



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Universitat Politècnica de València

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

Desarrollo de activadores transcripcionales programables para plantas basados en el sistema CRISPR/Cas9



ZIENTZIA
ETA TEKNOLOGIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología

Autor: Borja Diego Martin

Director: Diego Orzáez Calatayud

Directora Experimental: Sara Selma García

Tutora Académica (UPV): M^a Carmen Gisbert Doménech

Tutora Académica (EHU): M^a Antonia Unanue Vivanco

Curso: 2017-2018

Título: Desarrollo de activadores transcripcionales programables para plantas basados en el sistema CRISPR/Cas9

Resumen:

La capacidad de reconocimiento específico y unión al ADN del sistema CRISPR/Cas9 ofrece posibilidades sin precedentes en el campo de la biología sintética de plantas. Las modificaciones de la proteína Cas9 o su guía de ARN permiten la expansión del rango de actividades de Cas9, desde su actividad de nucleasa original hasta otras actividades relacionadas con la unión al ADN, como la activación/represión transcripcional. Esto abre la posibilidad de crear circuitos de regulación que permitan controlar la expresión génica con mayor precisión. El objetivo de este trabajo consiste en el diseño y la evaluación de nuevos factores de transcripción programables basados en el sistema CRISPR/Cas9.

Para optimizar el sistema CRISPR/Cas9 como herramienta se empleó una versión catalíticamente inactiva de la endonucleasa Cas9 (*dead* Cas9 o dCas9) a la que se unieron mediante dos estrategias distintas una serie de dominios de activación transcripcional.

Una de las estrategias empleadas, denominada dCas9-SAM o “sinergia de mediadores de activación” consistió en la modificación del ARN guía mediante la incorporación de aptámeros que son reconocidos por la proteína de la cubierta del virus MS2 fusionada a dominios de activación. Como segunda aproximación, se utilizó la estrategia dCas9-Suntag que consiste en la adición de un péptido en el extremo C-terminal, que contiene varias repeticiones de un epítipo que es reconocido por un anticuerpo fusionado a un dominio activador.

El estudio de la activación transcripcional se ha llevado a cabo en *Nicotiana benthamiana* utilizando como diana de activación el promotor de la dihidroflavonol reductasa de *Solanum lycopersicum*, que es un promotor de actividad baja pero inducible por factores de transcripción endógenos tipo MYB. De las dos estrategias evaluadas en este estudio se obtuvieron mayores niveles de expresión con la estrategia dCas9-SAM, alcanzando tasas de activación de más de 20 veces sobre los valores de referencia del promotor no activado.

Palabras clave: *Goldenbraid*, dCas9-Suntag, dCas9-SAM, *Nicotiana benthamiana*, promotor SIDFR

Autor: D. Borja Diego

Director: D. Diego Orzáez Calatayud

Directora experimental: Dña. Sara Selma García

Tutora Académica (UPV): Prof. Dña. M^a Carmen Gisbert Doménech

Tutora Académica (EHU): Prof. Dña. M^a Antonia Unanue Vivanco

Title: Development of programmable plant transcriptional activators based on CRISPR /Cas9

Abstract:

The specific DNA recognition and binding capacity of the CRISPR/Cas9 system offers unprecedented possibilities in the field of Plant Synthetic Biology. Modifications of Cas9 or its guide RNA allow the expansion of Cas9 activities, from the original nuclease function to other activities related to DNA binding, such as transcriptional activation or repression. This opens the possibility of creating regulatory circuits that allow controlling genetic expression with greater precision. The aim of this work consists on the design and evaluation of new programmable transcriptional activators based on the CRISPR/Cas9 system.

In order to optimise the CRISPR/Cas9 system as a tool for transcriptional regulation a catalytically inactive version of the Cas9 endonuclease (*dead* Cas9 or dCas9) was used, to which a series of transcriptional activation domains were bound by two different strategies.

One of the strategies, dCas9-SAM (Synergistic activation mediator) is based on the incorporation of aptamers to the gRNA scaffold, to which viral coat proteins fused to activator domains will bind. A second approach was dCas9-Suntag. This strategy consists on the addition of a C-terminal peptide, which contains several repeats of an epitope that is recognized by antibodies fused to transcriptional regulator domains.

The study of transcriptional activation has been carried out in *Nicotiana benthamiana*, targeting the dihydroflavonol reductase promoter of *Solanum lycopersicum*, which is a weak promoter, inducible by endogenous MYB-like transcriptional factors. As a result of this study it was found that the dCas9-SAM strategy results in higher levels of expression, reaching increases in transcription rates of more than 20 fold as compared with the reference values of the non-activated promoter.

Key Words: Goldenbraid, dCas9-Suntag, dCas9-SAM, *Nicotiana benthamiana*, SIDFR promoter

Author: Borja Diego

Director: Diego Orzáez Calatayud

Experimental Director: Sara Selma García

Academic tutor (UPV): Prof. M^a Carmen Gisbert Doménech

Academic tutor (EHU): Prof. M^a Antonia Unanue Vivanco

Agradecimientos

Primero de todo, Diego, muchísimas gracias por permitirme realizar en tu laboratorio inicialmente las prácticas y posteriormente llevar a cabo el TFG. Ha sido una experiencia *estupenfástica* (estupenda + fantástica). Considero que eres un gran jefe y una mente brillante. También *eskerrik asko* por todo el apoyo que me has brindado siempre que lo he necesitado; solicitud de becas, convenios de prácticas, presentaciones a concursos y muchos trámites más, estoy enormemente agradecido.

Sara, mil gracias, por enseñarnos todo lo que sabes, sin ti evidentemente no habiéramos podido desarrollar este maravilloso proyecto. ¡De no tener ningún alumno a tener tres! Sé que ha supuesto una locura máxima para ti, pero has sabido defenderte bien. Asimismo, agradecerte tu extremada paciencia a la hora de soportar mi singular forma de ser, se que lidiar conmigo no te habrá sido nada fácil, todo un reto de liderazgo...Valoro muchísimo tu dedicación y toda tu imprescindible ayuda.

Mis bilbaínas favoritas, Asun y Silvia, los pilares del labo, y protectoras del fuerte. Con vosotras dos uno se siente comprendido y como en casa. Y Asun el gran oráculo...si existe duda pregunta a Asun.

Del *euskaliadas* a Joan: gracias por los consejos y la ayuda cuando la he precisado (vamos, innumerables veces) y por todas esa cultura que nos has transmitido día a día.

Y mis compis *Symbio begginers*, os voy a echar montón de menos, no os imagináis, estas últimas semanas que no pasaba por el laboratorio y andaba muy ocupado estudiando economía ya me daba cuenta, tengo el mono...María, te tengo un cariño especial, hacemos un equipo mágico, un placer compartir esta experiencia contigo, voy a echarte mucho en falta el año que viene. Javi, mi compinche contra Joan, cuantas risas nos hemos echado...Como ya te he comentado alguna vez si algún día monto una empresa te contrato. Agos y Alicia (*las de la poyata de al lado*) sois geniales eso de poder contar con vosotras en todo momento es estupendo, ya bien sea para comentar nuestras alegrías o nuestras penas, o para componer canciones sobre la agroinfiltración. Habéis sido un gran apoyo. Y nuestra última incorporación, Triana, me ha encantado tenerte en el laboratorio, conocerte más a fondo más allá de clase, me parece súper agradable.

A las *postdocs*, Paloma y Marta, gracias por toda la ayuda que me habéis prestado, y por estar ahí para lo que sea. Y esos bombones de naranja marta son *top-top*.

Mil gracias Carmina por acceder a ser mi tutora, y siento las complicaciones que eso te ha supuesto debido a mi situación. Por cierto, la asignatura de Cultivo in Vitro y Transformación Genética de Plantas, una de las mejores asignaturas de la carrera. Y por parte de EHU, Marian Unanue, me ha hecho mucha-mucha ilusión que fueras mi tutora académica, te agradezco enormemente todo el apoyo y ayuda que he recibido por tu parte, me llevó de la carrera un muy buen recuerdo tuyo, y la sensación de que aprendí muchísimo contigo en MICROPI.

A su vez, gracias a todas las personas involucradas que han hecho posible mi estancia en Valencia, gracias al programa de movilidad SICUE, gracias Asun, Sonia y Maren (UPV/EHU).

A mi espectacular familia, Aita, Ama, Paul, Irene y tambor. Gracias por dejarme y animarme a venir a Valencia. Tía Carmen, mi *abuela metralleta*, te admiro y te quiero mucho. Te estoy enormemente agradecido por acogerme en tu casa los últimos 4 años en los momentos pre-examen, he estado como un rey emperador en el paraíso del estudio y me gustaría dedicarte este trabajo. Gracias por tus ánimos, por cuidarme tanto y por el fuerte *bluetooth*. Finalmente, Mikel, muchas gracias por estar siempre ahí, mejor amigo imposible de quien tanto cariño y apoyo he recibido siempre, también me gustaría dedicarte este trabajo.

Índice

1. Introducción	1
2. Objetivos.....	4
3. Materiales y Métodos.....	4
3.1. Material microbiológico	4
3.1.1 <i>Escherichia coli</i>	4
3.1.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	4
3.2. Material vegetal.....	5
3.3 Diseño de los dominios activadores.....	5
3.3.1 Obtención de las secuencias de los dominios.....	5
3.3.2. Domesticación.....	6
3.3.3. Ensamblaje GoldenBraid	7
3.4. Transformación de <i>E. coli</i>	9
3.5. Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	9
3.6. Extracción de plásmidos o <i>Miniprep</i>	9
3.7. Electroforesis en gel de agarosa	9
3.8. Secuenciación.....	9
3.9. Diseño de los ARN guías	10
3.9.1 Diseño de los ARN guías individuales.....	10
3.9.2. Diseño del sistema <i>multiplexing</i>	11
3.10. Agroinfiltración.....	13
3.10.1. Condiciones de cultivo del material vegetal.....	13
3.10.2. Preparación de las soluciones de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
3.11. Ensayo de luciferasa	13
4. Resultados	14
4.1. Caracterización del material vegetal	14
4.2. Estudio de activación de SIDFR.....	15
5. Discusión.....	23
6. Conclusión	24
6. Bibliografía.....	25

Índice de figuras

Figura 1. Estrategia dCas9-SAM.....	2
Figura 2. Estrategia dCas9-SunTag.....	2
Figura 3. Estrategia dCas9-SAM-SunTag.....	2
Figura 4. Edición epigenética por el efecto de la acetilación de histonas.....	3
Figura 5. Material vegetal, generación T2.....	5
Figura 6. Ensamblaje multipartito (reacción <i>GoldenBraid</i>).....	7
Figura 7. Proceso de domesticación vía amplificación por PCR.....	8
Figura 8. Dianas de los guías 1ARNg, 4ARNg y 5ARNg.....	10
Figura 9. Funcionamiento del sistema <i>multiplexing</i>	11
Figura 10. Construcción del <i>multiplexing</i>	12
Figura 11. Reacciones de las luciferasa de luciérnaga y de <i>Renilla reniformis</i>	14
Figura 12. Domesticación del dominio Tv.....	16
Figura 13. Construcciones activadoras.....	16
Figura 14. Estudio de activación del promotor SIDFR en transitoria con dCas9:EDLL—MS2 VPR vía los ARN guías 1, 4 y 5.....	17
Figura 15. Estudio de activación del promotor SIDFR en estable sobre la línea L5-8 DFR vía el ARN guía 1.....	18
Figura 16. Estudio de activación del promotor SIDFR en transitoria vía el ARN guía 1.....	18
Figura 17. Estudio de activación de SIDFR vía el ARN guía 1 sobre la Línea L1-5 DFR.....	19
Figura 18. Estudio comparativo de la activación de SIDFR obtenida vía el ARN guía 1 sobre la Línea L1-5 DFR con la estrategia dCas9-SAM y dCas9-SAM-SunTag.....	20
Figura 19. Estudio de la sobre-activación de DFR vía el ARN guía 1 sobre la Línea L1-5 DFR...	20
Figura 20. Las dianas de los guías empleados en el sistema <i>multiplexing</i>	21
Figura 21. Estudio comparativo de la activación de SIDFR obtenida con los guías del <i>multiplexing</i> y el ARNg1 utilizando la construcción dCas9:EDLL-MS2:VPR en transitoria.....	22
Figura 22. Estudio de la activación del promotor SIDFR en transitoria con la construcción dCas9:EDLL-MS2:VPR empleando el ARNg1 individualmente o junto con los guías del <i>multiplexing</i>	22

Índice de tablas

Tabla 1. Dominios de activación.....	6
Tabla 2. Determinación genotípica del material vegetal por segregación fenotípica	15
Tabla 3. Construcciones activadoras empleadas.....	16
Tabla 4. Posición y código GB de los ARN guías individuales empleados	16
Tabla 5. Construcciones del <i>multiplexing</i> y sus códigos GB.	21

Nomenclaturas y abreviaturas

A. tumefaciens: *Agrobacterium tumefaciens*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADN-T: ADN de transferencia

ARN: Ácido ribonucleico

ARNg: ARN guía

ARNt: ARN de transferencia

bHLH: dominio básico hélice-bucle-hélice

bp: Pares de bases

CDS: Secuencia codificante

CRISPR: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

F6: Aptámero reconocido por MS2

FLuc/RLuc: Ratio entre la luminiscencia emitida por la luciferasa de luciérnaga y la de Renilla

GFP: Proteína fluorescente verde

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

LB: Luria Bertani

Luc: Luciferasa de luciérnaga

MgCl₂: Magnesio cloruro

min: Minuto(s)

mM: Milimolar

MS: Medio Murashige y Skoog

mS: MiliSiemens

N. benthamiana: *Nicotiana benthamiana*

ng: Nanogramo(s)

nm: Nanómetro

nptII: Neomicina fosfotransferasa

°C: Grados Celsius

p35s: Promotor 35s del Virus del Mosaico de la Coliflor

PAM: Motivo adyacente de protoespaciador

pDGB: Plásmido de destino Goldenbraid

pNos: Promotor de la Nopalina sintasa

pUPD2: Plásmido universal domesticador

Ren: Luciferasa de *Renilla raeniformis*

SAM: Mediadores sinérgicos de activación

Scf: Scaffold (estructura terminal del ARN guía)

ScFv: Anticuerpo de cadena simple

SIDFR: Promotor de la dihidroflavonol reductasa de *Solanum lycopersicum*.

T1: Primera generación

T2: Segunda generación

TAE: Tris Acetato EDTA

TALE: Efectores tipo activadores de la transcripción

tnos: Terminador de la Nopalina sintasa

V: Volts

X-Gal: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

ZFN: Nucleasas de dedos de zinc

α 1: Plásmido de destino GoldenBraid alpha1

α 2: Plásmido de destino GoldenBraid alpha2

μ L: Microlitro(s)

μ M: Micromolar

1. Introducción

El poder modular con precisión la expresión génica en plantas posibilitaría la manipulación fenotípica de las mismas, permitiendo por ejemplo la inducción de la floración (Gallego-Bartolomé *et al.*, 2018), el desarrollo de resistencias a enfermedades (Andolfo *et al.*, 2016) o tolerancia a estreses abióticos como la sequía (Park *et al.*, 2017). Pero, además, abriría un abanico de posibilidades en el campo de biología sintética; ya que permitiría controlar las rutas metabólicas, y por lo tanto la posibilidad de dirigir la biosíntesis con el fin de producir metabolitos de interés en abundancia, explotando las plantas como biofactoría (Lalaleo *et al.*, 1996). Sin embargo, en lo que respecta al reto de la activación génica, existe una gran limitación, el conocimiento, muchos genes se encuentran silenciados a nivel de promotor porque requieren factores de transcripción concretos para la inducción de la expresión (Ma, 2011). A pesar de que muchos factores de transcripción han sido identificados y empleados en la activación génica, la gran mayoría de reguladores transcripcionales son desconocidos (Shiu, 2005). Con el fin de vencer dicha limitación en este trabajo se pretende desarrollar activadores transcripcionales para plantas que induzcan la expresión de cualquier gen, sin que se requiera el conocimiento de la existencia de factores de transcripción propios o específicos.

