C	A	A	T	A	G	A	T	C	T	T	G
T	64	0	89	89	0	0	1	0	5	7	0	90	1	5	0	94	1	90	96	0
G	2	2	1	2	0	69	89	24	17	0	0	3	2	67	2	3	4	3	3	99
C	33	95	5	1	1	2	0	76	74	11	0	5	2	2	1	1	92	5	0	0
A	2	3	4	8	99	29	9	0	4	82	100	2	96	26	97	2	3	2	1	0

L2



	T	C	T	T	A	G	G	C	C	A	A	T	A	G	A	T	C	T	T	G
T	70	0	88	84	0	0	0	3	6	7	2	90	1	3	0	93	1	90	94	0
G	2	0	3	2	3	72	93	16	15	10	6	4	1	74	2	4	0	3	3	99
C	24	94	5	1	2	3	0	74	77	9	0	4	2	0	3	1	96	6	1	1
A	4	6	5	12	95	26	7	8	3	74	92	1	96	22	95	2	2	1	1	0

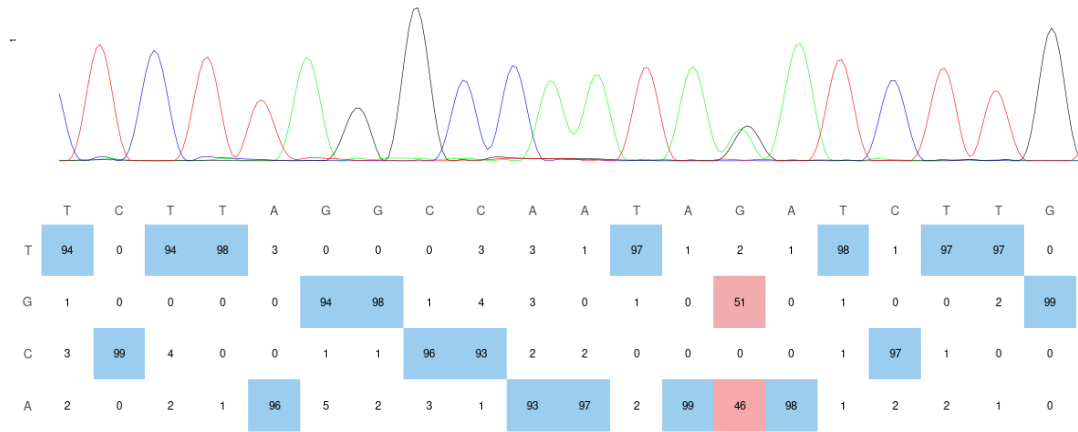
L3



	T	C	T	T	A	G	G	C	C	A	A	T	A	G	A	T	C	T	T	G
T	65	0	85	90	0	0	0	0	6	6	2	85	1	3	0	92	1	83	83	0
G	1	1	1	2	2	68	98	0	16	0	7	3	3	64	2	3	2	2	5	95
C	32	99	10	1	0	3	2	100	78	13	0	7	0	5	0	3	91	9	4	1
A	1	0	4	7	98	29	0	0	0	81	91	6	96	28	98	2	6	6	8	4

