



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

Universidad Miguel Hernández de Elche

**Mutagénesis mediante el sistema
CRISPR-Cas9 de los genes *PRH75* y *POL5*
de *Arabidopsis***



Gabriela Guerra Rodríguez

Tutoras:

María Rosa Ponce Molet

Rosa Micol Ponce

Área de Genética

Departamento de Biología Aplicada

Grado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Experimentales

Curso académico 2023-2024

MARÍA ROSA PONCE MOLET, Catedrática de Genética de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y

ROSA MICOL PONCE, Profesora Ayudante Doctora de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEMOS CONSTAR:

Que el presente trabajo ha sido llevado a cabo bajo nuestra dirección y recoge fielmente la labor realizada por Gabriela Guerra Rodríguez como Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología. Las investigaciones reflejadas en esta memoria se han desarrollado íntegramente en la Unidad de Genética del Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche.



María Rosa Ponce Molet



Rosa Micol Ponce

Elche, 20 de junio de 2024.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE.....	1
II.- INTRODUCCIÓN	2
II.1.- La biogénesis del ribosoma eucariótico 80S	2
II.1.1.- Estructura de los ADNr en <i>Arabidopsis thaliana</i>	2
II.1.2.- El procesoma SSU	3
II.2.- Funciones de los genes <i>POL5</i> y <i>PRH75</i> de <i>Arabidopsis</i> y de sus ortólogos	4
II.2.1.- Las funciones del gen <i>Pol5</i> de la levadura y el <i>MyBBPIA</i> humano.....	4
II.2.2.- Las funciones de los genes <i>PRH75</i> de <i>Arabidopsis</i> y de su ortólogo humano <i>DDX21</i>	5
II.3.- CRISPR-Cas9: Sistema de inmunidad bacteriana.....	7
II.3.1.- Componentes y su función	7
II.3.2.- Procesos de reparación de rupturas de las dos cadenas de ADN (DSB) en la célula	8
II.4.- <i>Arabidopsis thaliana</i> como organismo modelo en investigación	10
III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	11
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	12
IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria	12
IV.1.1.- Nomenclatura genética.....	12
IV.1.2.- Citas bibliográficas	12
IV.2.- Condiciones de cultivo de <i>Arabidopsis</i>	13
IV.2.1.- Cultivo en placa de Petri	13
IV.2.2.- Cultivo en maceta y recolección de semillas	13
IV.3.- Disoluciones	14
IV.4.- Medios de cultivo para <i>Arabidopsis</i>	14
IV.4.1.- Tampones y otras disoluciones de uso general	15
IV.4.1.1.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico.....	15
IV.4.1.2.- Disoluciones para la electroforesis de ADN en geles de agarosa	15
IV.5.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos.....	16
IV.5.1.- Aislamiento de ácidos nucleicos	16
IV.5.1.1.- Aislamiento de ADN genómico de <i>Arabidopsis</i>	16
IV.5.2.- Amplificaciones mediante PCR.....	16
IV.5.3.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa	17
IV.5.4.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN	17

IV.6.- Microfotografía y morfometría.....	17
V.- RESULTADOS.....	18
V.1.- Estado del trabajo previo a mi llegada al laboratorio.....	18
V.1.1.- Análisis fenotípico de las plantas T ₁ transformadas	19
V.1.2.- Análisis de las secuencias de las plantas presuntamente editadas.....	22
V.1.3.- Análisis de la edición en las plantas transformadas T ₁ CR_POL5	23
V.1.4.- Análisis de la edición en las plantas transformantes T ₁ CR_PRH75	25
V.2.- Estudio de la generación T ₂ proveniente de semillas marrones	26
V.2.1.- Estudio de la generación T ₂ proveniente de semillas rojas	28
VI.- DISCUSIÓN.....	34
VII.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....	36
VIII.- BIBLIOGRAFÍA.....	38



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Representación esquemática de la organización de los NOR de Arabidopsis.	3
Figura 2.- Representación del modelo de ensamblaje del procesoma SSU o preribosoma 90S.....	4
Figura 3.- Fenotipo de los mutantes <i>rh7</i> de Arabidopsis.	6
Figura 4.- Estructura y mecanismo de acción del sistema de defensa CRISPR-Cas.	7
Figura 5.- Representación de los mecanismos celulares de reparación del ADN.....	9
Figura 6.- Región de los genes <i>POL5</i> y <i>PRH75</i> sometida a edición.....	18
Figura 7.- Resultado de la edición del líder de <i>POL5</i>	20
Figura 8.- Rosetas de las plantas T ₁ resultantes de la transformación con CRISPR- Cas9 que edita los motivos de <i>PRH75</i>	21
Figura 9.- Ejemplo de electroferogramas obtenidos de la secuenciación de plantas CR_ <i>POL5</i> y CR_ <i>PRH75</i>	23
Figura 10.- Análisis de las ediciones de las muestras de CR_ <i>POL5</i> usando la herramienta ICE.....	25
Figura 11.- Análisis de las ediciones de las muestras de CR_ <i>PRH75</i> usando la herramienta ICE.....	26
Figura 12.- Fenotipos de las plantas CR_ <i>POL5</i> -1 y CR_ <i>POL5</i> -5 y CR_ <i>POL5</i> -8 y de su progenie T ₂	28
Figura 13.- Rosetas de las plantas CR_ <i>POL5</i> provenientes de semillas T ₂ rojas	29
Figura 14.- Rosetas de las plantas CR_ <i>PRH75</i> provenientes de semillas rojas T ₂	30
Figura 15.- Análisis de las ediciones de seis plantas CR_ <i>PRH75</i> procedentes de semillas rojas T ₂	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Oligonucleótidos empleados en este trabajo.....	16
------------------------------------------------------------------	----