Tradicionalmente, la construcción de activadores transcripcionales artificiales se ha basado fundamentalmente en la fusión de dominios de activación a TALEs (Scholze y Boch, 2011) y a proteínas con dedos de cinc (ZFs) (Sanchez *et al.*, 2002), siendo ambas proteínas capaces de reconocer secuencias de ADN. Pero, están siendo remplazados por los activadores basados en el sistema CRISPR/Cas9 debido a la simplicidad de su construcción y diseño, además de por la eficacia y especificidad de los mismos (La Russa y Qi, 2015), y a ello se debe la elección de este último sistema. Los activadores desarrollados en este trabajo se basan en dCas9, una versión *muerta* de la endonucleasa Cas9, que debido a dos mutaciones ha perdido la característica capacidad de corte de doble hebra de ADN. No obstante, continúa siendo una proteína programable que dependiendo de la secuencia de ARN guía a la que se asocie puede dirigirse a cualquier lugar del genoma, siempre y cuando contenga en su vecindad una secuencia PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) (Qi *et al.*, 2013). Explotando dicha propiedad, se pueden fusionar dominios de activación directamente a dCas9 y dirigirla a un promotor concreto con el fin de activar el gen bajo su regulación. Previamente en el laboratorio, se diseñaron activadores transcripcionales de la manera descrita, y se consiguió casi triplicar los niveles de expresión génica activando el promotor de la nopalina sintasa expresado de forma transitoria en *Nicotiana benthamiana* (Vazquez-Vilar *et al.*, 2016). Con la intención de optimizar la herramienta generada, además del empleo de nuevos dominios, en laboratorio de Genómica y Biotecnología de plantas del IBMCP se han adaptado para plantas dos estrategias basadas en la unión indirecta de dominios activadores a dCas9; denominadas dCas9-SAM y dCas9-SunTag que han sido principalmente utilizadas en células animales (Dominguez *et al.*, 2016).

La estrategia dCas9-SAM (mediadores de activación sinérgicos) reside en el reconocimiento específico de secuencias concretas de ARN por parte de proteínas de cubierta vírica, por ejemplo, MS2 (Peabody, 1993), PP7 (Lim y Peabody, 2002) o COM (Zalatan *et al.*, 2015). Tal y como queda representado en la **Figura 1.**, introduciendo las secuencias o aptámeros correspondientes en el ARN guía, y fusionando dominios de activación a las proteínas de cubierta víricas que los reconocen, se ha conseguido que dichos dominios queden asociados indirectamente a dCas9 (Konermann *et al.*, 2015). En este trabajo se decidió emplear MS2 y dos de sus respectivos aptámeros ya que en experimentos previos se demostró que se conseguían activaciones mayores que las obtenidas con las proteínas de cubierta vírica COM y PP7. Esta estrategia ofrece una posibilidad combinatoria, ya que permite fusionar un dominio directamente a dCas9, y otro vía la interacción aptámero-proteína, permitiendo así la combinación de distintos activadores, de la cual cabría esperar un efecto sinérgico (Zhang *et al.*, 2015).

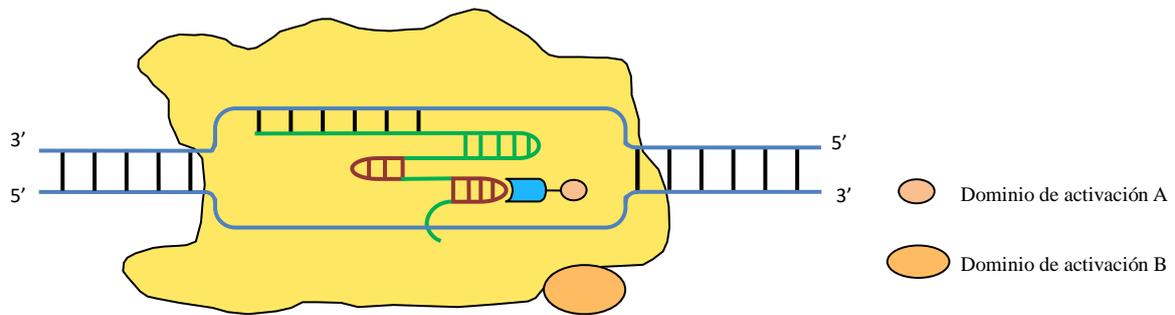


Figura 1. Estrategia dCas9-SAM. Unión de dominios de activación por fusión directa a dCas9, y vía unión al ARNg, por la interacción aptámero-proteína MS2. Como queda reflejado en rojo, en este trabajo se le han incorporado dos aptámeros al ARN guía.

Por otro lado, el método dCas9-SunTag se basa en la afinidad con la cual un anticuerpo se une a su respectivo epítipo. Consiste en la fusión de una cola peptídica a dCas9, que contiene varias repeticiones del epítipo que será reconocido por los anticuerpos de cadena simple ScFv portadores de los activadores (**Figura 2.**). Constituye un sistema de amplificación, ya que se pueden unir varios dominios a dCas9 (Tanenbaum *et al.*, 2014).

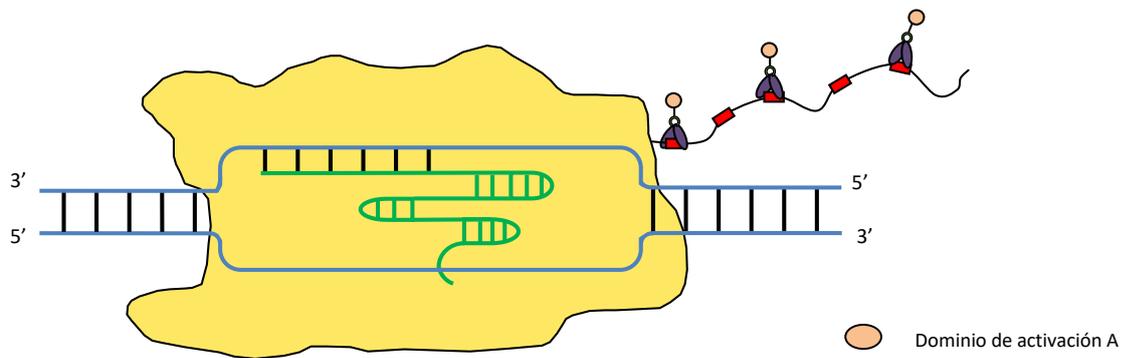


Figura 2. Estrategia dCas9-SunTag. Fusión de un péptido a dCas9, con epítipos reconocibles por anticuerpos ScFv fusionados a dominios activadores.

A su vez, se han aunado ambas aproximaciones, creando dCas9-SAM-SunTag (**Figura 3.**) en la búsqueda de una mayor eficacia en el aumento del nivel de expresión del gen a activar.

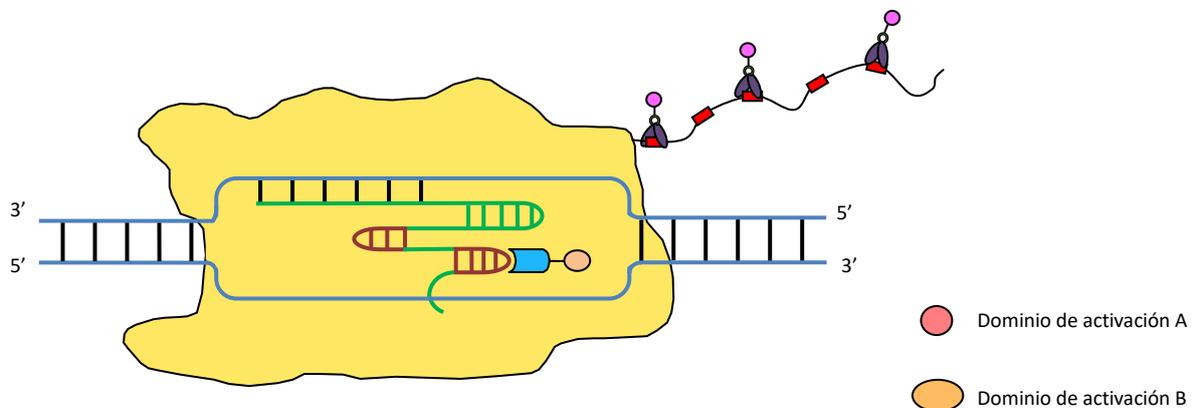


Figura 3. Estrategia dCas9-SAM-SunTag. Unificación de las estrategias dCas9-SAM y dCas9-SunTag.

Finalmente, para lograr la activación se debe garantizar la accesibilidad de dCas9 a la secuencia diana del promotor, ya que si el ADN se encuentra en una conformación compacta o empaquetada no podrá llevar a cabo su función (Thakore *et al.*, 2016). De hecho, la estructura del ADN puede ser otra causa del silenciamiento génico (Allis y Jenuwein, 2016). Por ello, además de utilizar dominios reclutadores de factores de transcripción, se ha empleado un dominio catalítico característico del editado genético, el dominio p300, un acetil transferasa, que acetila la lisina 27 de la histona 3 (Ogryzko *et al.*, 1996).

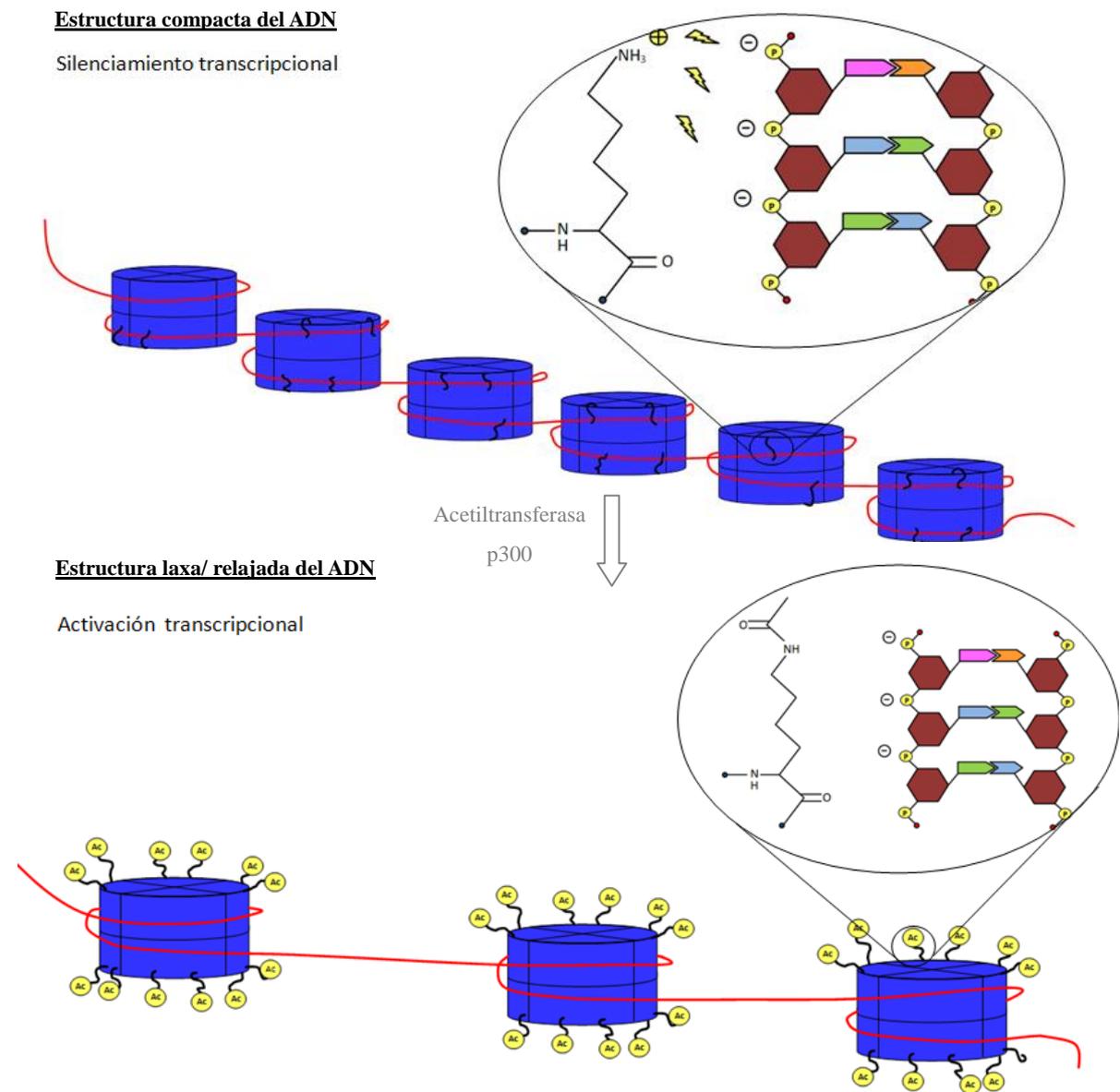


Figura 4. Edición epigenética por el efecto de la acetilación de histonas. A) En una situación fisiológica normal el grupo fosfato del ADN se encuentra negativamente cargado, y por el contrario las colas de las histonas ricas en lisina están positivamente cargadas, por lo tanto se establecen fuerzas atracción, y ADN se queda enrollado formando estructuras denominadas nucleosomas. Ese es el motivo que conlleva a que el ADN se encuentre en una conformación más inaccesible o cerrada, y que la expresión de los genes se vea reducida. B) No obstante, si alguna de estas lisinas es acetilada la unión del ADN con las histonas será menos intensa, y podría permitir la entrada de la polimerasa o de los activadores para la expresión de los genes.

En este trabajo se ha evaluado la activación transcripcional mediada por las distintas estrategias basadas en dCas9. Para estudiar dicha modulación transcripcional se ha trabajado sobre plantas transgénicas de *Nicotiana benthamiana* que tienen integrado el gen reportero de la luciferasa bajo el promotor SIDFR. Aunque, para facilitar y acelerar los ensayos, los experimentos también se han llevado a cabo sobre plantas silvestres, expresando la construcción reportera de forma transitoria, permitiendo a su vez la comparación entre ambos sistemas de expresión. El promotor SIDFR de *Solanum lycopersicum* regula la transcripción de la enzima dihidroflavonol reductasa, que está involucrada en la biosíntesis de antocianinas. En *Nicotiana benthamiana* el promotor tiene muy baja actividad (Vazquez-Vilar *et al.*, 2017). No obstante, el factor de transcripción Ant1 es capaz de activarlo notablemente (Mathews, 2003). Ese es el motivo por el cual se ha escogido el promotor SIDFR como modelo de activación; porque se asemeja a la activación genes endógenos y de posible interés que, *per se*, se encuentran silenciados.

2. Objetivos

El objetivo principal del trabajo es la construcción de activadores transcripcionales para plantas basados en el sistema CRISPR/Cas9 que sean capaces de activar genes silenciados a nivel de promotor. El alcanzar dicho objetivo supondría un gran avance en el reto de la modulación de la expresión génica, ya que no se requeriría el conocimiento sobre los factores de transcripción específicos que inducen la expresión de cada gen, lo cual ha constituido una gran limitación hasta el momento.

Los objetivos secundarios establecidos son la caracterización de las líneas reporteras SIDFR, sobre las que se han realizado los estudios de activación, y la comparación de la activación entre los sistemas de expresión transitoria y estable.