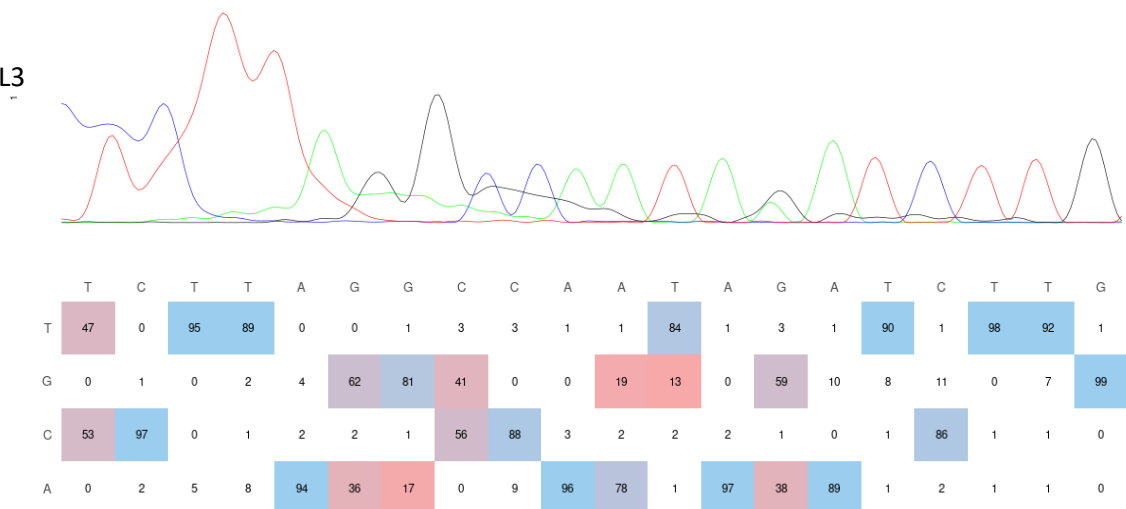
ANEXO VI. Cromatogramas correspondientes a las hojas 1, 2 y 3 (L1, L2 y L3) tratadas con A3A-dCas12i-gFT a 5 dpi

L1



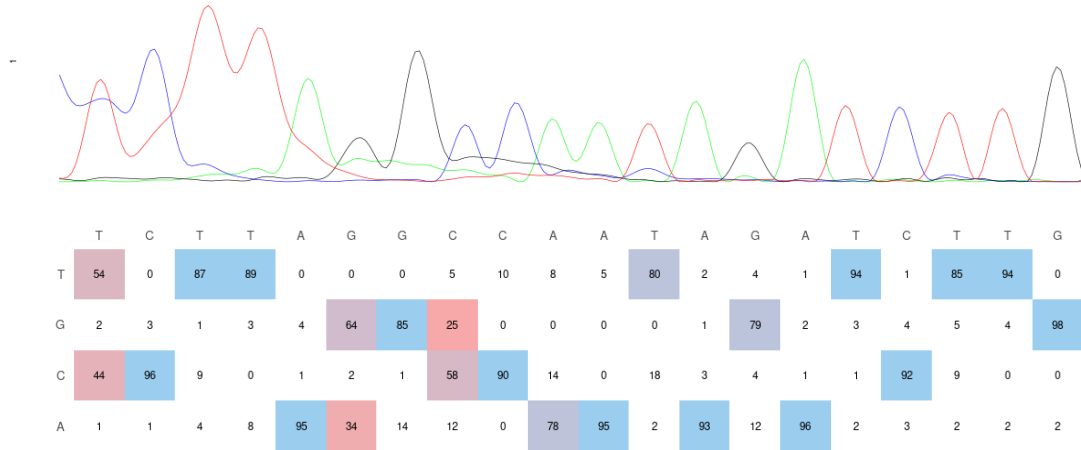
L2 (sin datos)