I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

I.- RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

En este Trabajo de Fin de Grado, se ha iniciado la caracterización funcional de los motivos UP2ATMSD (AAACCCTA) y TELOBOXATEEF1AA1 (AAACCCTAA), que se encuentran conservados entre los genes que codifican factores implicados en la biogénesis del ribosoma o proteínas ribosómicas. Ambos motivos se localizan en las regiones líder de los genes *POL5* y *PRH75* de *Arabidopsis thaliana* y se han sometido a mutagénesis mediante el sistema CRISPR-Cas9. La función de *PRH75* en la biogénesis del ribosoma está demostrada, mientras que la de *POL5* se supone en base a la conservación funcional con sus presuntos ortólogos humano y de la levadura. Hemos analizado las mutaciones producidas en plantas T_1 portadoras de transgenes CRISPR-Cas9, diseñados para editar estos motivos. Hemos empleado la coloración roja que produce la expresión del gen *DsRed* de *Discosoma* sp en las semillas T_2 para distinguir entre las que ya no portarían los transgenes responsables de la edición en su genoma y que serían marrones, como las silvestres, y las rojas, que sí los portarían y, por tanto, podrían seguir editando los motivos. Hemos encontrado fenotipos característicos de mutaciones en genes que codifican factores de la biogénesis del ribosoma en las plantas T_1 y en las T_2 procedentes de semillas rojas, que en el caso de *PRH75* resultaron estar editadas en las regiones diana de la endonucleasa Cas9.

Palabras clave: Arabidopsis, biogénesis del ribosoma, *POL5*, *PRH75*, CRISPR-Cas9, *DsRed*.

In this Final Degree Project, the functional characterization of the UP2ATMSD (AAACCCTA) and TELOBOXATEEF1AA1 (AAACCCTAA) motifs, which are conserved among genes encoding factors involved in ribosome biogenesis or ribosomal proteins, has been initiated. These motifs are located in the leader regions of the *POL5* and *PRH75* genes of *Arabidopsis thaliana*, and have been subjected to mutagenesis using the CRISPR-Cas9 system. The function of *PRH75* in ribosome biogenesis is well-established, while that of *POL5* is presumed, based on functional conservation with its putative human and yeast orthologs. We analyzed the mutations produced in T_1 plants carrying CRISPR-Cas9 transgenes designed to edit these motifs. We used the red coloration produced by the expression of the *DsRed* gene from *Discosoma* sp in T_2 seeds to distinguish between those that no longer carry the transgenes responsible for the editing in their genome, which would be brown like wild-type seeds, and the red ones, which would still carry the transgenes and be able to continue editing the motifs. We found characteristic phenotypes of mutations in genes encoding ribosome biogenesis factors in the T_1 plants and in the T_2 plants derived from red seeds, which in the case of *PRH75* were found to be edited in the Cas9 endonuclease target regions.

Keywords: Arabidopsis, ribosome biogenesis, *POL5*, *PRH75*, CRISPR-Cas9, *DsRed*.



II.- INTRODUCCIÓN

II.- INTRODUCCIÓN

II.1.- La biogénesis del ribosoma eucariótico 80S

Los organismos eucarióticos cuentan con al menos dos tipos de ribosomas para traducir los ARNm de los genes nucleares o de orgánulos, y se encuentran en el citoplasma y las mitocondrias, respectivamente. Las plantas a su vez cuentan con un ribosoma para traducir los ARNm de los genes del cloroplasto. El ribosoma citoplasmático (en adelante, el ribosoma) se denomina también 80S, por su coeficiente de sedimentación en gradientes de sacarosa, tras su centrifugación en una ultracentrífuga (S es el acrónimo del coeficiente de sedimentación de Svedberg). Está compuesto por una subunidad pequeña (SSU) de 40S y una subunidad grande (LSU) de 60S y su síntesis es muy compleja (Sáez-Vásquez y Delseny, 2019). Se inicia en el nucleolo, continua en el nucleoplasma y finaliza en el citoplasma. Implica la transcripción, procesamiento, modificación y ensamblaje del ARN ribosómico (ARNr) con proteínas ribosómicas (PR), dando lugar a las subunidades mayor o 60S y menor 40S del ribosoma, que se ensamblan posteriormente en el ribosoma maduro 80S (Soltanieh *et al.*, 2014). La subunidad 40S contiene el ARNr 18S y 33 PR, mientras que la subunidad 60S presenta tres ARNr, el 25S/28S (25S en plantas y levaduras, y 28S en metazoos), el 5,8S y el 5S, y un total de 46 PR en levaduras y 47 PR en humanos (Dörner *et al.*, 2023).

II.1.1.- Estructura de los ADNr en *Arabidopsis thaliana*

En los eucariotas, los genes de los ADNr están en múltiples copias organizadas en tándem. Se denominan ADNr 35S en la levadura, 47S en humanos y 45S en las plantas y codifican los ARNr mayores: 25S/28S, 18S y 5,8S. En *Arabidopsis thaliana*, los ADNr 45S se localizan en dos regiones organizadoras del nucleolo (NOR), conocidas como NOR2 y el NOR4, ubicadas cerca de los telómeros de los cromosomas 2 y 4, respectivamente. Las copias del ADNr 45S se separan entre sí por los espaciadores intergénicos (IGS). La unidad de transcripción de cada gen del ADNr 45S contiene las secuencias de los ARNr 18S, 5,8S y 25S que están flanqueadas por espaciadores externos (5'-ETS y 3'-ETS) y separadas por espaciadores internos (ITS), los cuales son eliminados durante el procesamiento del pre-ARNr, que es muy complejo. Los genes del ADNr de *Arabidopsis* son casi idénticos en secuencia, pero presentan polimorfismos en el extremo 3'-ETS, formando distintas variantes del pre-ARNr, lo que permite distinguir también su expresión diferencial a lo largo del desarrollo de la planta (Figura 1, página 3; Mohannath *et al.*, 2016).