3. Materiales y Métodos

3.1. Material microbiológico

3.1.1 *Escherichia coli*

Todas las piezas génicas empleadas forman parte de la colección *GoldenBraid*, y se encuentran en plásmidos almacenados dentro de *Escherichia coli Top10 (Thermofisher)* glicerizadas y congeladas a -80°C. Dicha cepa presenta una gran ventaja; debido a una mutación en el gen *LacZ*, permite la identificación visual o fenotípica de las bacterias que contengan el inserto (la pieza) basándose en el color blanco de las mismas al añadir un inductor de la síntesis de la B-galactosidasa (e.g. IPTG) y un substrato cromogénico (e.g. X-Gal). Asimismo, son idóneas para el proceso de clonación por las mutaciones end⁺ y rec⁻ que aportan estabilidad al ADN (*Thermofisher*).

3.1.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana* se ha empleado la cepa *GV3101* de *Agrobacterium tumefaciens*, se trata de un mutante espontáneo de la cepa C58C1 pero que además presenta resistencia a rifampicina (Deeba *et al.*, 2014).

3.2. Material vegetal

Los activadores construidos se han probado sobre *Nicotiana benthamiana*, una planta modelo que se transforma genéticamente y se regenera con facilidad, y es una especie muy apta para la expresión transitoria de proteínas a través del método de agroinfiltración (Goodin *et al.*, 2008). Además de trabajar con plantas silvestres (*wild type*) se han empleado plantas transgénicas (T2) que tienen integrada una construcción reportera basada en el gen de la luciferasa de luciérnaga bajo el promotor SIDFR, el gen de la luciferasa de *Renilla reniformis* bajo el promotor constitutivo 35s del virus del mosaico de la coliflor (como control interno) y finalmente el gen de la neomicina fosfotransferasa (nptII) bajo el promotor de la nopalina sintasa, que confiere resistencia a kanamicina, como marcador de selección (Figura 5.)

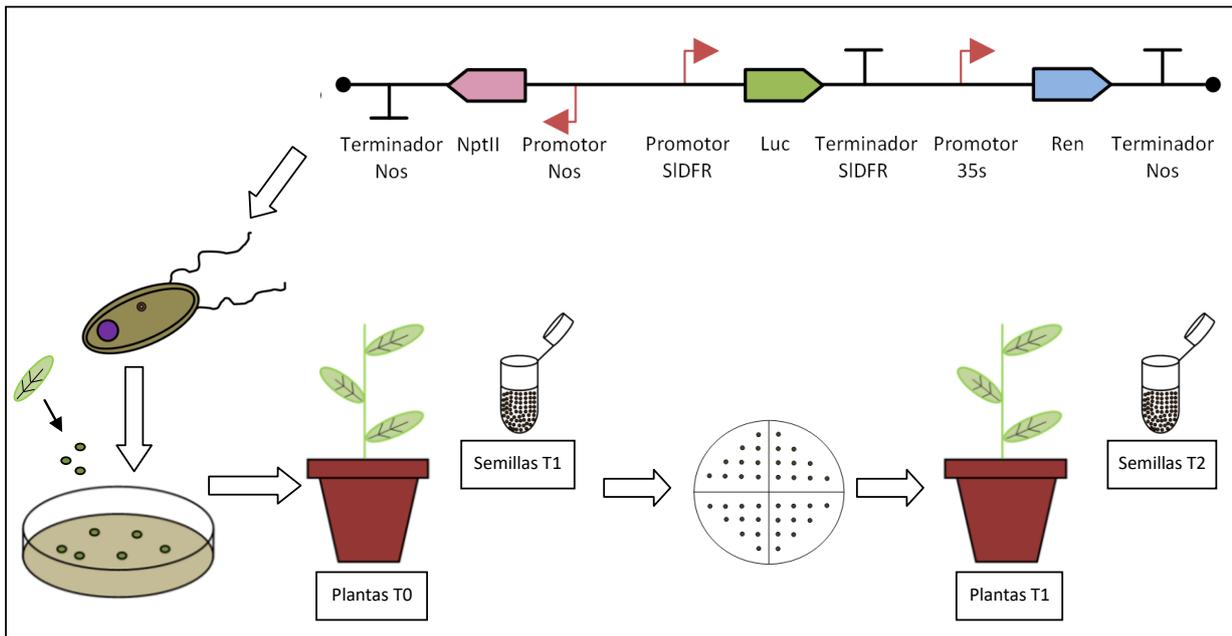


Figura 5. Material vegetal, generación T2. Las plantas reporteras T0 son el resultado de la transformación de explantes de *Nicotiana benthamiana* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y posterior regeneración en un medio de selección (con kanamicina). Fueron traspasadas a tierra y dieron semillas (T1), que se sembraron en una placa con kanamicina. Se seleccionaron 10 plantas y se trasplantaron (T1). Finalmente, se pudieron recoger semillas (T2) de dichas plantas y ese fue el punto de partida del trabajo.

3.3 Diseño de los dominios activadores

3.3.1 Obtención de las secuencias de los dominios

Las secuencias empleadas se obtuvieron de distintas fuentes. Ciertas piezas se pidieron a *Addgene*, pero también se recurrió a la síntesis *de novo* de fragmentos de ADN vía solicitud de *gBlocks*® (*Integrated DNA Technologies*), sobre todo en aquellos casos en los que la secuencia no estaba disponible en *Addgene*, o cuando se deseaba introducir alguna modificación, con el fin de obtener alguna mejora.

3.3.2. Domesticación

Se denomina domesticación a la adaptación de la secuencia obtenida al sistema *GoldenBraid*. Dicho sistema permite la generación de unidades transcripcionales a través del ensamblaje de distintos fragmentos de ADN (e.g. promotor, secuencia codificante, terminador) en un único paso (**Figura 6.**); utilizando una única enzima de restricción, facilitando y acelerando así el proceso (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2011). Pero, para ello, se debe convertir la secuencia de ADN original en una pieza que sea admitida por dicho método de ensamblaje multipartito. Esto se consigue eliminando las dianas internas del enzima de restricción Bsal y BsmBI de la secuencia, e introduciendo la misma en un plásmido domesticador **pUPD2** (**Figura 7.**), que contiene dos sitios de reconocimiento del enzima Bsal flanqueando el lugar de inserción (Vazquez-Vilar *et al.*, 2017).

Por lo tanto, la domesticación consiste en la incorporación de los oligonucleótidos necesarios (las dianas del enzima BsmBI) a ambos lados de la secuencia que inicialmente permitan su clonación en el vector **pUPD2**, y la incorporación de los característicos cuatro nucleótidos que se convertirán en los extremos cohesivos de las piezas liberadas, tras la digestión del plásmido con Bsal. Estos extremos cohesivos por un lado definen la identidad de la pieza, y a su vez, determinan su posición en el constructo final resultado del ensamblaje. De alguna manera, la domesticación etiqueta o cataloga el fragmento de ADN y regula que el orden de ensamblaje adoptado sea correcto para una apropiada expresión. Por ejemplo, todo promotor *GoldenBraid* contiene dos extremos de nomenclatura única, que le permiten por un lado unirse al plásmido y por otro a una secuencia codificante, pero, en ningún caso podría ligarse a un terminador, el promotor siempre se encontrará en primera posición.

Este proceso se ha efectuado a través de un correcto diseño de oligonucleótidos (<https://gbcloning.upv.es/tools/domestication/>) y posterior amplificación por PCR, o vía síntesis de *nov*.

Los dominios de activación utilizados en este trabajo están recogidos en la **Tabla 1**. Se domesticaron en piezas de nomenclatura B5 según la Sintaxis Estándar de Biología Sintética de Plantas (Patron *et al.*, 2015) por lo que estaban preparados para fusiones en C-terminal. Es decir, se diseñaron para que se pudieran unir a dCas9, a MS2 (proteína de cubierta viral empleada en la estrategia dCas9-SAM), o a los anticuerpos de cadena simple propios de la estrategia dCas9-SunTag. El modo de acción de todos los dominios empleados y recogidos en la **Tabla 1.**, reside en el reclutamiento de factores de transcripción, menos el del dominio p300, cuyo mecanismo es la acetilación de la lisina 27 de la histona 3.

Tabla 1. Dominios de activación.

Dominios activación	Origen	Referencia
EDLL* (previamente domesticado)	Vegetal	(Tiwari <i>et al.</i> , 2012)
ERF2	Vegetal	(Li <i>et al.</i> , 2013)
VPR	Sintético: Combinación de tres dominios VP64-p65-Rta	(Chavez <i>et al.</i> , 2015)
Tv	Sintético: TAL (6 repeticiones)-VP64 (4)	(Li <i>et al.</i> , 2017)
p300	Humano	(Thakore <i>et al.</i> , 2016) (Ogryzko <i>et al.</i> , 1996)

3.3.3. Ensamblaje GoldenBraid

Los activadores programables se construyeron a partir de las distintas piezas (promotores/secuencias codificantes/fusiones C-terminal/terminadores) mediante el método de ensamblaje multipartito *GoldenBraid*. Es decir, en una única reacción de digestión-ligación, se liberaron las piezas de los distintos plásmidos pUPD2 (con BsaI) y se ensamblaron en el orden correcto (con la ligasa T4) clonándose finalmente en el vector de destino (e.g. [pDGB3alpha2](#)) tal y como queda representado en la **Figura 6**. (Vazquez-Vilar *et al.*, 2017).

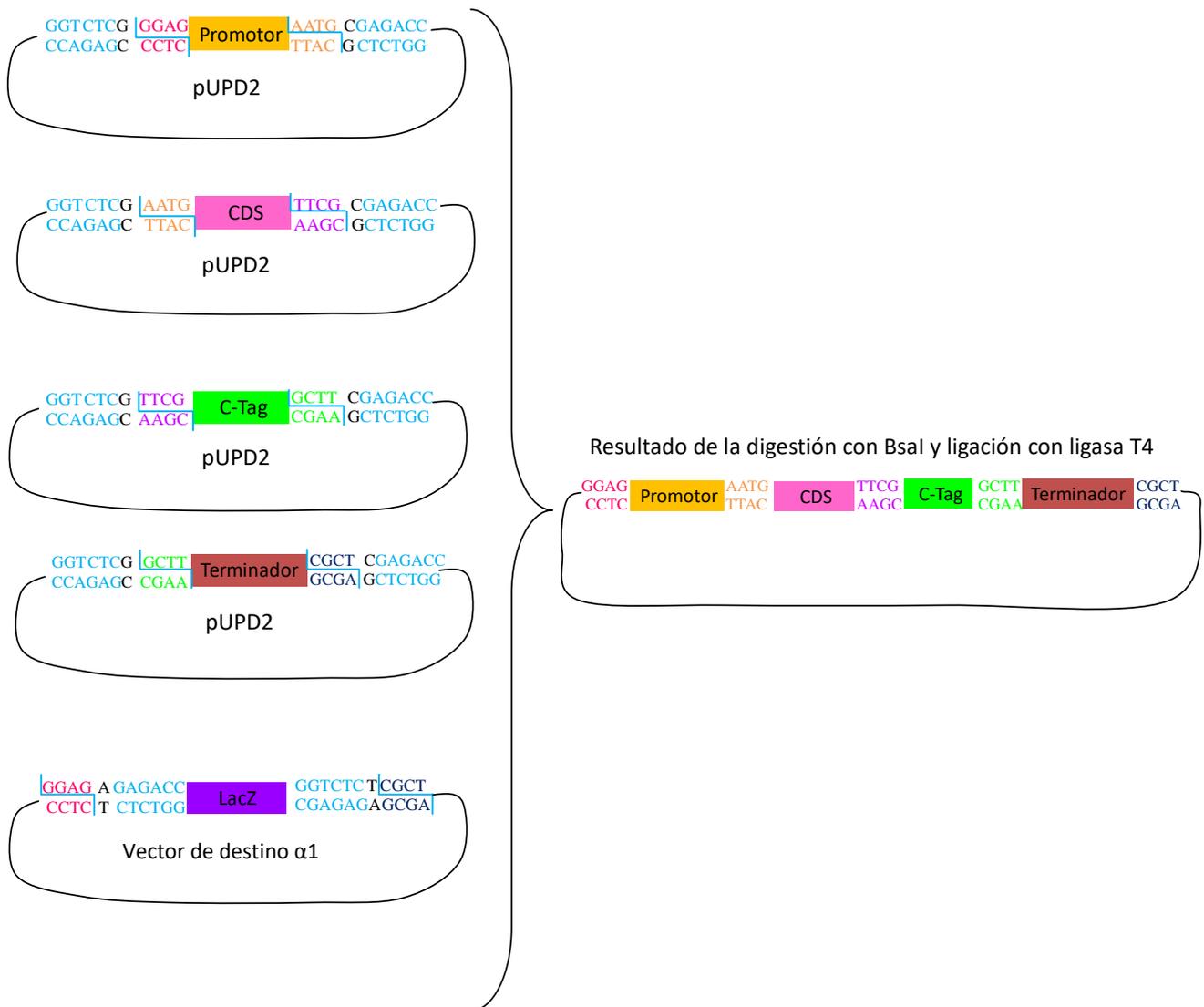
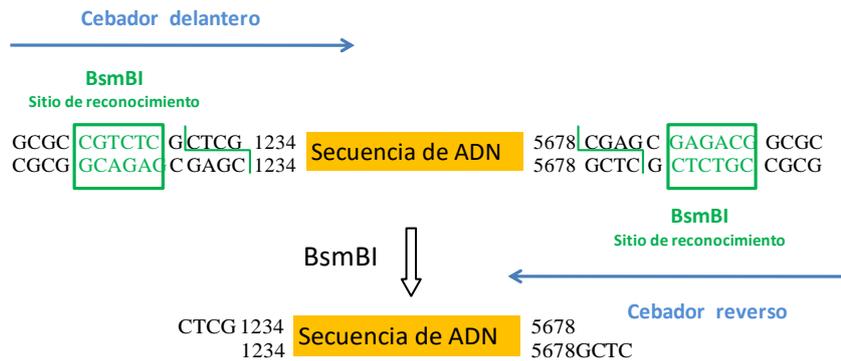
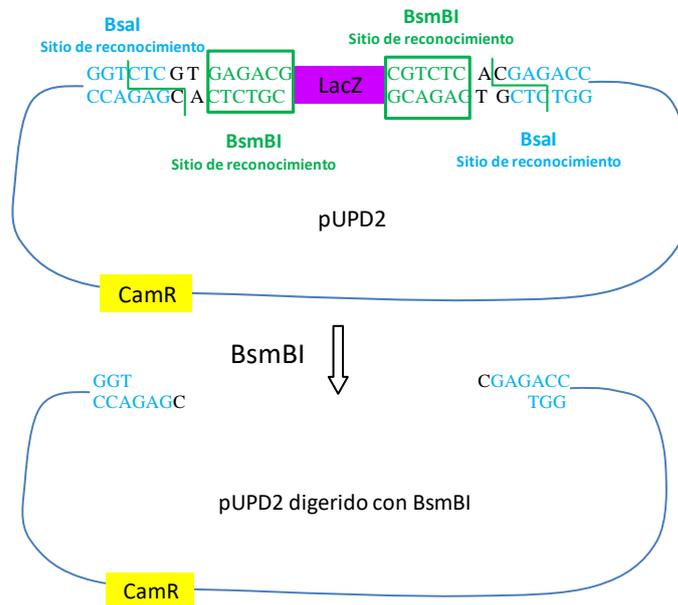


Figura 6. Ensamblaje multipartito (reacción *GoldenBraid*). Construcción de unidades transcripcionales en un único paso, vía múltiple digestión (con BsaI) y ligación (con T4) de las piezas domesticadas. La secuencia codificante en este caso puede ser dCas9, MS2 o ScFv. Por otro lado, el péptido fusión C-terminal sería el dominio de activación domesticado. Finalmente, la secuencia de reconocimiento y los sitios de corte del enzima BsaI están representados en color azul.