L3

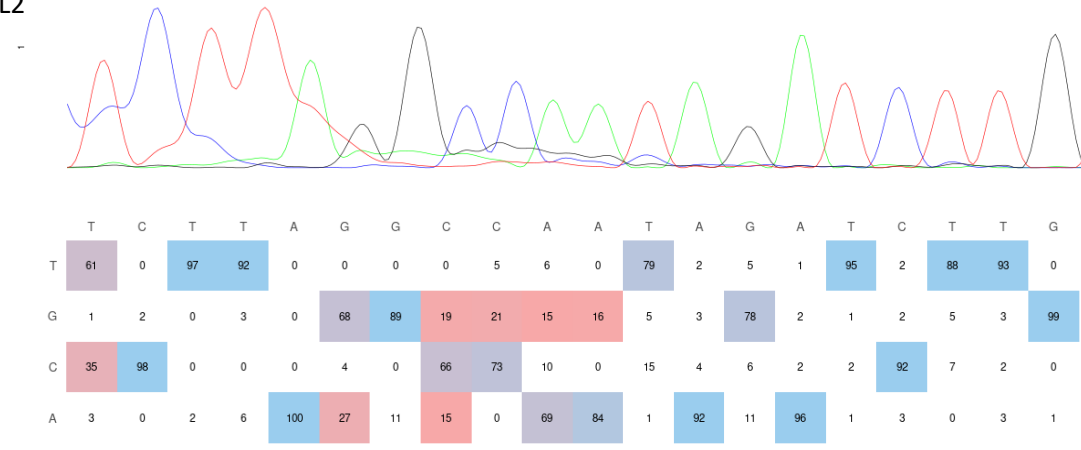


ANEXO VII. Cromatogramas correspondientes a las hojas 1, 2 y 3 (L1, L2 y L3) tratadas con ABE8e-dCas12-gFT a 5 dpi

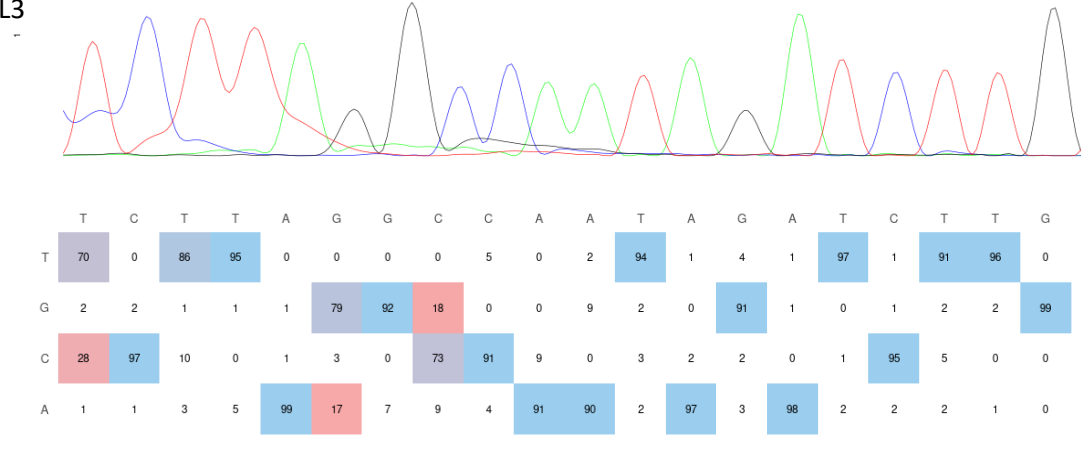
L1



L2

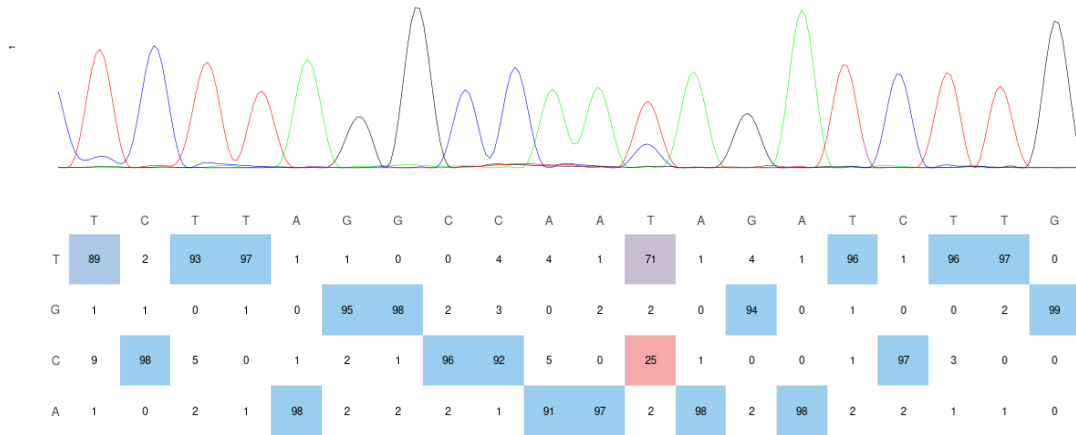


L3



ANEXO VIII. Cromatogramas correspondientes a las hojas 1, 2 y 3 (L1, L2 y L3) tratadas con ABE8e-dCas12i-gFT a 5 dpi