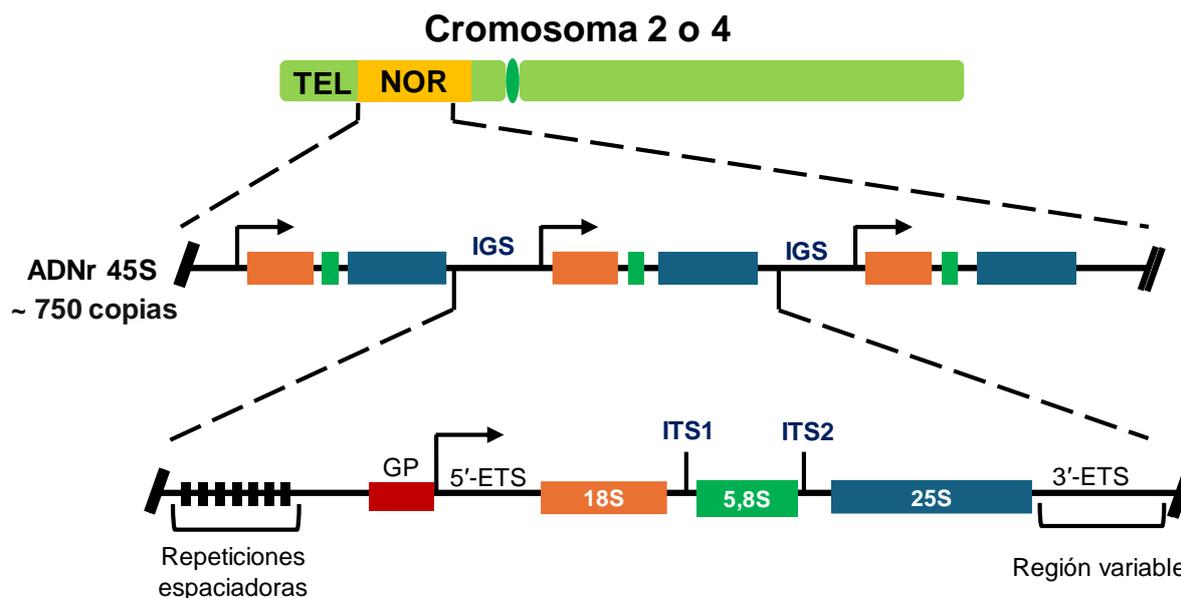


Figura 1.- Representación esquemática de la organización de los NOR de Arabidopsis. Los NOR están formados aproximadamente por 750 copias del ADNr 45S localizadas en tándem inmediatamente adyacentes a los telómeros (TEL) de los cromosomas 2 y 4. La unidad de transcripción del ADNr 45S se ha representado en la parte inferior de la figura, en rectángulos naranja, verde y azul las secuencias de los ARNr 18S, 5,8S y 25S, respectivamente, separadas por espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) y flanqueadas por los espaciadores externos (5'-ETS y 3'-ETS). Se destacan además el espaciador intergénico (IGS), formado por repeticiones de secuencia y el promotor del gen (GP) con un rectángulo rojo. Las flechas negras indican los sitios de inicio de la transcripción en cada unidad. Figura tomada a partir de Mohannath *et al.*, 2016.

II.1.2.- El procesoma SSU

El procesoma SSU (small subunit) o prerribosoma 90S, es un complejo de ribonucleoproteínas que ha sido extensamente estudiado en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Este complejo juega un papel fundamental en el procesamiento del pre-ARNr 35S y en el ensamblaje de la subunidad 40S. Durante la transcripción del ADNr 35S unos 70 factores de biogénesis de ribosomas (FBR), agrupados en subcomplejos, se ensamblan con el pre-ARNr 35S naciente y lo modifican. Los subcomplejos del procesoma que se han identificado en la levadura son cinco: UtpA, UtpB, UtpC, U3 snoRNP y Mpp10 (Sáez-Vásquez y Delseny, 2019).

Aunque no se ha observado directamente en las plantas, se presume la existencia de un procesoma SSU, debido a que los genomas vegetales codifican las proteínas ortólogas de la mayoría de las proteínas del procesoma humano y de la levadura. Esto sugiere que las plantas podrían utilizar mecanismos similares para la formación de la subunidad ribosómica 40S (Figura 2; Sáez-Vásquez y Delseny, 2019).