1) Amplificación de la secuencia y digestión con BsmBI



2) Digestión del plásmido pUPD2 vacío con BsmBI



3) Resultado de la ligación

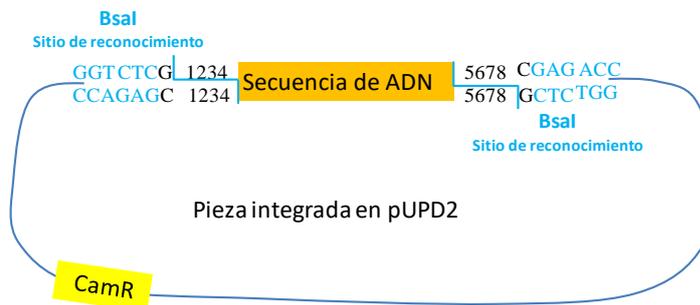


Figura 7. Proceso de domesticación vía amplificación por PCR. Consiste en incorporar los oligonucleótidos necesarios para que la secuencia se inserte en un plásmido pUPD2 (dianas del enzima BsmBI) y los 4 nucleótidos (1234 o 5678) que definen la pieza y determinaran la posición de la misma en la construcción final, figura adaptada de Sarrion-Perdigones *et al.*, 2011.

3.4. Transformación de *E. coli*

Tanto las piezas domesticadas como las construcciones finales se transformaron en *E. coli* electrocompetentes vía electroporación, aplicando a las células una corriente de 1500V de 5mS. Posteriormente, se pre-cultivaron las células en medio LB a 37°C durante 45 minutos y después se sembraron en placas de LB, que contenían X-Gal, IPTG, y el antibiótico de selección correspondiente; cloroanfenicol en caso de plásmidos [pUPD2](#), y kanamicina en caso de [pDGB3 alpha2](#), por ejemplo. Las colonias transformadas con las construcciones de interés fueron seleccionadas por el color blanco de las mismas.

3.5. Transformación de *A. tumefaciens*

Generadas las construcciones deseadas, se transformó *A. tumefaciens*, ya que posteriormente dichas construcciones se introducirían en *Nicotiana benthamiana* por agroinfiltración, basándose en el sistema infectivo de *Agrobacterium tumefaciens*. La transformación también se llevó a cabo por electroporación pero a un voltaje menor, a 1440V, y el pre-cultivo de las células post-transformadas se realizó a 28 °C. Finalmente, las células se sembraron en placas de LB, que además de contener el antibiótico de selección contenían rifampicina, frente a la cual la cepa GV3101 de *Agrobacterium* manifiesta resistencia.

3.6. Extracción de plásmidos o Miniprep

Las extracciones plasmídicas se realizaron mediante *kits* comerciales siguiendo los protocolos recomendados por los proveedores. En el caso de *Escherichia coli*, se utilizó el kit *E.Z.N.A.® Plasmid Minikit II (Omega Bio-Tek)* y en *Agrobacterium tumefaciens* *QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)*.

3.7. Electroforesis en gel de agarosa

Con el fin de verificar que las construcciones se habían efectuado correctamente, se llevó a cabo una comprobación por digestión y electroforesis en gel de agarosa. Por cada digestión se empleó alrededor de 200ng de ADN, 1x de tampón de reacción y 0,5µL de enzima de restricción. Asimismo, se usó el programa *Benchling* para simular *in silico* los patrones de bandas resultado de las digestiones. Por otro lado, los geles se prepararon con TAE 1x (40mM de Tris-acetato y 1mM de EDTA), 1% (v/v) de bromuro de etidio y 1,2% de agarosa. Como tampón de carga se utilizó *Orange Loading Dye (Thermo Scientific)* y los marcadores empleados fueron *Gene Ruler DNA Ladder 1kb y 100bp (Thermo Scientific)*. Finalmente, los geles se visualizaron con un transiluminador y se capturaron las imágenes con el software *GeneSnap*.

3.8. Secuenciación

Para confirmar que los dominios activadores se habían domesticado correctamente, se secuenciaron los plásmidos pUPD2, y para ello se emplearon 10µL del plásmido extraído y 5µL de los cebadores *Forward (5'-GCTTTCGCTAAGGATGATTCTGG-3')* y *Reverse (5'-CAGGGTGGTGACACCTTGCC-3')*. La secuenciación se llevó a cabo por el servicio de Secuenciación y Análisis de expresión génica del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. La secuenciaciones se realizaron por el método *Sanger* mediante el Secuenciador capilar ABI 3130 XL.

3.9. Diseño de los ARN guías

3.9.1 Diseño de los ARN guías individuales

Los ARN guías diseñados están compuestos por 3 piezas; un promotor, la diana de 20 nucleótidos que hibridará con el ADN y el *scaffold*, o estructura terminal que aporta estabilidad al complejo Cas9/ARNg, y al que se le han incorporado dos aptámeros que reconoce MS2 en la estrategia dCas9-SAM. Como las dianas son piezas muy variables no se introducen en plásmidos pUPD2, sino que están diseñadas como oligonucleótidos que hibridan parcialmente dejando extremos cohesivos que permitan su ligación al promotor y al *scaffold*. El diseño o elección de las dianas está condicionado por la presencia/ausencia de secuencias PAM (*Protospacer Adjacent Motif*). Para que el complejo dCas9/ARNg se pueda unir a una secuencia de ADN de 20 nucleótidos, además de la complementariedad, en el extremo 3' de la misma debe contener una secuencia PAM de tres nucleótidos, NGG, siendo N cualquier nucleótido (Jiang *et al.*, 2013).

En la construcción de los guías se utilizó el promotor U6-26 de *Arabidopsis thaliana*, puesto que se trata de un promotor que es reconocido por la polimerasa III, y la polimerización mediada por este tipo de polimerasa evita las modificaciones post-transcripcionales, como la adición de la caperuza 5'. Esto supone una ventaja, ya que cabría esperar que la complementariedad entre el guía y la secuencia de ADN fuera superior y por tanto la hibridación más eficiente. A su vez, se lograría mantener el ARN dentro del núcleo, que es precisamente donde realizará su función. Pero, también supone una gran limitación, ya que dicho promotor requiere una guanina para el inicio de la transcripción (Gao y Zhao, 2014).

Debido al requerimiento del promotor, se suelen escoger *dianas* que contengan una guanina inicial. Así se diseñaron los guías DFR 1, 4, 5 ([GB1838](#), [GB1837](#), [GB1839](#)) (**Figura 8.**). No obstante, en ciertos casos puede interesar el dirigir dCas9 a una diana concreta que carezca del nucleótido en cuestión. Con el fin de vencer la limitación, se podría haber introducido una guanina en el guía con un diseño apropiado de cebadores. De este modo, la transcripción sucedería correctamente, pero la guanina incorporada no hibridaría con el ADN y por lo tanto disminuiría mucho la eficiencia. Pero, para eludir estos problemas asociados, en su lugar se aprovechó el sistema *multiplexing*. Este sistema permite la transcripción de varios guías en tándem (en este caso se ha diseñado para tres) bajo una única guanina inicial. Pero, como queda representado en la **Figura 9.**, una vez transcrito, debido a un procesamiento o auto-escisión de los ARN transferentes que flanquean o separan los guías, se obtienen los guías individuales *desnudos o limpios* de la guanina inicial (Xie *et al.*, 2015).



Figura 8. Dianas de los guías 1ARNg, 4ARNg y 5ARNg. El promotor SIDFR tiene 1553 pares de bases. Teniendo como referencia el inicio de transcripción el guía 1ARNg ([GB1838](#)) se une en la posición -223, el 4ARNg ([GB1837](#)) en la -373 y el guía 5ARNg ([GB1839](#)) en la -489.

3.9.2. Diseño del sistema *multiplexing*

Las dianas de los guías se diseñaron como oligonucleótidos solapantes, que hibridan parcialmente dejando extremos cohesivos que posibilitan tanto su ligación al ARNt auto-catalítico que lo precede, como al *scaffold* (estructura terminal del ARNg) posterior. Pero, en vez de introducir cada uno de esos tres componentes del ARN guía (diana, ARNt y el *scaffold*) en vectores pUPD2 individuales y llevar a cabo un ensamblaje multipartito, se insertó en pUPD2 la construcción ARNt:target:scaffold directamente. Para lograrlo, se utilizaron tres plásmidos pVD1 ([GB2073](#), [GB2074](#), [GB2075](#)), portadores del ARNt y del *scaffold*. Tienen la particularidad de que contienen dichas secuencias delimitadas por sitios de corte del enzima de restricción BsmBI. De tal manera que al ser digeridos con el enzima mencionado se crean múltiples extremos cohesivos que permiten la generación de la construcción *pre-ARNt: target: scaffold* y la simultánea clonación de la misma en un vector pUPD2, tal y como queda representado en la **Figura 10**. Una vez integrados en pUPD2, la construcción queda flanqueada por sitios de reconocimiento del enzima BsaI, y los extremos cohesivos que se generaran como resultado del corte serán diferentes dependiendo del vector pVD1 que se haya empleado, y determinan el orden o posición de los ARNt-ARN guías durante el ensamblaje (Vazquez-Vilar *et al.*, 2016).

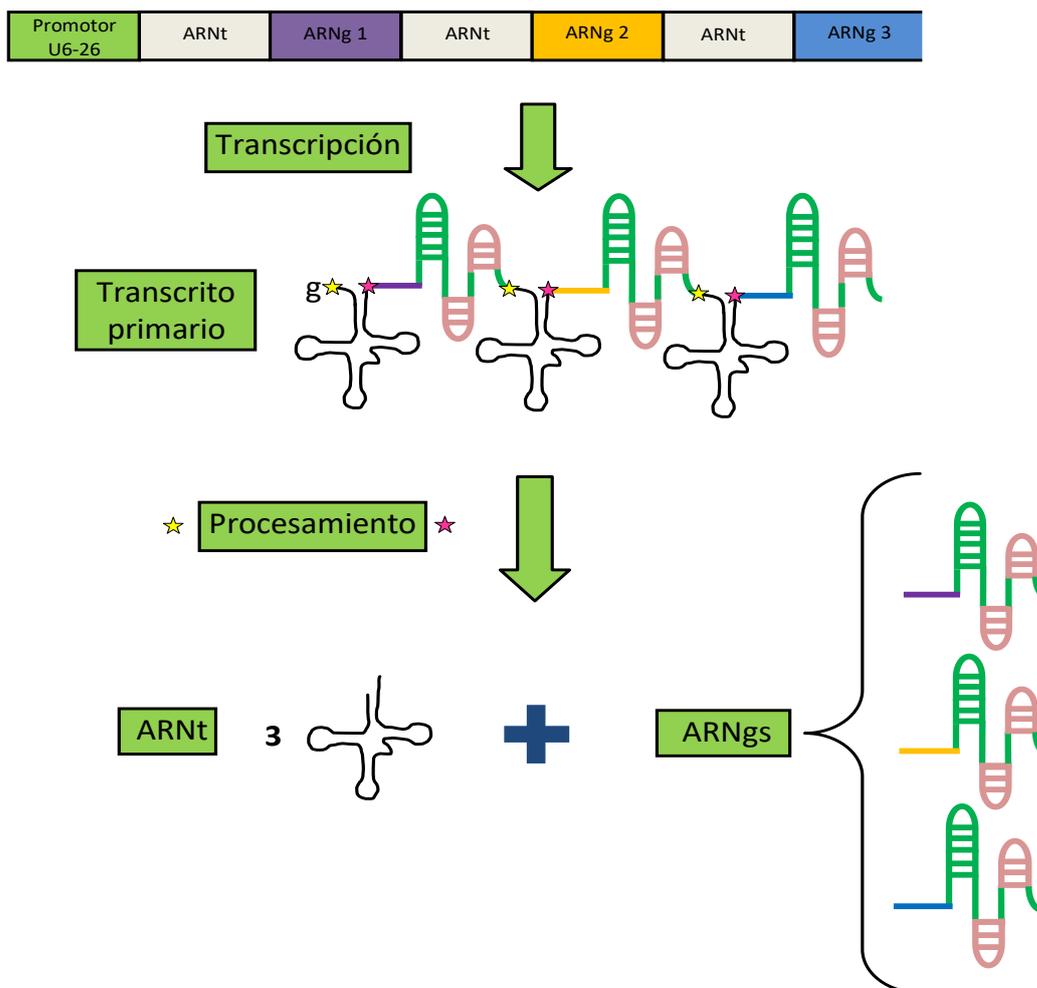


Figura 9. Funcionamiento del sistema *multiplexing*. Con una única guanina inicial se transcriben tres ARN guías en tándem, y se separan por el auto-procesamiento de los ARN transferentes que los preceden.

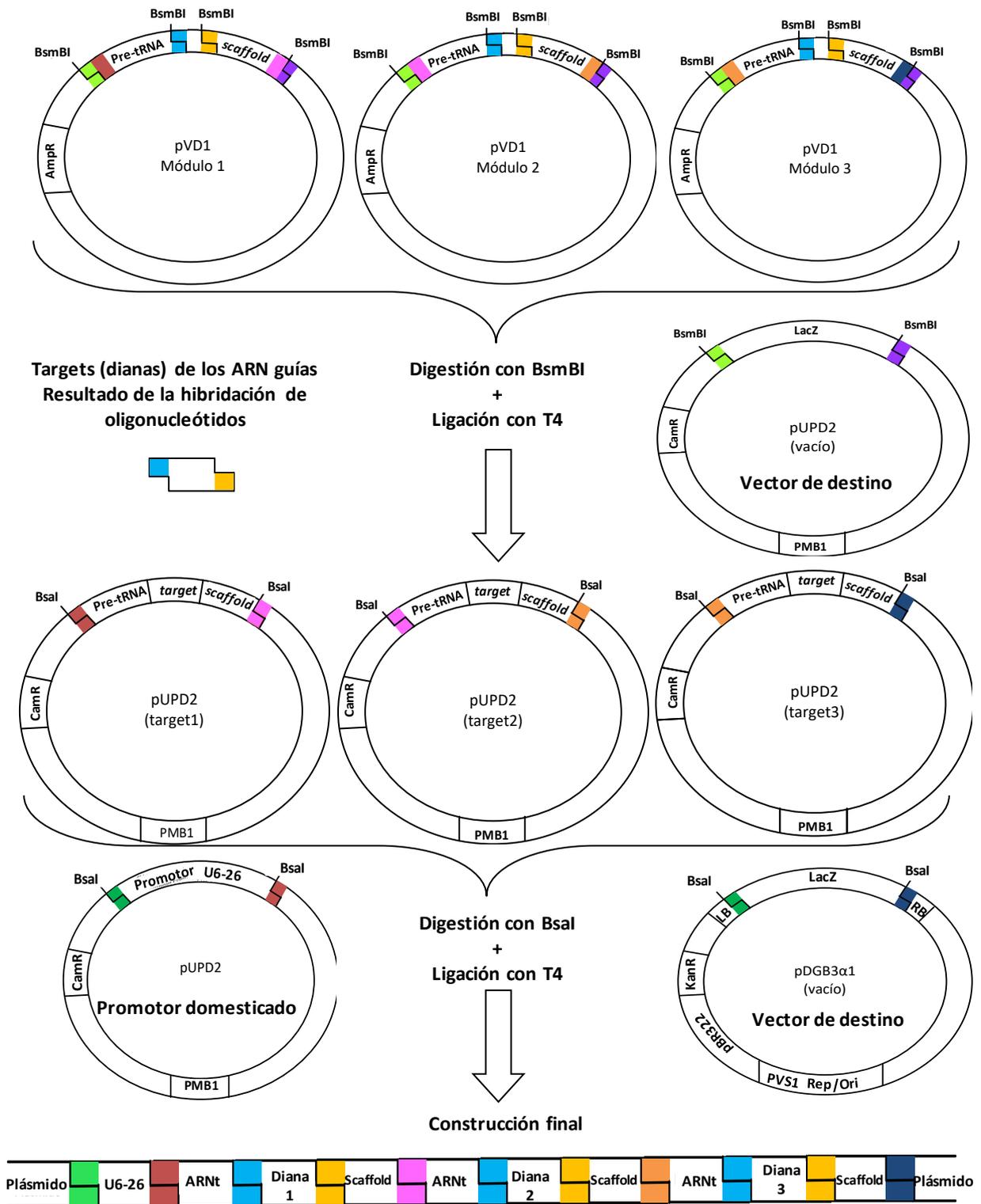


Figura 10. Construcción del multiplexing. El multiplexing consiste en la transcripción policistónica de varios ARN guías separados por ARNt auto-catalíticos que permitirán su posterior individualización. En un único paso se pueden integrar las construcciones ARNt:target:scaffold en un plásmido pUPD2, para poder posteriormente realizar un ensamblaje multipartito GoldenBraid. Para ello, por un lado se digieren con BsmBI los plásmidos pVD1 que contienen las secuencias de los ARNt y los *scaffolds* con los aptámeros y por otro lado, las dianas se diseñan como oligonucleótidos solapantes que dejan extremos cohesivos que permiten su ligación a ambas secuencias.