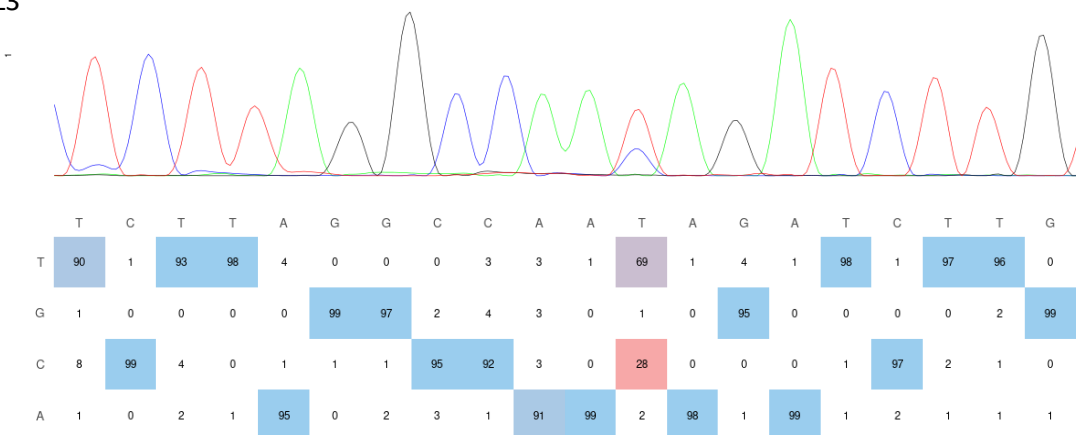
L1



L2

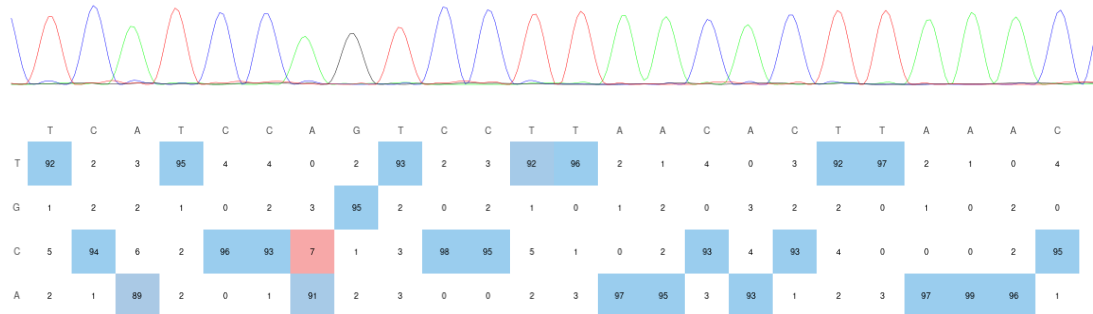


L3

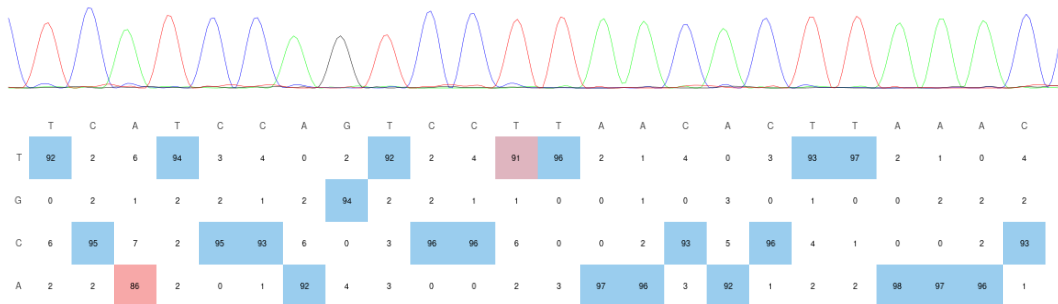


ANEXO IX. Cromatogramas correspondientes a las hojas 1, 2 y 3 (L1, L2 y L3) tratadas con nCas9i-gPDS-T2 a 5 dpi