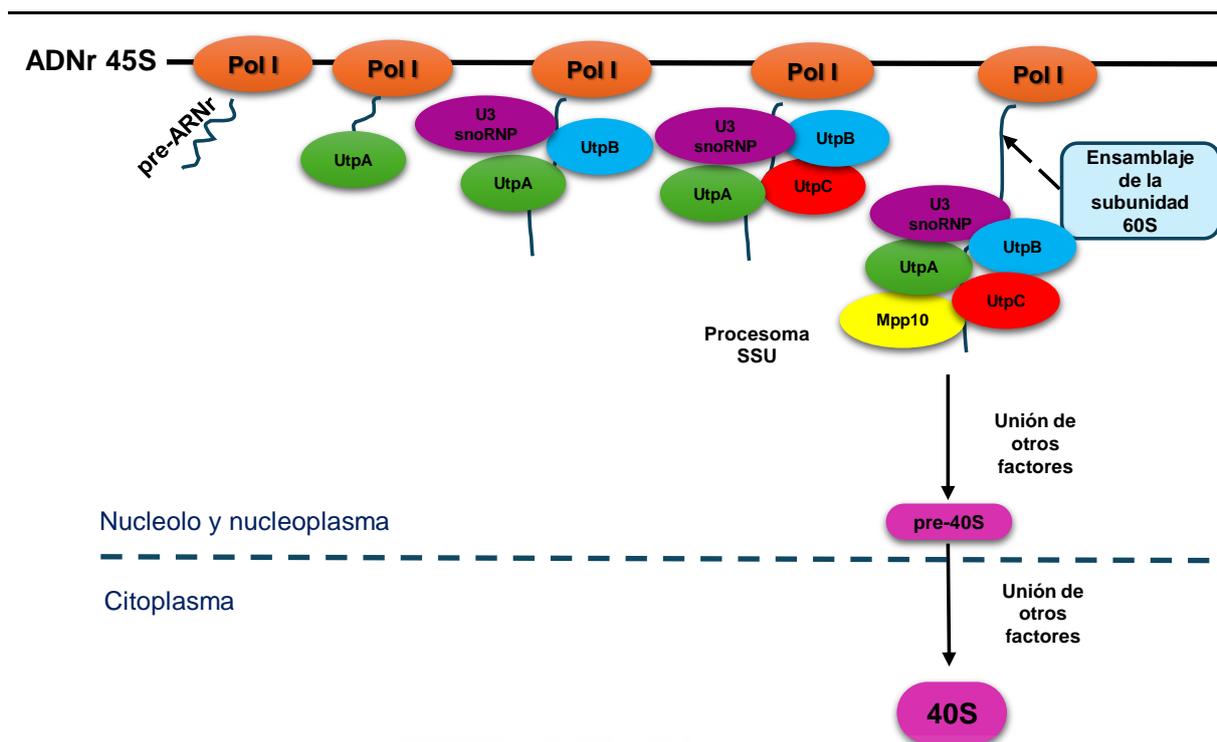


Figura 2.- Representación del modelo de ensamblaje del procesoma SSU o prerribosoma 90S, la maduración de la partícula pre-40S en Arabidopsis y su traslocación al citoplasma donde completa su maduración. Los participantes del proceso están representados con distintos colores: las ARN pol I (naranja) transcribe el ADNr 45S (línea negra) formando el ARNr 45S (línea azul) al cual se le unen distintos subcomplejos: UtpA (verde), UtpB (azul), U3snoRNP (violeta), UtpC (rojo) y Mpp10 (amarillo). También se representa el ensamblaje independiente de la subunidad 60S en el pre-ARNr naciente. La línea discontinua azul representa la envoltura nuclear que separa el núcleo del citoplasma. Figura modificada a partir de Lillo, 2023 quien se basó en Sáez-Vásquez y Delseny, 2019.

II.2.- Funciones de los genes *POL5* y *PRH75* de Arabidopsis y de sus ortólogos

II.2.1.- Las funciones del gen *Pol5* de la levadura y el *MyBBP1A* humano

Pol5 se descubrió en *Saccharomyces cerevisiae* como una proteína principalmente nucleolar y que forma parte del complejo UtpA del procesoma SSU (Figura 2). Por su estructura, fue inicialmente caracterizada como una polimerasa de tipo B, pero se ha descubierto que no participa en la replicación del ADN, ni posee actividad polimerasa, sino que participa en la biogénesis del ribosoma (Shimizu *et al.*, 2002). *Pol5* es considerada un FBR ya que participa en la transcripción del ADNr 35S, en el procesamiento del pre-ARNr 35S y en la maduración de la subunidad ribosómica 60S (Ramos-Sáenz *et al.*, 2019).

La pérdida de función del gen *Pol5* de la levadura es letal y la parcial conlleva una reducción de las subunidades 60S libres y de los niveles de los ARNr 25S y 5,8S, pero no del 18S. La síntesis de la subunidad 40S también se ve afectada, pero en menor medida (Ramos-

Sáenz *et al.*, 2019). Pol5 es considerada una proteína multifuncional, ya que también facilita la incorporación adecuada de ciertas PR y de factores de ensamblaje del ribosoma en los pre-60S (Braun *et al.*, 2020).

En humanos, la ortóloga de Pol5 es la proteína nucleolar supresora de tumores MyBBP1A (Myb binding protein 1A). MyBBP1A actúa como un represor en la expresión del ADN_r 47S (Tan *et al.*, 2012) y es incapaz de complementar el fenotipo letal de un mutante nulo de *Pol5* de la levadura, indicando que ambas proteínas no son funcionalmente intercambiables (Ramos-Sáenz *et al.*, 2019).

Aunque en el genoma de *Arabidopsis* no se había detectado un posible ortólogo de *Pol5* o *MyBBP1A* (Sáez-Vásquez y Delseny, 2019), sí parece existir y se está estudiando en el laboratorio.

II.2.2.- Las funciones de los genes *PRH75* de *Arabidopsis* y de su ortólogo humano *DDX21*

Las helicasas de ARN de la familia DEAD-box de los eucariotas cumplen un importante papel en diversas etapas del metabolismo del ARN, incluido el del ARN_r. *PRH75* pertenece a esta familia de *Arabidopsis* y, a diferencia de la presunta ortóloga de *Pol5* y *MyBBP1A*, sí ha sido estudiada, en donde también se ha denominado *AtRH7*. *PRH75* se localiza en el nucleolo y participa en la biogénesis del ARN_r y en el ensamblaje de la subunidad 40S del ribosoma. Es una proteína ubicua, pero su expresión es mayor en los tejidos que se encuentran en estado de proliferación activa (Huang *et al.*, 2015).

La pérdida de función del gen *PRH75* afecta al desarrollo de la planta y genera un fenotipo característico de los mutantes en genes que codifican FBR, que incluyen la aparición de hojas apuntadas, raíces cortas y un patrón de venación menos complejo que el silvestre (Figura 3, página 6). Las semillas de los mutantes de *atrh7/prh75* colapsan y se deforman, lo que indica que *PRH75* es importante también para el desarrollo de las semillas (Liu *et al.*, 2016).