3.10. Agroinfiltración

3.10.1. Condiciones de cultivo del material vegetal

Se infiltraron hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana* de 5-6 semanas de edad, cultivadas en condiciones de crecimiento controladas en un Fitotrón; a una temperatura de 24/20 °C y un fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad. A diferencia de las plantas silvestres, las semillas transgénicas reporteras se germinaron en placas que contenían medio *Murashige & Skoog* con kanamicina. Al no disponer de líneas homocigotas para el transgén, y al existir segregación, se debía efectuar una selección de las plantas que manifestaban resistencia a dicho antibiótico.

3.10.2. Preparación de las soluciones de *Agrobacterium tumefaciens*

Para la preparación de las soluciones de *A. tumefaciens* se partió de cultivos en fase exponencial, y se resuspendieron las bacterias en un medio MES (pH=5,6, 10 mM MES, 20 mM MgCl₂ y 200 μM acetosiringona) apropiado tanto para *Agrobacterium* como para las plantas. Tras una incubación de 2h, se realizaron las mezclas apropiadas de los distintos cultivos a co-infiltrar, ajustando la densidad óptica (600nm) final a 0,1, ya que previamente se había determinado que era la óptima (Vazquez-Vilar et al., 2017).

Las infiltraciones se llevaron a cabo mediante una jeringa exenta de aguja (BD *Plastipak 1mL de Becton Dickinson S.A.*). Se infiltraron tres hojas por planta y una planta por construcción, y las muestras se recogieron a 5 días post-infiltración, habiéndose estipulado con anterioridad como momento de expresión óptimo. Para ello, con un sacabocados se tomaron discos (de 0,8cm de diámetro y aproximadamente de 18-19 mg) de 3 hojas independientes (un disco por hoja). Las muestras inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta el día del ensayo de luciferasa.

Los mecanismos defensivos de las plantas pueden inducir el silenciamiento de los transgenes y es por ello que toda construcción fue co-infiltrada junto con un supresor del silenciamiento de origen viral, bien fuera en *cis* o en *trans*. En nuestro caso se empleó la proteína P19 (Voinnet et al., 2003).

3.11. Ensayo de luciferasa

El ensayo de luciferasa se llevó a cabo con el kit Dual-Glo® Luciferase Assay System (*Promega*). Para realizar la extracción proteica se utilizaron 375μL de *passive lysis buffer* por muestra discal, y para la reacción de la luciferasa, se añadieron en una placa multipocillo 7,5μL del extracto recogido tras centrifugación (15min, a 4º, a velocidad máxima) y 30μL del sustrato de la luciferasa de luciérnaga, *lucII*. Posteriormente, se realizó la primera lectura de luminiscencia. Tras la misma, se adicionaron 30μL del reactivo *stop and glow*, que inhibe la actividad de luciferasa de luciérnaga y que contiene el sustrato para la luciferasa de *Renilla reniformis* (control interno) y finalmente se efectuó la segunda lectura. Ambas reacciones quedan representadas en la **Figura 11**. La medición de la luz emitida resultado de la activación se llevó a cabo con el equipo *GloMax 96 Microplate Luminometer*.

Se utilizó el gen reportero de la luciferasa de *Renilla* bajo el promotor 35s como control interno; para la normalización de los valores obtenidos en los ensayos, evitando así la variación causada por la eficiencia de transformación y manipulación durante el experimento al expresar el reportero de forma transitoria (Shifera y Hardin, 2010). Asimismo, en las líneas reporteras estables resultó vital

para evitar el efecto ocasionado por la carga alélica diferencial. Esa es la razón por la cual los resultados se presentan como Fluc/Rluc, que se refiere al ratio entre la cantidad de luminiscencia emitida por la luciferasa de luciérnaga y la de la luciferasa de *Renilla reniformis*.

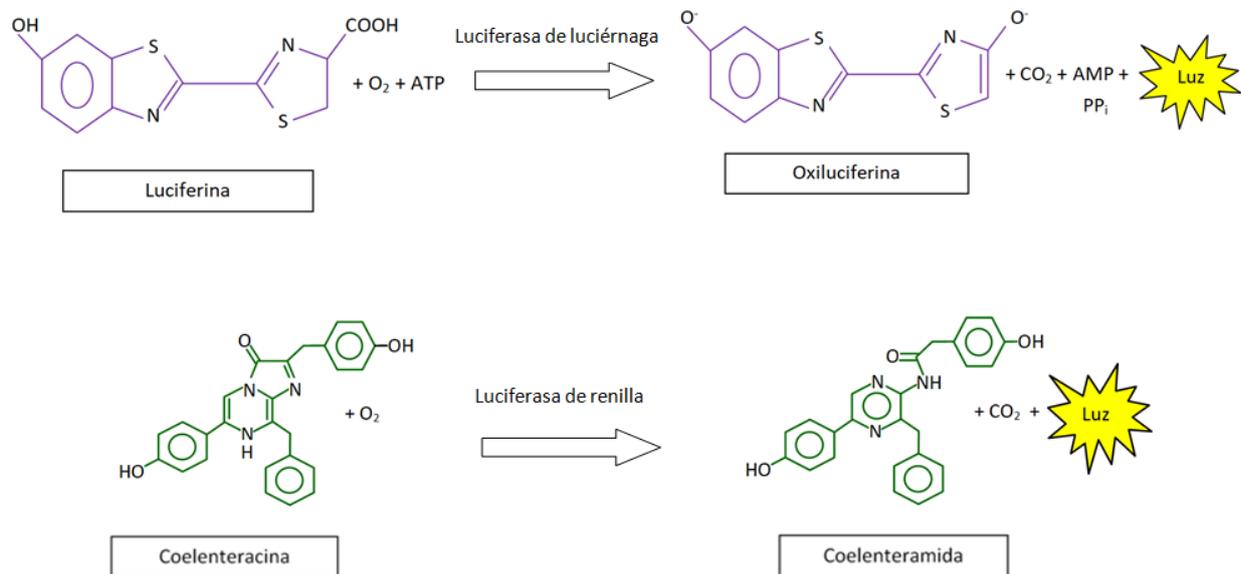


Figura 11. Reacciones de las luciferasa de luciérnaga y de *Renilla reniformis*.

Controles del ensayo de luciferasa

Con el fin de garantizar que los ensayos se efectuaron correctamente, se agroinfiltraron los reporteros p35s ([GB0491](#)), pNos ([GB0166](#)) y pLess ([GB1554](#)) en plantas silvestres. La razón de ello, es que están muy bien caracterizados en las condiciones en las que tiene lugar el experimento, y se conoce que la expresión con el promotor 35s suele ser de 9 a 13 veces mayor que la obtenida con el promotor Nos (Vazquez-Vilar *et al.*, 2016). En cambio, con el promotor less, que se trata de un intrón en vez de un promotor real, es 10 veces menor que con pNos. Por consiguiente, se utilizaron como controles en todos los experimentos.

A su vez, el reportero pNos se empleó como un posible referente interno, frente al cual se podrían normalizar los valores obtenidos (ratios Fluc/Rluc), para poder comparar los resultados de experimentos de distintos promotores, obteniendo así actividades transcripcionales relativas.

4. Resultados

4.1. Caracterización del material vegetal

En lo que se refiere a la caracterización del material vegetal, el criterio establecido para la determinación de plantas resistentes fue la aparición de hojas verdaderas y raíces extendidas, ya que en el control negativo (plantas silvestres en medio MS con kanamicina) no se llegaban a ver más que los cotiledones. Además, pasado un tiempo padecían clorosis, apreciándose un color ligeramente amarillo. Analizando los datos obtenidos y recogidos en la **Tabla 2**, se concluyó que las líneas T1 estaban compuestas de plantas hemicigóicas (portadoras del transgén y un alelo nulo), ya que las T2

se trataban de generaciones segregantes, en las cuales el 75% eran resistentes y el 25% sensibles, lo cual se comprobó por el estadístico chi cuadrado (χ^2). Esto, no era de gran trascendencia, ya que la carga alélica no supuso ningún problema en los ensayos de la luciferasa al disponer del control interno del reportero. Lo único, al existir la posibilidad de encontrar plantas acigóticas (carentes del transgén) a partir de las semillas proporcionadas, se tuvo que aplicar una selección en placa de las plantas a infiltrar, no era factible la germinación directa en tierra.

Tabla 2. Determinación genotípica del material vegetal por segregación fenotípica. Se ha efectuado la prueba estadística χ^2 comprobando que el porcentaje de plantas sensibles en todas las líneas se ajusta al 25% y las resistentes al 75% con una significación del 95%, lo cual demuestra que la generación T2 está constituida por plantas ácigóticas, hemicigóticas y homocigóticas.

Semillas T2	Porcentaje de plantas sensibles (S)	Porcentaje de plantas resistentes (R)	Prueba χ^2	Estequiometría propuesta
L1-2	17,6	82,4	3,16	1S:3R
L1-3	27,5	72,5	0,28	
L1-4	32,0	68,0	2,44	
L1-5	18,4	81,6	2,50	
L1-6	9,2	90,8	13,70	
L1-7	13,2	86,8	7,81	
L1-10	30,3	69,7	1,35	
L5-1	25,3	74,7	0,01	
L5-2	7,1	92,9	17,50	
L5-3	26,3	73,7	0,07	
L5-4	27,3	72,7	0,23	
L5-5	13,9	86,1	6,89	
L5-6	20,5	79,5	1,21	
L5-7	23,4	76,6	0,20	
L5-8	32,3	67,7	2,67	
L5-9	18,6	81,4	2,39	
L5-10	31,6	68,4	2,15	

4.2. Estudio de activación de SIDFR

Los activadores desarrollados y empleados en la activación del promotor SIDFR quedan recogidos en la **Tabla 3**. Para su construcción, primero las secuencias de los nuevos dominios de activación fueron domesticadas, introduciendo las mismas en plásmidos pUPD2, y posteriormente a través del sistema *GoldenBraid* se procedió al ensamblaje de las distintas piezas y clonación simultánea en plásmidos de destino [pDGB3alpha2](#). Como ejemplo, véanse las **Figuras 12 y 13** correspondientes al dominio Tv.

Tabla 3. Construcciones activadoras empleadas

dCas9	Código GB	Estrategia SAM	Código GB
$\alpha 2$:p35s:dCas9:EDLL:tnos	GB1190	$\alpha 2$:p35s:MS2:VPR:tnos	GB1830
$\alpha 2$:p35s:dCas9:ERF2:tnos	GB1824	$\alpha 2$:p35s:MS2:p300:tnos	GB1795
$\alpha 2$:p35s:dCas9:VPR:tnos	GB1826	$\alpha 2$:p35s:MS2:TV:tnos	GB2048
$\alpha 2$:p35s:dCas9:p300:tnos	GB1794	Estrategia SunTag	Código GB
$\alpha 2$:p35s:dCas9:tv:tnos	GB2047	$\alpha 2$:ScFv:EDLL:tnos	GB1836
		$\alpha 2$:ScFv:VPR:tnos	GB1867

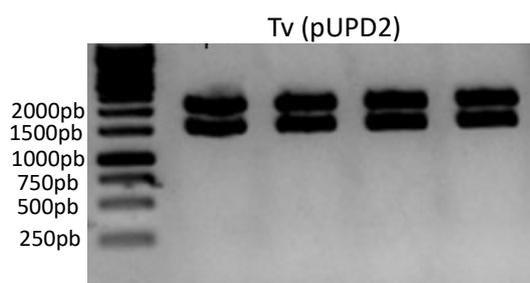


Figura 12. Domesticación del dominio Tv. Comprobación por electroforesis en gel de agarosa 1,2%. Al cortar el plásmido pUPD2 con el enzima de restricción Bsal se libera un fragmento de 1405 pb y el vector digerido de 2105pb. El marcador empleado es *1kb DNA Ladder (Thermo Scientific)*.

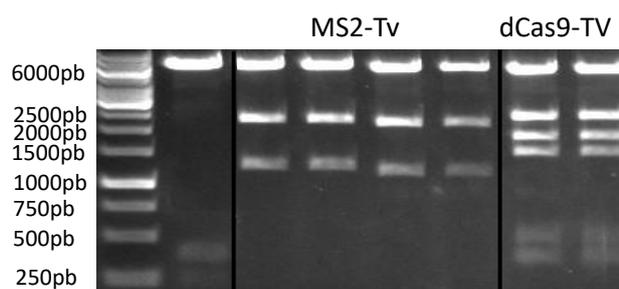


Figura 13. Construcciones activadoras. Comprobación por electroforesis en de agarosa 1,2% A) $\alpha 2$:35s:MS2-TV:tnos que al digerir con HindIII se liberan tres fragmentos (6345, 2180 y 1173 pb) y B) $\alpha 2$:35s:dCas9:TV:tnos que al ser digerido se liberan 8 fragmentos: de 6345, 2448, 1833, 1490, 509, 387, 366 y 73 pares de bases. El marcador utilizado es *1kb DNA Ladder (Thermo Scientific)*.

En primera instancia, se decidió probar la construcción dCas9:EDLL—MS2:VPR sobre el reportero expresado de forma transitoria, ya que dicha combinación de dominios activadores resultó ser la más prometedora según estudios desempeñados por el mismo grupo de investigación sobre el promotor Nos (aún sin publicar). En lo referente al ARN guía, se emplearon las dianas 1, 4 y 5 del promotor DFR, que se unen en las posiciones -223, -373 y -489 respectivamente (desde el inicio de transcripción), puesto que se disponía de ellas debido a experimentos previos. Simplemente se adaptaron los guías a la estrategia dCas9-SAM, empleando los *scaffolds* que tienen incorporados los aptámeros que reconoce MS2.

Tabla 4. Posición y código GB de los ARN guías individuales empleados

Guías Individuales	Posición	Código GB
$\alpha 1$:pU6-26:1gRNA:F6x2 MS2 scf	-223	GB1838
$\alpha 1$:pU6-26:4gRNA: F6x2 MS2 scf	-373	GB1837
$\alpha 1$:pU6-26:5gRNA: F6x2 MS2 scf	-489	GB2075

Como queda representado en la **Figura 14.**, con el ARNg 4 y 5 no se apreciaba apenas un aumento de expresión. Sin embargo, con el guía 1 se consiguió aumentar el nivel de expresión 40 veces sobre el control negativo, el promotor SIDFR no activado.