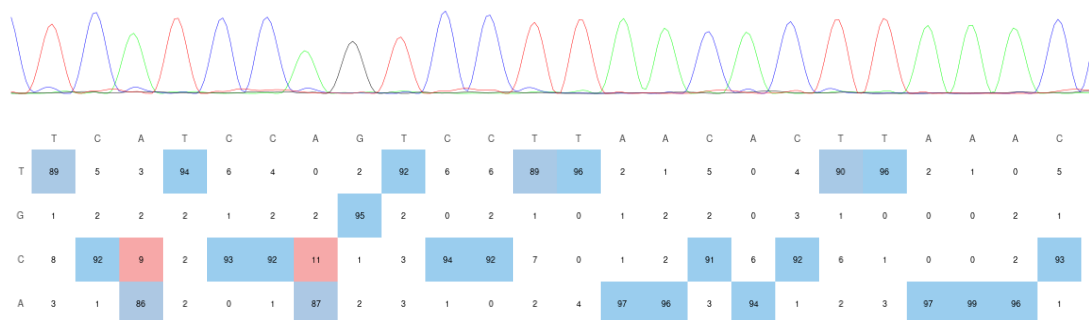
L1



L2

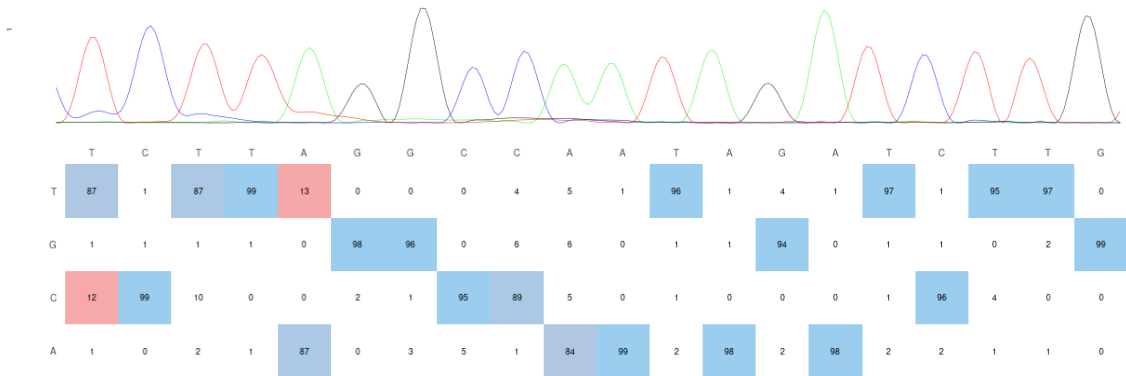


L3

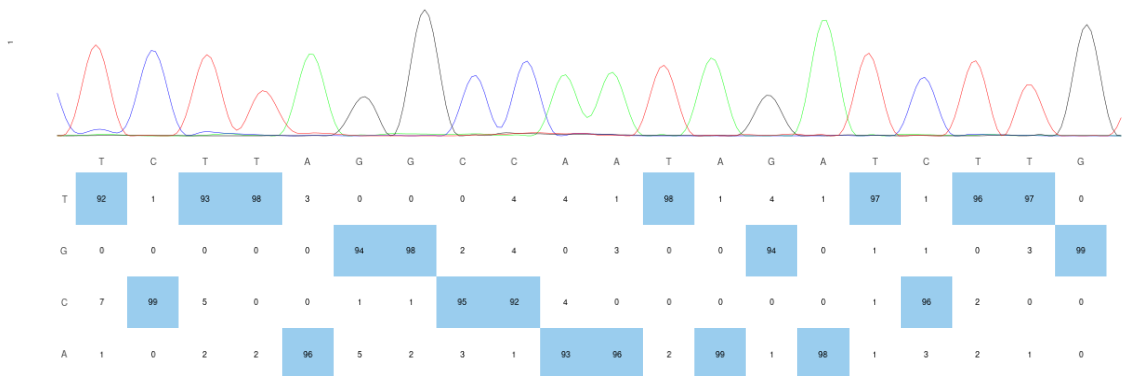


ANEXO X. Cromatogramas correspondientes a las hojas 1, 2 y 3 (L1, L2 y L3) tratadas con dCas12i-gFT 5 dpi