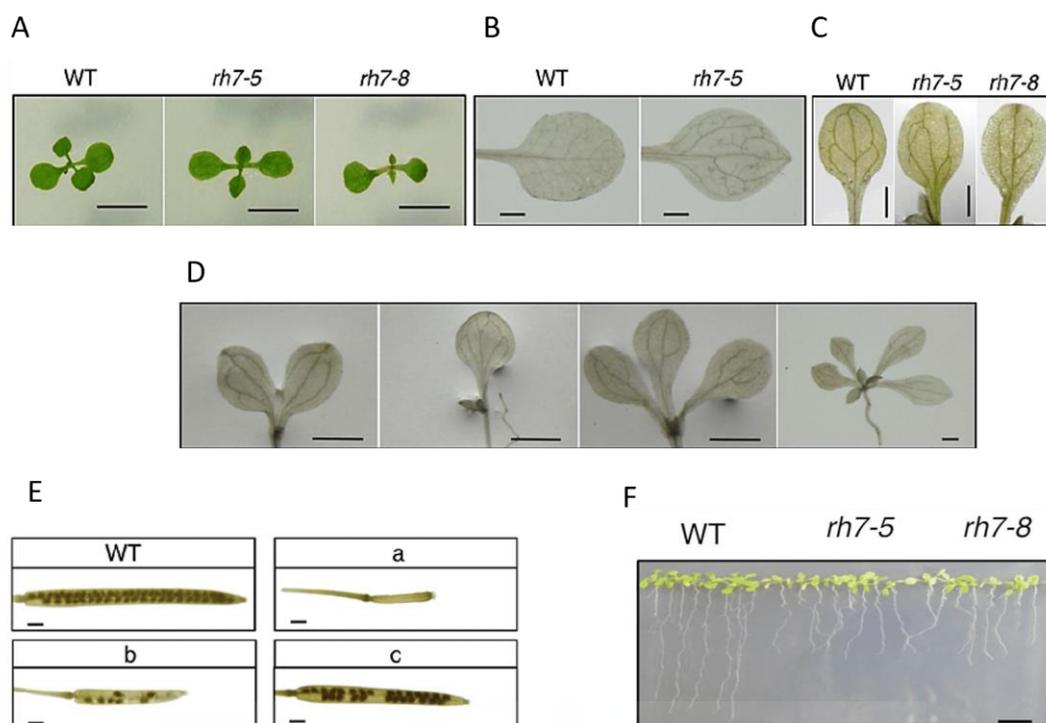


Figura 3.- Fenotipo de los mutantes *rh7* de Arabidopsis. (A) Rosetas de la estirpe silvestre (WT) y de dos mutantes *rh7* (*rh7-5* y *rh7-8*) presentando hojas apuntadas. (B-D) Patrón de venación de la estirpe silvestre y de los mutantes *rh7*, con desconexión entre las venas en las hojas (B, D) y los cotiledones (C, D) y la aparición de cotiledones triples y cuádruples y algunos fusionados. (E) Fertilidad de los mutantes *rh7*. Silicuas de la estirpe silvestre (WT) y de los mutantes *rh7* que exhiben una reducción en tamaño y número de semillas, comparadas con las del silvestre, y una morfología aberrante. (F) Reducción del crecimiento radicular de los mutantes *rh7*. Figura tomada de Liu *et al.*, 2016.

En los mutantes *ath7/prh75* se acumulan precursores del ARNr 18S, defecto que incrementa al disminuir las temperaturas, sugiriendo que PRH75 juega un papel positivo en la tolerancia al frío (Liu *et al.*, 2016). Además, se ha comprobado que PRH75 forma un complejo con CSP3 (COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3), un regulador positivo de la tolerancia a la congelación que actúa como chaperona de ARN. Esta interacción garantiza un procesamiento adecuado del pre-ARN 45S en el nucleolo (Liu *et al.*, 2016).

PRH75 no tiene ortólogos en la levadura y en humanos es *DDX21*, cuyo producto actúa como un FBR en el procesamiento del pre-ARNr 47S y sus alteraciones se asocian a distintos tipos de cáncer (Miao *et al.*, 2023).

II.3.- CRISPR-Cas9: Sistema de inmunidad bacteriana

II.3.1.- Componentes y su función

CRISPR-Cas es un sistema de defensa contra bacteriófagos y plásmidos que está presente en el casi 40% de las eubacterias y el 90% de las arqueas. Está basado en la presencia de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas (CRISPR) y proteínas asociadas (Cas) (Hryhorowicz *et al.*, 2017). Los loci CRISPR contienen repeticiones de 30 a 40 pb (pares de bases), intercaladas con espaciadores derivados de los genomas de los virus y plásmidos bacterianos con los que han entrado previamente en contacto. Los espaciadores le sirven de alerta cuando un virus o una bacteria que ya la ha infectado, intenta la reinfección (Figura 4) (Charpentier y Marraffini, 2014).