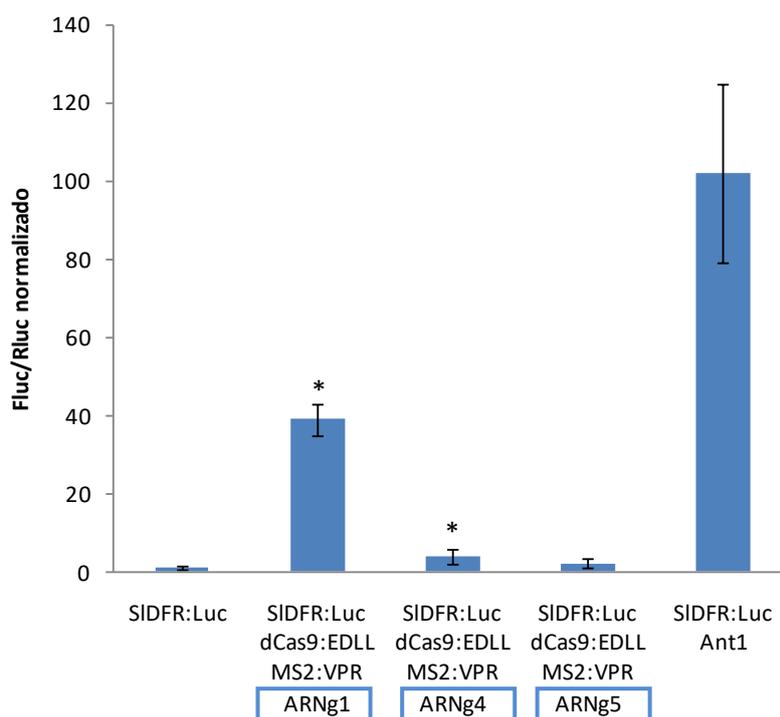


Figura 14. Estudio de activación del promotor SIDFR en transitoria con dCas9:EDLL—MS2 VPR vía los ARN guías 1, 4 y 5. Las posiciones de las dianas respecto al inicio de transcripción son las siguientes: -223(ARNg1), -373 (ARNg4) y -489 (ARNg5). Los resultados están presentados como ratios Fluc/Rluc normalizados frente al control negativo, la expresión basal del promotor DFR (sin activar). Ant1, el factor transcripcional capaz de activar SIDFR constituye el control positivo. El asterisco (*) indica que con un 95% de confianza existen diferencias significativas entre los niveles de expresión obtenidos con los activadores y la expresión del control negativo, SIDFR sin activar (Prueba T-Student $p < 0,5$).

Posteriormente, se realizó un ensayo empleando el ARN guía 1, el candidato que resultó más eficaz, tratando de confirmar los resultados obtenidos hasta el momento. A su vez, se incluyeron más construcciones activadoras en el experimento; *dCas9:VPR—MS2:VPR*; *dCas9:ERF2—MS2:VPR*; *dCas9:EDLL—MS2:P300* y *dCas9:P300—MS2:VPR*, en lo que respecta a la estrategia dCas9-SAM. Por otro lado, en lo que se refiere a la estrategia dCas9-SunTag, únicamente se probó una construcción; ScFv:VPR, porque en un estudio previo sobre el promotor Nos en el que se utilizaron más construcciones no se habían obtenido activaciones tan elevadas comparadas con las obtenidas con la estrategia dCas9-SAM, y se consideró que debía ser optimizado antes de testarlo sobre SIDFR. Se escogió VPR al ser el dominio que unido de forma indirecta a dCas9 resultaba en una activación considerable.

La eficacia de los distintos activadores se evaluó paralelamente sobre la línea L5-8 DFR (**Figura 15**) y sobre el reportero expresado transitoriamente (**Figura 16**). Y se observó que la activación en la expresión transitoria fue aproximadamente de un orden de magnitud mayor que en la estable.

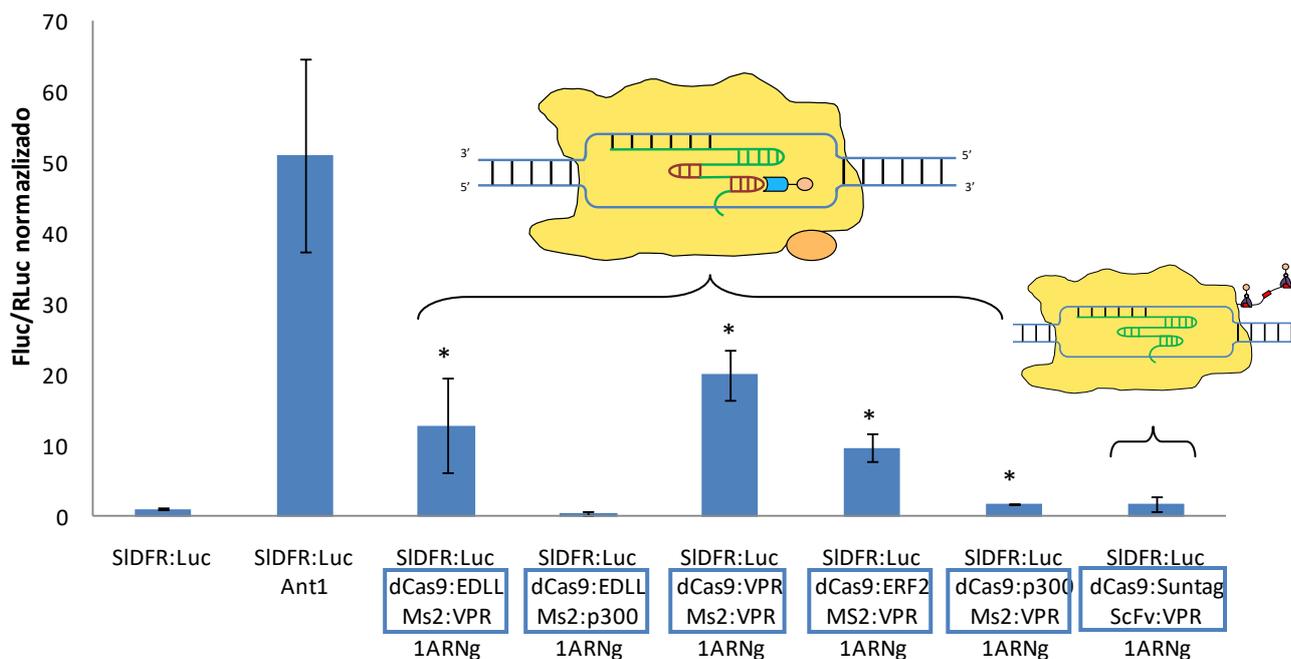


Figura 15. Estudio de activación del promotor SIDFR en estable sobre la línea L5-8 DFR vía el ARN guía 1. Los resultados están presentados como ratios Fluc/RLuc normalizados frente al control negativo, la expresión basal del promotor SIDFR (sin activar). Ant1, el factor transcripcional capaz de activar SIDFR constituye el control positivo. El asterisco (*) indica que con un 95% de confianza existen diferencias significativas entre los niveles de expresión obtenidos con los activadores y la expresión del control negativo, SIDFR sin activar (Prueba T-Student $p < 0,5$).

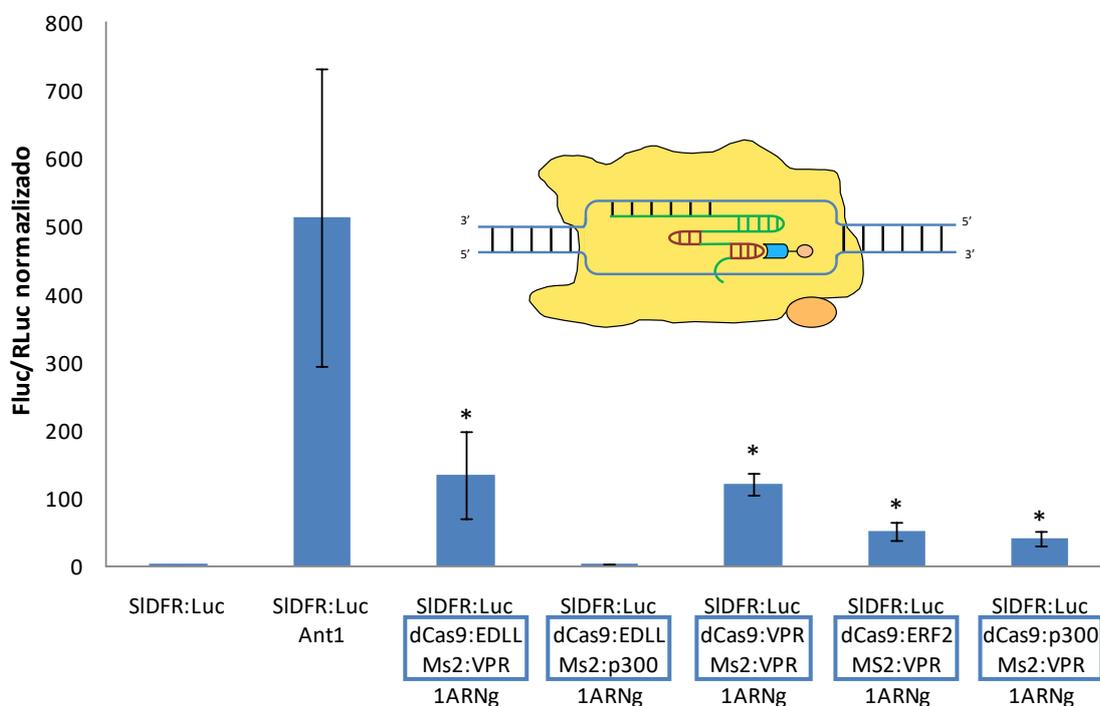


Figura 16. Estudio de activación del promotor SIDFR en transitoria vía el ARN guía 1. Los resultados están presentados como ratios Fluc/RLuc normalizados frente al control negativo, la expresión basal del promotor SIDFR (sin activar). Ant1, el factor transcripcional capaz de activar SIDFR constituye el control positivo. El asterisco (*) indica que con un 95% de confianza existen diferencias significativas entre los niveles de expresión obtenidos con los activadores y la expresión del control negativo, SIDFR sin activar (Prueba T-Student $p < 0,5$).

Se ha realizado una prueba *t-Student* que indica que el activador dCas9:VPR—MS2:VPR con un 95% de confianza no es significativamente diferente a dCas9:EDLL—MS2:VPR, con ellos se alcanza una activación de alrededor del 30-35% respecto a la activación obtenida con el factor de transcripción Ant1. Por otro lado el dominio p300 no resultó competente; la activación lograda en el caso de dCas9:p300—MS2:VPR probablemente se deba a la acción del dominio VPR. En lo referente a ScFv:VPR de la estrategia SunTag, no supuso una activación significativa.

Más adelante, se empleó una línea distinta, L1-5 DFR, con intención de verificar si se mantenía el efecto activador del dominio VPR unido a la proteína viral MS2 combinado con los dominios EDLL, VPR y ERF2 fusionados a dCas9 (**Figura 17**). Además, se incorporó un dominio nuevo al estudio, el dominio Tv, cuyo potencial había sido recientemente descubierto (Li *et al.*, 2017). Asimismo, debido al escaso éxito de dCas9-SunTag, se planteó la idea de aunar dicha estrategia con dCas9-SAM, desarrollando la innovadora dCas9-SAM-SunTag, esperando un efecto sinérgico o aditivo siquiera. Desde este enfoque se analizaron las combinaciones dCas9:SunTag—ScFv:VPR—MS2:VPR y dCas9:SunTag—ScFv EDLL—MS2:VPR, aquellas combinaciones de dominios que en la estrategia dCas9-SAM resultaron óptimas. Pero como se puede apreciar en la **Figura 18.**, el resultado no cumplió con las expectativas depositadas; obteniéndose mayores activaciones con la estrategia SAM que con la estrategia dCas9-SAM-SunTag.

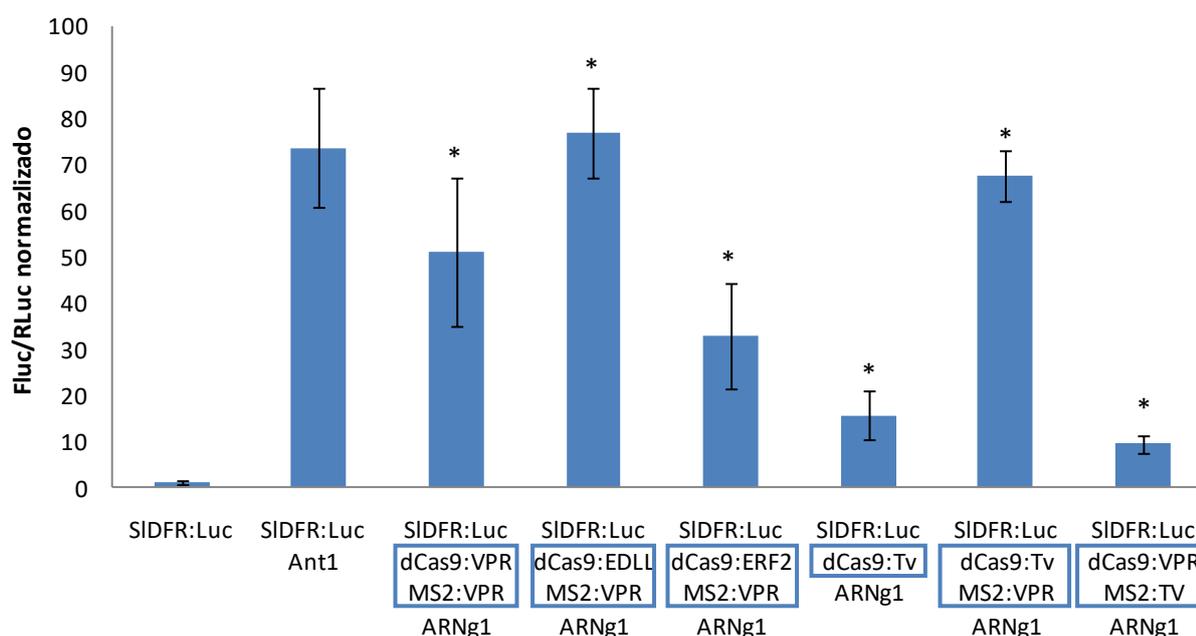


Figura 17. Estudio de activación de SIDFR vía el ARN guía 1 sobre la Línea L1-5 DFR. Los resultados están presentados como ratios Fluc/RLuc normalizados frente al control negativo, la expresión basal del promotor DFR (sin activar). Ant1, el factor transcripcional capaz de activar SIDFR constituye el control positivo. El asterisco (*) indica que con un 95% de confianza existen diferencias significativas entre los niveles de expresión obtenidos con los activadores y la expresión del control negativo, SIDFR sin activar (Prueba T-Student $p < 0,5$).