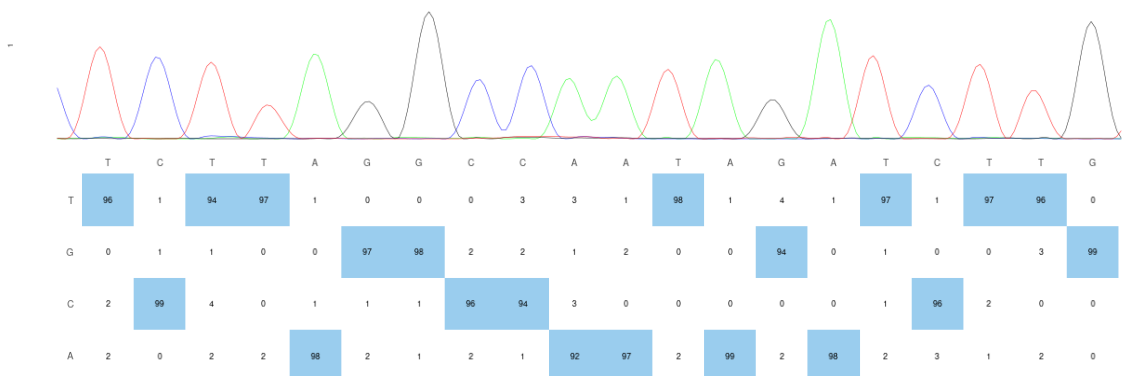
L1



L2

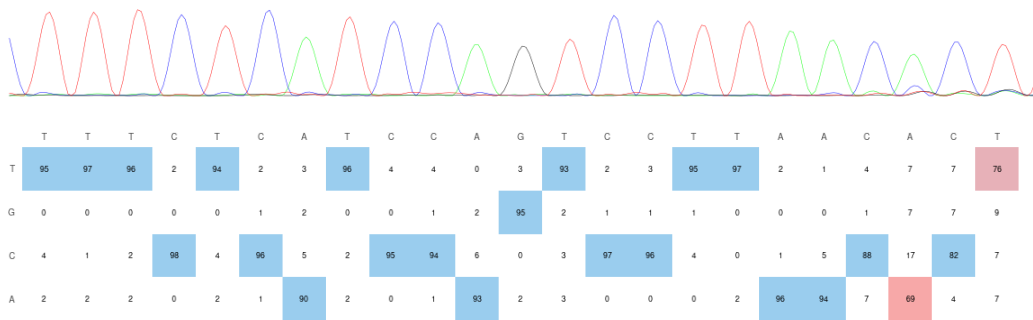


L3

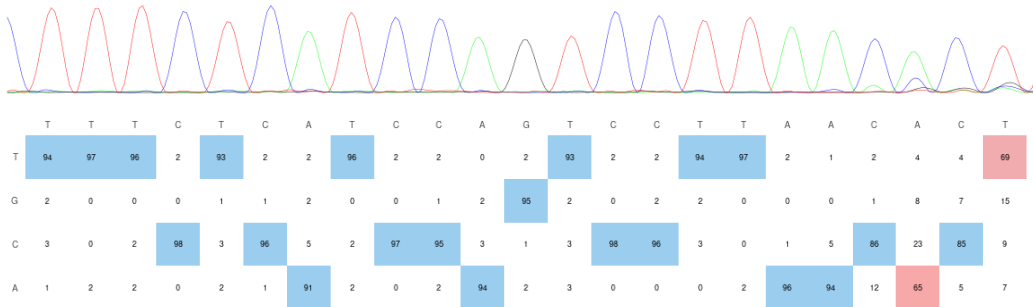


ANEXO X. Cromatogramas correspondientes a las hojas 1, 2 y 3 (L1, L2 y L3) tratadas con Cas12i-gPDS1 5 dpi