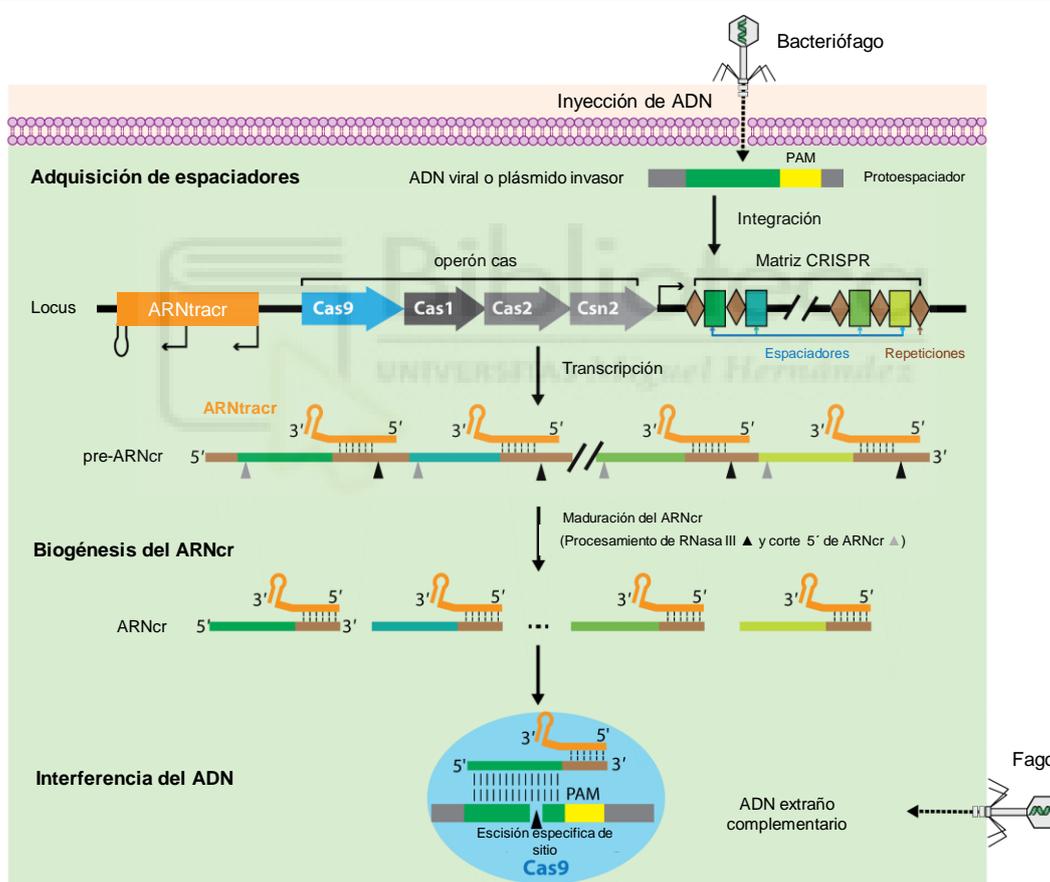


Figura 4.- Estructura y mecanismo de acción del sistema de defensa CRISPR-Cas. Se representa el locus CRISPR con rombos marrones, intercalado por los espaciadores (cuadros de distintos tonos de verde). El operón *cas* se representa con flechas azules y grises y el gen del ARN CRISPR de transactivación (ARNtracr) mediante un rectángulo naranja. El ARNtracr codifica un ARN no codificante que hibrida con las secuencias repetidas del pre-ARNcr (ARN CRISPR). El pre-ARNcr madura dando lugar al ARNcr que guía a la proteína Cas9 (representada con un círculo azul) al sitio de corte en el genoma del fago que contiene la secuencia PAM (representada con un rectángulo amarillo). Figura tomada y traducida de Jiang y Doudna, 2017.

Cerca del loci *CRISPR* se sitúan los genes *Cas* (Figura 4, página 7) que codifican endonucleasas que reconocen una secuencia de ADN específica en el genoma del virus invasor conocidas como PAM (proto-spacer adjacent motif), motivos cortos conservados de 2 a 5 pb (Jiang y Doudna, 2017). La secuencia PAM varía según la especie, y la proteína *Cas*, como la *Cas9* de *Streptococcus piogenes* (*SpyCas9*) reconoce la secuencia '5-NGG-3' donde N puede ser cualquier nucleótido (Bao *et al.*, 2019). La *SpyCas9* es la nucleasa de ADN mejor caracterizada del sistema CRISPR-Cas9, genera roturas en las dos cadenas de ADN (double-strand break; DSB) a una distancia de tres pb aguas arriba de la PAM (Jiang y Doudna, 2017).

II.3.2.- Procesos de reparación de rupturas de las dos cadenas de ADN (DSB) en la célula

El ADN puede dañarse por factores exógenos como la radiación ionizante o endógenos como productos metabólicos y especies reactivas de oxígeno. Las DSB son las lesiones más graves para una célula que causan parada de la replicación. Si son masivas y no se reparan generan aberraciones cromosómicas. Existen dos rutas de reparación en eucariotas: la de unión de extremos no homólogos (NHEJ) y la de recombinación homóloga (HR) (Figura 5, página 9; Weterings y Chen, 2008).

La ruta de reparación de DSB por HR está restringida a las fases S y G2 del ciclo celular. Es muy precisa, ya que utiliza una cromátida hermana como molde para sustituir la región dañada del cromosoma (Weterings y Chen, 2008). Por el contrario, la ruta de reparación NHEJ es mutagénica, ya que los dos extremos de la molécula se acortan hasta producir extremos romos, que unen ligasas de ADN. La ruta NHEJ es la predominante durante las fases G1 y M, por lo tanto el mecanismo de reparación más frecuente en la mutagénesis dirigida mediante el sistema CRISPR-Cas9 (Weterings y Chen, 2008).