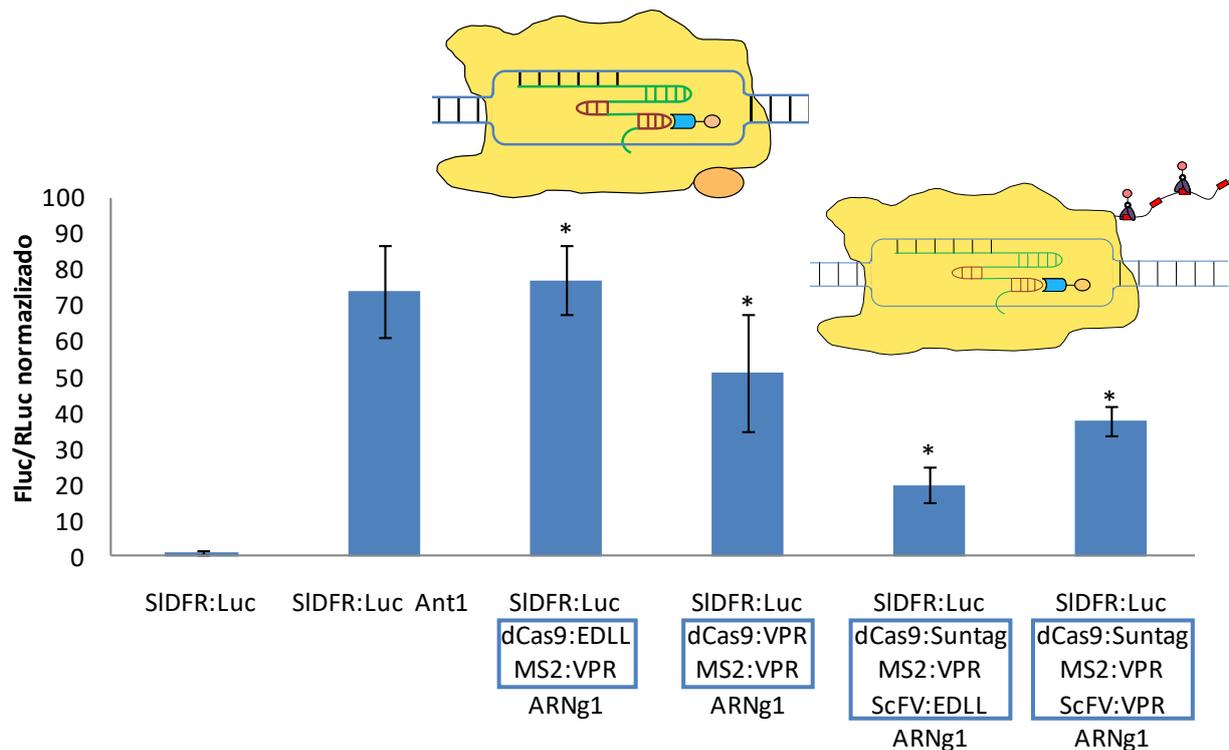


Figura 18. Estudio comparativo de la activación de SIDFR obtenida vía el ARN guía 1 sobre la Línea L1-5 DFR con la estrategia dCas9-SAM y dCas9-SAM-SunTag. Los resultados están presentados como ratios Fluc/RLuc normalizados frente al control negativo, la expresión basal del promotor DFR (sin activar). Ant1, el factor transcripcional capaz de activar SIDFR constituye el control positivo. El asterisco (*) indica que con un 95% de confianza existen diferencias significativas entre los niveles de expresión obtenidos con los activadores y la expresión del control negativo, SIDFR sin activar (Prueba T-Student $p < 0,5$).

Asimismo, en el mismo ensayo se probó a *sobre-activar* el promotor SIDFR (**Figura 19**), utilizando tanto el factor de transcripción natural como los activadores artificiales, obteniendo una sobre-activación significativa con dCas9:EDLL—MS2:VPR y dCas9:VPR—MS2:VPR.

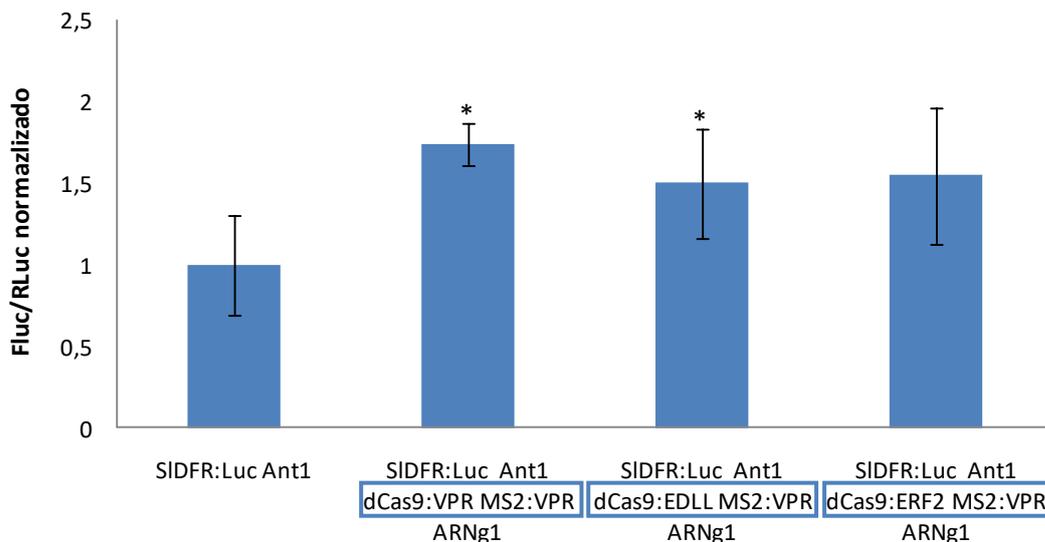


Figura 19. Estudio de la sobre-activación de DFR vía el ARN guía 1 sobre la Línea L1-5 DFR. Los resultados están presentados como ratios Fluc/RLuc normalizados frente a la expresión obtenida activando el promotor SIDFR con el factor de transcripción Ant1. El asterisco (*) indica que con un 95% de confianza existen diferencias significativas entre los niveles de expresión obtenidos con los activadores artificiales y la expresión regulada por el promotor SIDFR activado con el factor de transcripción Ant1 (Prueba T-Student $p < 0,5$).

Hasta el momento, simplemente se había empleado el ARN guía 1, cuya diana resultó estar descrita como secuencia de unión de un activador tipo MYB (Grotewold *et al.*, 1994). Fue entonces cuando se planteó la posibilidad de que la clave de la activación pudiera ser el dirigir los activadores a motivos o secuencias concretas repartidas a lo largo del promotor, dejando a un lado idea de que la activación pudiera basarse en la unión a regiones o posiciones concretas independientemente de la secuencia nucleotídica de las mismas.

En el promotor SIDFR se identificaron distintas secuencias descritas como posibles regiones de reconocimiento o de unión de activadores transcripcionales; de factores de transcripción tipo MYB, de activadores P de maíz (Grotewold *et al.*, 1994), y de activadores bHLH (Xu *et al.*, 2014). Por ese motivo, se procedió a diseñar nuevos guías para dirigirse a dichas secuencias. Para ello se empleó la estrategia del *mutiplexing*, ya que las secuencias diana carecen de la guanina inicial requerida por el promotor U6-26. Se escogieron cuatro dianas y se generaron dos guías *mutiplexing* (Tabla 5.), uno que se uniría a las posiciones -62, -213 y -1069 denominado guía M.1; y otro -62, -213 y -778 llamado guía M.2 (Figura 20). Las otras dos combinaciones no se probaron porque se encontraban en fase de clonación. La eficacia de los nuevos guías diseñados era menor que la del ARNg1 probado anteriormente (Figura 21). Y aunque se esperara un efecto aditivo o sinérgico al emplear el guía 1 junto con el *mutiplexing* diseñado, no existían diferencias significativas entre empleo del guía 1 de forma individual o junto con los tres guías de las construcciones *mutiplexing* (Figura 22).



Figura 20. Las dianas de los guías empleados en el sistema *mutiplexing*. El guía denominado M.1ARNg está compuesto por los guías ARNg -64, ARNg -213 y ARNg -1049. Por otro lado, el guía M.2ARNg está formado por los guías ARNg -64, ARNg -213 y ARNg -796. El número que acompaña a cada guía es la posición del mismo respecto al inicio de transcripción.

Tabla 5. Construcciones del *mutiplexing* y sus códigos GB.

Denominación	Guías	Código GB
M.1 ARNg	ARNg -64, ARNg -213, ARNg -1049	GB2188
M.2 ARNg	ARNg -64, ARNg -213, ARNg -796	GB2177

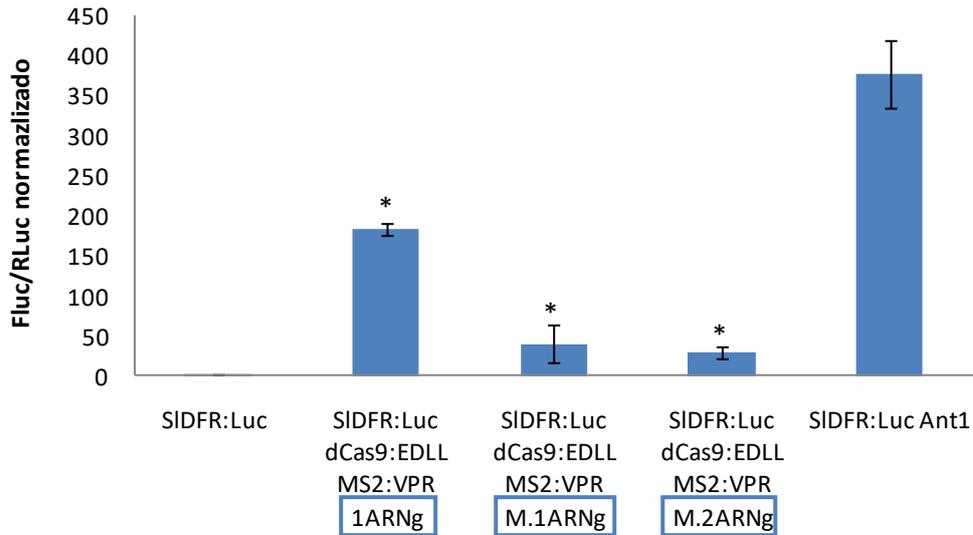


Figura 21. Estudio comparativo de la activación de SIDFR obtenida con los guías del *multiplexing* y el ARNg1 utilizando la construcción dCas9:EDLL-MS2:VPR en transitoria. Los resultados están presentados como ratios Fluc/RLuc normalizados frente al control negativo, la expresión basal del promotor DFR (sin activar). Ant1, el factor transcripcional capaz de activar SIDFR constituye el control positivo. Los guías M.1ARNg y M.2ARNg están descritos en la tabla 5. El asterisco (*) indica que con un 95% de confianza existen diferencias significativas entre los niveles de expresión obtenidos con los activadores y la expresión del control negativo, SIDFR sin activar (Prueba T-Student $p < 0,5$).

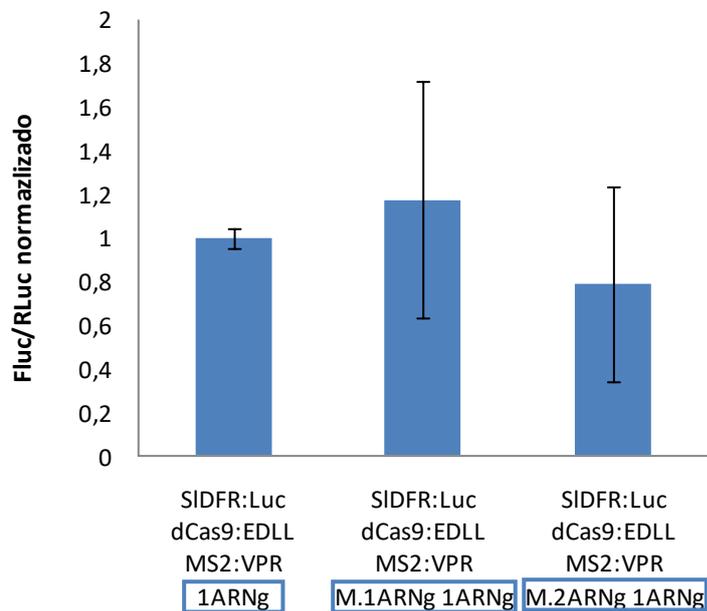


Figura 22. Estudio de la activación del promotor SIDFR en transitoria con la construcción dCas9:EDLL-MS2:VPR empleando el ARNg1 individualmente o junto con los guías del *multiplexing*. Los resultados están presentados como ratios Fluc/RLuc normalizados frente a la expresión obtenida activando el promotor SIDFR con la construcción dCas9:EDLL-MS2:VPR y el ARNg1. La ausencia de asteriscos (*) indica que con un 95% de confianza no se puede afirmar que existan diferencias significativas entre los niveles de expresión obtenidos con el ARNg1 sólo o junto con los guías del *multiplexing*, no existe ningún efecto aditivo significativo (Prueba T-Student $p > 0,5$).

5. Discusión

El efecto sinérgico de estrategia dCas9-SAM ha resultado muy efectivo; con la combinación dCas9:EDLL—MS2:VPR se ha conseguido aumentar la actividad del promotor SIDFR 20 veces en la línea DFR L5-8 y casi 80 veces en la línea DFR L1-5. Por otro lado, en transitoria se han llegado a alcanzar niveles de activación de 100. En cualquier caso, sería interesante fusionar el dominio EDLL y VPR en tándem a dCas9, con el fin de comprobar si es la estrategia SAM la responsable de la activación o simplemente el uso combinado de los dos dominios.

Teniendo en cuenta el éxito de la estrategia dCas9-SAM, el siguiente paso consistiría en tratar de activar genes endógenos (propios) de *Nicotiana benthamiana*. A su vez, en posteriores trabajos se podría estudiar si los activadores desarrollados son extrapolables a otras especies vegetales, tanto especies-modelo como cultivadas.

La estrategia dCas9-SunTag, en cambio, no ha sido efectiva, ya que no se ve reflejado el aumento de expresión esperado por el efecto aditivo de la unión de varios anticuerpos portadores de los dominios de activación. Incluso, cuando se ha combinado con la estrategia SAM, la activación obtenida probablemente sea la que genere el dominio VPR fusionado a MS2 y no los dominios unidos a los anticuerpos.

Con la intención de dar respuesta a lo sucedido se han planteado distintas posibles razones. Sería posible que los anticuerpos tuvieran dificultades para llegar al núcleo donde realizan su función, lo cual tal vez se podría solventar añadiéndoles más señales de localización nuclear. Con el fin de comprobar que la ubicación es el problema, se podría fusionar GFP al anticuerpo y observar la posición de la señal por microscopía (Tanenbaum *et al.*, 2014). Otro motivo de la falta de activación podría ser la unión de un exceso de anticuerpos, que genere un impedimento estérico, y que por lo tanto evite que polimerasa pueda llevar a cabo la transcripción. También, existe la posibilidad de que haya ocurrido lo contrario, que los epítomos no se encuentren lo suficientemente espaciados y que por problemas de espacio solo se posibilite la unión unos pocos anticuerpos con los dominios fusionados. Asimismo, podría tratarse de un problema de expresión en *Nicotiana benthamiana*, tanto del anticuerpo como de dCas9:SunTag, o un problema de plegamiento del péptido SunTag, que evite el reconocimiento de los epítomos por los anticuerpos. En cualquier caso una vez optimizado, se podría plantear el emplear distintos anticuerpos que contengan fusionados dominios distintos.

Respecto a p300, el único dominio epigenético empleado, no ha manifestado apenas activación, la causa probablemente sea su origen humano y la ausencia de optimización de codones cuando se diseñó la pieza. La falta de ortogonalidad también puede ser otra posible razón; que el dominio p300 no tenga la misma función en plantas y en animales. De hecho está descrito que ortólogos de p300 reprimen genes en *Arabidopsis* en vez de activarlos, lo cual demuestra que la homología de secuencia no implica identidad de función (Han *et al.*, 2007). Finalmente, se podría considerar la posibilidad de que no se encuentre ningún nucleosoma en la región a la que se dirige el activador, sino que se trate de ADN internucleosomal. Con el fin de testar la hipótesis propuesta se podría llevar a cabo un ensayo de posición nucleosomal (Fragoso y Hager, 1997).

En lo que se refiere a la comparación de la expresión estable y transitoria, en transitoria se han obtenido niveles de activación más elevados, lo cual podría estar relacionado con la estructura del ADN-t y la accesibilidad del mismo tanto para los activadores como para la polimerasa. En cuanto a las diferencias entre líneas, se ha observado que la L1-5 DFR se activa más que la L5-8 DFR, y al provenir de eventos de transformación diferentes probablemente dicha diferencia se deba al efecto posicional de la integración del transgén.

En cuanto al ARN guía óptimo, el más adecuado ha resultado ser el ARNg1, que se une en posición -223, teniendo como referencia el inicio de transcripción. Por otro lado, los nuevos guías diseñados para que se dirigieran a regiones específicas de activación vía el sistema *multiplexing* no han supuesto una mejora en el aumento del nivel de expresión respecto al obtenido con el ARNg1. Estos resultados indican que en la activación es más determinante la posición a la que se envían los activadores respecto al inicio de transcripción que la secuencia de unión.