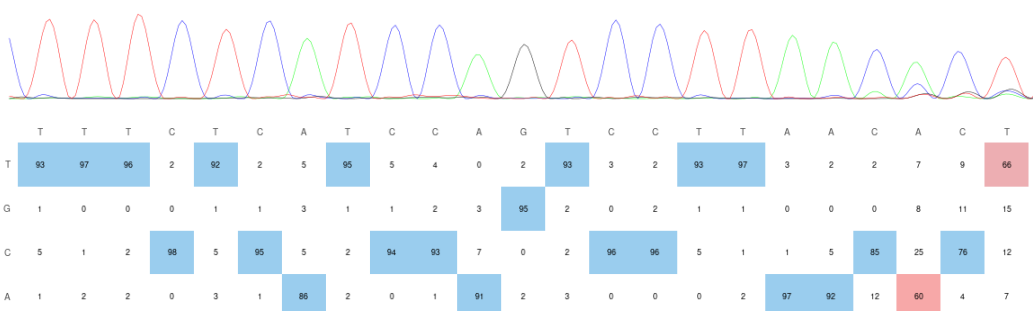
L1



L2

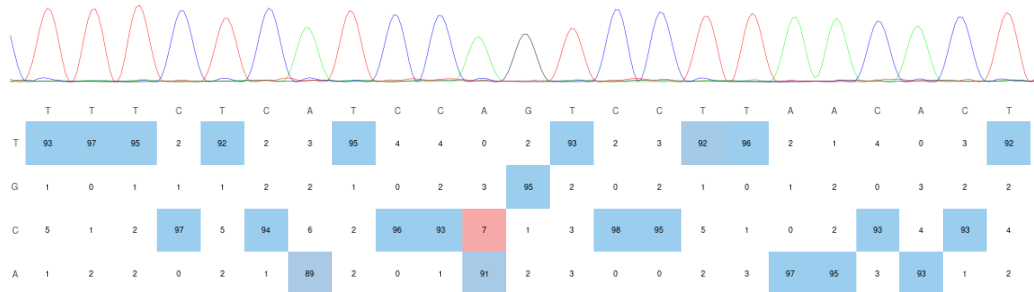


L3

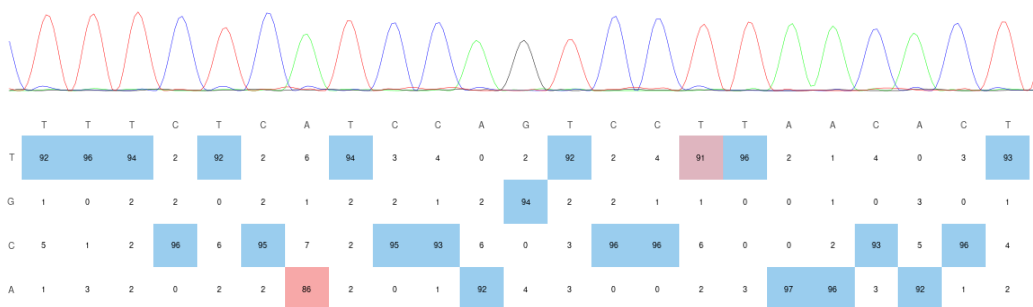


ANEXO X. Cromatogramas correspondientes a las hojas 1, 2 y 3 (L1, L2 y L3) tratadas con dCas12i-gPDS1 5 dpi

L1



L2



L3