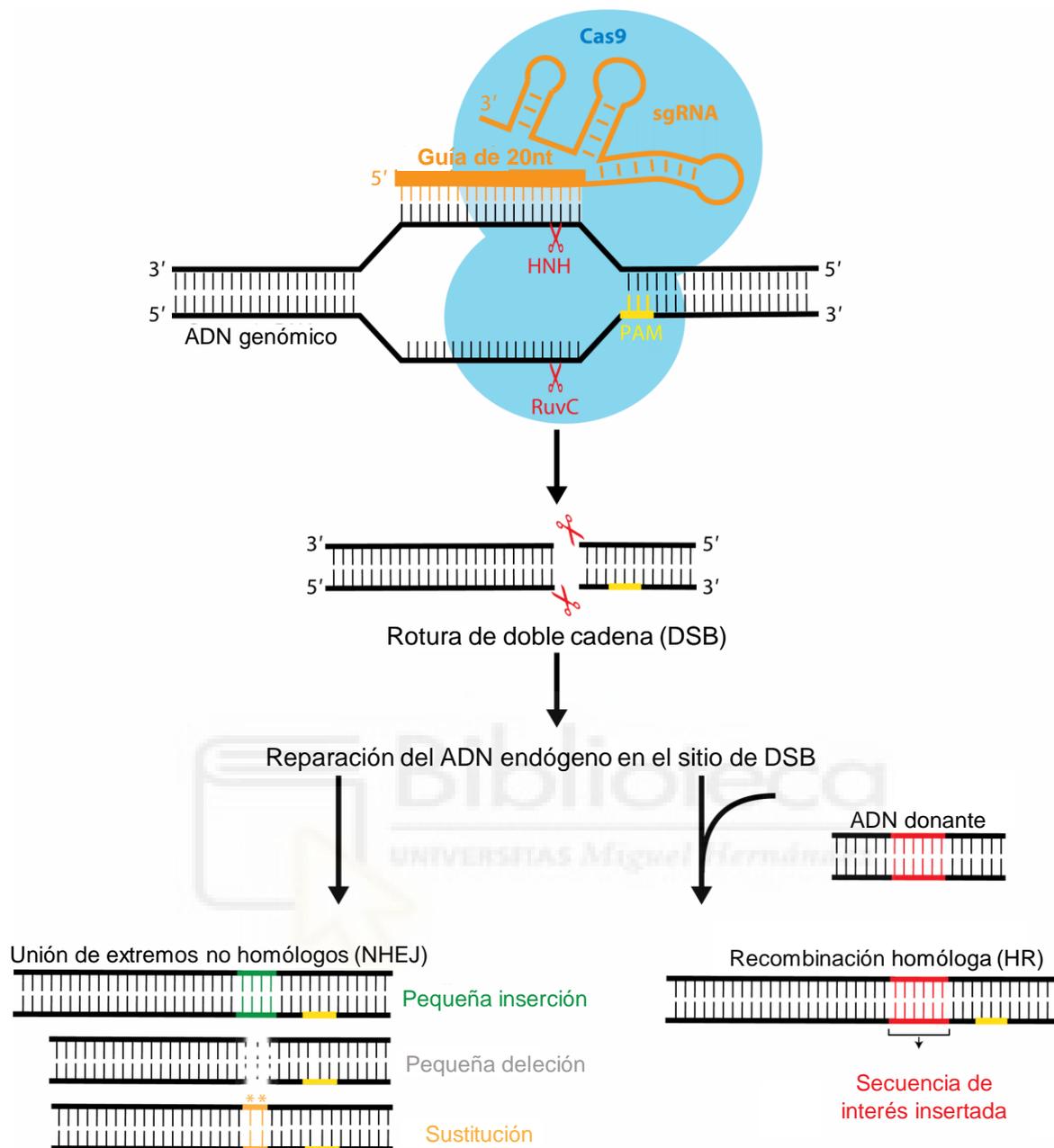


Figura 5.- Representación de los mecanismos celulares de reparación del ADN. La caspasa Cas9 (azul), guiada por un ARN guía (sgRNA en naranja), introduce roturas de doble cadena (DSB) en el ADN genómico objetivo mediante los dominios HNH y RuvC. Estas roturas son reparadas por el huésped a través de dos mecanismos de reparación. En ausencia de un molde, se produce la unión de extremos no homólogos (NHEJ, a la izquierda), que produce inserciones (verde), deleciones (gris) y sustituciones (naranja) en el sitio de rotura. Por otro lado, si se dispone de un molde donante, se lleva a cabo la recombinación homóloga (HR, a la derecha). En la imagen se muestra en rojo un fragmento de ADN con extremos idénticos a la región en la que la caspasa produjo la rotura, permitiendo su intercambio. Figura tomada y traducida de Jiang y Doudna, 2017.

En el método de edición basado en el sistema natural bacteriano CRISPR-Cas se inducen DSB para generar mutaciones en la región diana. La célula reparará la rotura por el mecanismo NHEJ, causando habitualmente deleciones que eliminarían secuencias de interés, como una secuencia reguladora de la transcripción. Con alta probabilidad las deleciones alterarán el marco de lectura del ARNm, si se producen en la región codificante, generando alelos de pérdida de función, hipomorfos o nulos. Si se suministra una secuencia homóloga durante el proceso de edición, la reparación puede realizarse mediante HR, lo que resulta en menos errores comparado con NHEJ (Charpentier y Marraffini, 2014).

El uso de CRISPR-Cas9 ofrece ventajas sobre otras herramientas de manipulación genética. Simplifica y reduce el tiempo necesario para el diseño e implementación de modificaciones en el genoma, ya que requiere solo dos componentes: la proteína Cas9 y el ARN guía (Lino *et al.*, 2018). El ARN guía resulta de la fusión del ARNcr que contiene la secuencia guía que se une al ADN diana, y otro, denominado ARNtracr, que facilita la maduración y unión del ARNcr a la Cas9 (Pruett-Miller, 2015).

II.4.- *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo en investigación

Arabidopsis thaliana es una dicotiledónea de la familia *Brassicaceae*, ampliamente usada en análisis genético durante varias décadas. Su pequeño tamaño y ciclo de vida corto facilitan el cultivo y la obtención rápida de múltiples descendientes. Fue la primera planta cuyo genoma fue secuenciado, siendo notablemente pequeño para una planta, ya que solamente es de unas 132 Mbp distribuidas en cinco cromosomas y muy poco ADN repetitivo. Contiene alrededor de 20.000 genes, unos cientos más que el genoma humano que es mucho más grande. Para su mutagénesis aleatoria se emplean mutágenos químicos como el metanosulfato de etilo, o físicos como la irradiación o los elementos insercionales, pero el mecanismo de elección para mutagénesis dirigida es el basado en el sistema CRISPR-Cas9, por su sencillez y eficacia (Woodward y Bartel, 2018; Yaschenko *et al.*, 2024).



III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

III.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Una de las líneas de investigación del laboratorio de la profesora María Rosa Ponce se centra en comprender los mecanismos genéticos que subyacen en el control de la biogénesis del ribosoma en *Arabidopsis*, un proceso bien estudiado en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, un poco menos en humanos, pero casi inexplorado en las plantas.

Antes de mi incorporación al laboratorio, el grupo de investigación ya había identificado dos motivos conservados que difieren únicamente en una A en el extremo 3', UP2ATMSD (AAACCCTA) y TELOBOXATEEF1AA1 (AAACCCTAA), situados en las regiones líder (5'-UTR) de los genes de *POL5* y *PRH75*. Los motivos UP2ATMSD y TELOBOXATEEF1AA1, junto al motivo UP1ATMSD (GGCCCAWWW; donde W es A o T), están enriquecidos en el promotor o la región 5'-UTR de muchos genes de *Arabidopsis* y otras especies vegetales como el arroz, que codifican FBR o PR (Gaspin *et al.*, 2010). Sin embargo, sus funciones, si las tienen, se desconocen y pudieran ser biológicamente irrelevantes o tener un papel clave en el control de la transcripción, de la estabilidad del ARNm o de la traducción.