Finalmente, la eficiencia global de los activadores desarrollados podría aumentar si se integraran todos los elementos a expresar en una única construcción, en vez de co-infiltrarlos. Aunque teóricamente, al infiltrar la misma densidad bacteriana se esperaría que los distintos ADN-T que contienen se transfirieran con la misma eficiencia y los distintos genes se introduzcan en las células en la misma proporción (1:1), podría no suceder de la manera descrita. Existe la posibilidad de que ciertos cultivos de *Agrobacterium* se encuentren más activos o que dependiendo al tamaño del ADN-T el mismo se transfiera con mayor facilidad. La razón de co-infiltrar, en vez de incorporar todas las unidades transcripcionales en un mismo vector fue la cantidad de trabajo y de tiempo que esto supondría. Se ha de tener en cuenta que se testaron muchas combinaciones y es por ello que la selección de los activadores se llevó a cabo de esta manera.

6. Conclusión

Aunque la estrategia dCas9-SunTag no ha resultado efectiva, la estrategia dCas9-SAM, basada en la combinación de dominios de activación fusionados a dCas9 tanto directamente como indirectamente vía el reconocimiento aptámero-proteína, resulta una herramienta útil en la activación de genes silenciados. Permite la activación de genes sin la necesidad del conocimiento de los factores de transcripción específicos que naturalmente inducen su expresión, lo cual ha sido una gran limitación en el reto de la modulación transcripcional. A su vez, permite activar genes concretos, evitando los efectos pleiotrópicos asociados al empleo de factores de transcripción que son capaces de activar múltiples genes de una misma ruta, o de rutas diferentes.

Del mismo modo que esta estrategia se ha empleado para el desarrollo de activadores transcripcionales, se puede utilizar en la construcción de represores programables para poder así regular completamente la expresión génica (La Russa y Qi, 2015). Esto abre un abanico de posibilidades en el campo de la ingeniería metabólica, ya que se podría dirigir la biosíntesis para la producción en abundancia de un metabolito de interés o de alto valor añadido. Asimismo, supondría el control de las características fenotípicas de las plantas; floración, crecimiento, tolerancia a estreses abióticos, resistencia a estreses bióticos, siempre y cuando exista conocimiento suficiente sobre los genes implicados.

En este trabajo se ha conseguido en las líneas reporteras activar el promotor SIDFR desde 20 hasta 80 veces, lo cual supone un gran éxito. Se puede considerar un suceso bastante trascendental teniendo en cuenta el sistema de activación transitoria empleado, ya que permite la activación génica de forma rápida y en el momento deseado. Finalmente, se espera que la herramienta generada mantenga su efectividad en la activación de genes endógenos propios de *Nicotiana benthamiana*, lo cual consistirá el siguiente paso del proyecto.

6. Bibliografía

- ALLIS, C. D. & JENUWEIN, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics*, 17(8), 487–500. <http://doi.org/10.1038/nrg.2016.59>
- ANDOLFO, G.; IOVIENO, P.; FRUSCIANTE, L. & ERCOLANO, M. (2016). Genome-Editing Technologies for Enhancing Plant Disease Resistance. *Front Plant Sci*, 7(1813).<http://doi.org/10.1109/TDEI.2009.5211872>
- CHAVEZ, A.; SCHEIMAN, J.; VORA, S.; PRUITT, B. W.; TUTTLE, M.; IYER, E.; LIN, S.; KIANI, S.; GUZMAN, C.D.; WIEGAND, D. J.; TER-OVANESYAN, D.; BRAFF, J. L.; DAVIDSOHN, N.; HOUSDEN, B. E.; PERRIMON, N.; WEISS, R.; AACH, J.; COLLINS, J. J. & CHURCH, G. M. (2015). Highly-efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods*, 12(4), 326–328. <http://doi.org/10.1038/nmeth.3312>.
- DEEBA, F.; HYDER, M. Z.; SHAH, S. H.; MUHAMMAD, S. & NAQVI, S. (2014). Multiplex PCR assay for identification of commonly used disarmed *Agrobacterium tumefaciens* strains. *Springerplus*, 3(358), 1–7. <http://doi.org/10.1186/2193-1801-3-358>
- DOMINGUEZ, A. A.; LIM, W. A. & QI, L. S. (2016). Beyond editing: Repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(1), 5–15. <http://doi.org/10.1038/nrm.2015.2>
- FRAGOSO, G. & HAGER, G. L. (1997). Analysis of in vivo nucleosome positions by determination of nucleosome-linker boundaries in crosslinked chromatin. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 11(2), 246–252. <http://doi.org/10.1006/meth.1996.0411>
- GALLEGO-BARTOLOMÉ, J.; GARDINER, J.; LIU, W.; PAPIKIAN, A.; GHOSHAL, B.; KUO, H. Y.; ZHAO, J. M.; SEGAL, D. J. & JACOBSEN, S. E. (2018). Targeted DNA demethylation of the *Arabidopsis* genome using the human TET1 catalytic domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(9), 201716945. <http://doi.org/10.1073/pnas.1716945115>
- GAO, Y. & ZHAO, Y. (2014). Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(4), 343–349. <http://doi.org/10.1111/jipb.12152>
- 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. <http://doi.org/10.1094/MPMI-21-8-1015>
- GROTEWOLD, E.; DRUMMOND, B. J.; BOWEN, B. & PETERSON, T. (1994). The myb homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell*, 76, 543–553.
- KONERMANN, S.; BRIGHAM, M. D.; TREVINO, A. E.; JOUNG, J.; ABUDAYYEH, O. O.; BARCENA, C.; HSU, P. D.; HABIB, N.; GOOTENBERG, J. S.; NISHIMASU, H.; NUREKI, O. & ZHANG, F. (2015). Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 517, 583–588. <http://doi.org/10.1038/nature14136>
- HAN, S. K.; SONG, J. D.; NOH, Y. S. & NOH, B. (2007). Role of plant CBP/p300-like genes in the regulation of flowering time. *Plant Journal*, 49(1), 103–114. <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02939.x>
- JIANG, W.; BIKARD, D.; COX, D.; ZHANG, F. & MARRAFFIN, L. A. (2013). CRISPR-assisted editing of bacterial genomes. *Nat Biotechnol*, 31(3), 233–239. <http://doi.org/10.1038/nbt.2508>.CRISPR-assisted
- LA RUSSA, M. F. & QI, S. (2015). The New State of the Art : Cas9 for Gene Activation and Repression. *Molecular and Cellular Biology*, 35(22), 3800–3809. <http://doi.org/10.1128/MCB.00512-15>.

- LALALEO, L.; KHOJASTEH, A., FATTAHI, M.; BONFILL, M.; CUSIDO, R., & PALAZON, J. (1996). Plant Anti-cancer Agents and their Biotechnological Production in Plant Cell Biofactories. *Current Medicinal Chemistry*, 23(39), 4418-4441. <http://doi.org/10.2174/0929867323666161024145715>
- LI, J.; BLUE, R.; ZEITLER, B.; STRANGE, T. L.; PEARL, J. R.; HUIZINGA, D. H.; EVANS, S.; GREGORY, P. D.; URNOV, F. D. & PETOLINO, J. F. (2013). Activation domains for controlling plant gene expression using designed transcription factors. *Plant Biotechnology Journal*, 11(6), 671–680. <http://doi.org/10.1111/pbi.12057>
- LI, Z.; ZHANG, D.; XIONG, X.; YAN, B.; XIE, W.; SHEEN, J. & LI, J. F. (2017). A potent Cas9-derived gene activator for plant and mammalian cells. *Nature Plants*, 3(12), 930–936. <http://doi.org/10.1038/s41477-017-0046-0>
- LIM, F. & PEABODY, D. S. (2002). RNA recognition site of PP7 coat protein. *Nucleic Acids Research*, 30(19), 4138–44. <http://doi.org/10.1093/nar/gkf552>
- MA, J. (2011). Transcriptional activators and activation mechanisms. *Protein & Cell*, 2(11), 879–888. <http://doi.org/10.1007/s13238-011-1101-7>
- MATHEWS, H. (2003). Activation Tagging in Tomato Identifies a Transcriptional Regulator of Anthocyanin Biosynthesis, Modification, and Transport. *The Plant Cell Online*, 15(8), 1689–1703. <http://doi.org/10.1105/tpc.012963>
- OGRYZKO, V. V.; SCHILTZ, R. L.; RUSSANOVA, V.; HOWARD, B. H. & NAKATANI, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 87(5), 953–959. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)82001-2](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)82001-2)
- PARK, J. J.; DEMPEWOLF, E.; ZHANG, W. & WANG, Z. Y. (2017). RNA-guided transcriptional activation via CRISPR/dCas9 mimics overexpression phenotypes in Arabidopsis. *PLoS ONE*, 12(6), 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0179410>
- PATRON, N. J.; ORZAEZ, D.; MARILLONNET, S.; WARZECHA, H.; MATTHEWMAN, C.; YOULES, M.; RAITSKIN, O.; LEVEAU, A.; FARRÉ, G.; ROGERS, C.; SMITH, A.; HIBBERD, J.; WEBB, A. A. R.; LOCKE, J.; SCHORNACK, S.; AJIOKA, J.; BAULCOMBE, D. C.; ZIPFEL, C.; KAMOUN, S.; JONES, J. D. G.; KUHN, H.; ROBATZEK, S.; VAN ESSE, H. P.; SANDERS, D.; OLDROYD, G.; MARTIN, C.; FIELD, R.; O'CONNOR, S.; FOX, S.; WULFF, B.; MILLER, B.; BREAKSPEAR, A.; RADHAKRISHNAN, G.; DELAUX, P.; LOQUÉ, D.; GRANELL, A.; TISSIER, A.; SHIH, P.; BRUTNELL, T. P.; QUICK, W. P.; RISCHER, H.; FRASER, P. D.; AHARONI, A.; RAINES, C.; SOUTH, P. F.; Ané, J.; HAMBERGER, B. R.; LANGDALE, J.; STOUGAARD, J.; BOUWMEESTER, H.; UDVARDI, M.; MURRAY, J. A. H.; NTOUKAKIS, V.; SCHÄFER, P.; DENBY, K.; EDWARDS, K. J.; OSBOURN, A. & HASELOFF, J. (2015). Standards for Plant Synthetic Biology: A Common Syntax for Exchange of DNA Parts. *New Phytologist*, 208(1), 13–19. <http://doi.org/10.1111/nph.13532>
- PEABODY, D. S. (1993). The RNA binding site of bacteriophage MS2 coat protein. *The EMBO Journal*, 12(2), 595–600.
- POLTURAK, G.; BREITEL, D.; GROSSMAN, N.; SARRION-PERDIGONES, A.; WEITHORN, E.; PLINER, M.; ORZAEZ, D.; Granell, A.; ROGACHEV, I. & AHARONI, A. (2016). Elucidation of the first committed step in betalain biosynthesis enables the heterologous engineering of betalain pigments in plants. *New Phytologist*, 210(1), 269–283. <http://doi.org/10.1111/nph.13796>
- QI, L. S.; LARSON, M. H.; GILBERT, L. A.; DOUDNA, J. A.; WEISSMAN, J. S.; ARKIN, A. P. & LIM, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 152(5), 1173–1183. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
- SANCHEZ, J. P.; ULLMAN, C.; MOORE, M.; CHOO, Y., & CHUA, N. H. (2002). Regulation of Gene Expression in Arabidopsis thaliana by Artificial Zinc Finger Chimeras. *Plant Cell Physiol.*, 43(12), 1465–1472. <http://doi.org/10.1093/pcp/pcf186>

- SARRION-PERDIGONES, A.; FALCONI, E. E.; ZANDALINAS, S. I.; JUÁREZ, P.; FERNÁNDEZ-DEL-CARMEN, A.; GRANELL, A. & ORZAEZ, D. (2011). GoldenBraid: An iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLoS ONE*, 6(7). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0021622>
- SCHOLZE, H. & BOCH, J. (2011). TAL effectors are remote controls for gene activation. *Current Opinion in Microbiology*, 14(1), 47–53. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2010.12.001>
- SHIFERA, A. S. & HARDIN, J. A. (2010). Factors modulating expression of Renilla luciferase from control plasmids used in luciferase reporter gene assays. *Anal Biochem*, 396(2), 167–172. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2009.09.043>.
- SHIU, S.H. (2005). Transcription Factor Families Have Much Higher Expansion Rates in Plants than in Animals. *Plant Physiology*, 139(1), 18–26. <http://doi.org/10.1104/pp.105.065110>
- TANENBAUM, M. E.; GILBERT, L. A.; QI, L. S.; WEISSMAN, J. S. & VALE, R. D. (2014). A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*, 159(3), 635–646. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.039>
- THAKORE, P. I.; BLACK, J. B.; HILTON, I. B. & GERSBACH, C. A. (2016). Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. *Nature Methods*, 13(2), 127–137. <http://doi.org/10.1038/nmeth.3733>
- TIWARI, S. B.; BELACHEW, A.; MA, S. F.; YOUNG, M.; ADE, J.; SHEN, Y.; MARION, C. M.; HOLTAN, H. E.; BAILEY, A.; STONE, J. F.; EDWARDS, L.; WALLACE, A. D.; CANALES, R. D.; ADAM, L.; RATCLIFFE, O. J. & REPETTI, P. P. (2012). The EDLL motif: A potent plant transcriptional activation domain from AP2/ERF transcription factors. *Plant Journal*, 70(5), 855–865. <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04935.x>
- VAZQUEZ-VILAR, M.; BERNABÉ-ORTS, J. M.; FERNANDEZ-DEL-CARMEN, A.; ZIARSOLO, P.; BLANCA, J.; GRANELL, A. & ORZAEZ, D. (2016). A modular toolbox for gRNA-Cas9 genome engineering in plants based on the GoldenBraid standard. *Plant Methods*, 12(1), 1–12. <http://doi.org/10.1186/s13007-016-0101-2>
- VAZQUEZ-VILAR, M.; QUIJANO- RUBIO, A.; FERNANDEZ-DEL-CARMEN, A.; SARRION-PERDIGONES, A.; OCHOA-FERNANDEZ, R.; ZIARSOLO, P.; BLANCA, J.; GRANELL, A. & ORZAEZ, D. (2017). GB3.0: a platform for plant bio-design that connects functional DNA elements with associated biological data. *Nucleic Acids Research*, 45(4), 2196–2209. <http://doi.org/10.1093/nar/gkw1326>
- VOINNET, O.; RIVAS, S.; MESTRE, P. & BAULCOMBE, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomatobushy stunt virus. *The Plant Journal*, 33, 949–956. <http://doi.org/10.1111/tpj.13066>
- XIE, K.; MINKENBERG, B. & YANG, Y. (2015). Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(11), 3570–3575. <http://doi.org/10.1073/pnas.1420294112>
- XU, W.; LEPINIEC, L. & DUBOS, C. (2014). New insights toward the transcriptional engineering of proanthocyanidin biosynthesis. *Plant Signaling and Behavior*, 9(6), 1–6. <http://doi.org/10.4161/psb.28736>
- Zalatan, J. G.; Lee, M. E.; Almeida, R.; Gilbert, L. A.; Whitehead, E. H.; La Russa, M.; Tsai, J. C.; Weissman, J. S.; Dueber, J. E., Qi, L. S. & Lim, W. A. (2015). Engineering Complex Synthetic Transcriptional Programs with CRISPR RNA Scaffold. *Cell*, 160(0), 339–350. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.052>.
- ZHANG, Y.; YIN, C.; ZHANG, T.; LI, F.; YANG, W.; KAMINSKI, R.; FAGAN, P. R.; PUTATUNDA, R.; YOUNG ; W. B.; KHALILI, K. & HU, W. (2015). CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs. *Scientific Reports*, 5(1), 1–14. <http://doi.org/10.1038/srep16277>