Para intentar descubrir su función, se propuso su mutagénesis mediante la tecnología CRISPR-Cas9, bien asentada en *Arabidopsis* y en el laboratorio. Se diseñaron en primer lugar transgenes con ADN cuya transcripción generaría dos diferentes ARN guías para editar los motivos de ambos genes en plantas silvestres Col-0 y observar si estas ediciones causan efectos fenotípicos y moleculares, que podrían ser alteraciones en la transcripción o en la traducción de los genes *PRH75* y *POL5*.

Mi trabajo consistió en analizar las ediciones realizadas en las plantas, que ya estaban transformadas con los transgenes productores de los ARN guías y portadoras del gen *hCAS9*, una versión optimizada del gen original de la Cas9 y determinar si la modificación de uno o ambos motivos de cada gen es responsable de los efectos fenotípicos observados. Además, analicé la descendencia para comprender la herencia de las ediciones y del fenotipo mutante asociado, en caso de detectarse. Si se obtuvieran conclusiones relevantes en el estudio de los motivos de *POL5* y de *PRH75*, se extendería la investigación a otros genes de FBR y PR en los que se han detectado estos elementos presuntamente reguladores.



IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1.- Pautas que se han seguido para la redacción de esta memoria

Para la redacción de esta memoria se han seguido las pautas definidas en varias Tesis doctorales previas, Trabajos de Fin de Grado y Trabajos de Fin de Máster, realizados en los laboratorios de José Luis Micol y María Rosa Ponce, y que pueden consultarse en: <https://genetics.edu.umh.es>. En este apartado de Materiales y métodos se reproducen literalmente algunos párrafos de dichos trabajos, ya que corresponden a protocolos bien establecidos en ambos laboratorios.

Se utilizan numerosas abreviaturas y acrónimos, correspondientes en su mayoría a las unidades de medida del Sistema Internacional, y otras específicamente empleadas en Biología Molecular. Además, se ha procurado obedecer la normativa de la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) en lo referente a la formulación química y a las denominaciones de los compuestos utilizados en este trabajo. No obstante, se ha preferido emplear los acrónimos castellanizados ADN y ARN de uso común en los medios de comunicación españoles, en lugar de los recomendados por la IUPAC, DNA y RNA, para los ácidos desoxirribonucleico y ribonucleico, respectivamente.

Como recomienda la RAE en su Ortografía de la lengua española (2010), no se realiza el plural de las siglas añadiendo al final una “s” minúscula: se escribe “el ARNr” y “los ARNr” o “el FBR” y “los FBR”. Se escriben en cursiva algunos anglicismos de uso común, que carecen de una traducción al español generalmente aceptada.

IV.1.1.- Nomenclatura genética

Se mantiene la nomenclatura de los genes, proteínas y alelos que ha consagrado la comunidad de científicos de cada organismo, que incluye la regla general de que los genes y alelos se escriban en cursiva y las proteínas en tipografía normal. Si la referencia es al gen o la proteína de *Saccharomyces cerevisiae*, aparecerá la primera letra con mayúscula y el resto con minúscula, por ejemplo, *Pol5* y Pol5, respectivamente. Si se refiere a genes o proteínas de Arabidopsis o humanas el nombre abreviado se escribe con mayúsculas (*POL5* y POL5). Los alelos de un gen se indican con letras mayúsculas para el silvestre (por ejemplo, *Pol5* o *POL5*) y minúsculas para los mutantes.

IV.1.2.- Citas bibliográficas

Se ha usado EndNote (<https://endnote.com/>) para gestionar las citas bibliográficas, que se ordenan cronológicamente, siguiendo un orden alfabético para los autores de los artículos publicados el mismo año. Todos los autores de un artículo se mencionan en la bibliografía,

mientras que en el texto solo se hace referencia al primero de ellos, salvo cuando son dos. También se citan como fuentes direcciones de Internet (URL; Uniform Resource Locator), en el formato <https://...>, aun sabiendo que muchas son temporales.

IV.2.- Condiciones de cultivo de Arabidopsis

IV.2.1.- Cultivo en placa de Petri

La mayoría de los cultivos se iniciaron en placas de Petri de 15 cm de diámetro, que contenían unos 100 ml de medio sólido GM (apartado IV.4, página 14). La siembra de las semillas de Arabidopsis se realizó tras su esterilización por inmersión con agitación, durante 8 min, en una disolución acuosa del 40% en lejía comercial (NaClO al 4-5% m/v) y 2 ml/l de Triton X-100 al 1% v/v, y, durante 8 min, en una disolución de etanol al 70%, haciendo a continuación tres lavados sucesivos con agua estéril. La siembra en placas de Petri se realizó con material estéril, en una cabina de flujo laminar horizontal Telstar BH-100 o MH-100. Tras su siembra, las placas de Petri se precintaron con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M, que supone una barrera efectiva para los aerosoles, sin impedir el intercambio de gases con el exterior. Las placas inoculadas con las semillas se estratificaron durante al menos 24 h, a 4°C y en oscuridad, a fin de sincronizar su germinación, tras lo que se cultivaron a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y 50-60% de humedad relativa, con iluminación continua de $75 \mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ de luz blanca, suministrada por tubos fluorescentes Sylvania Standard F20W/133-RS Cool White en cámaras de cultivo Conviron TC16, en las que el flujo de aire es permanentemente ascendente.

El crecimiento de las plantas 14-21 días después de la estratificación (dde) es tal que se puede apreciar a simple vista la arquitectura de la roseta y de sus hojas vegetativas, pudiendo distinguir a las mutantes de las silvestres en base a sus diferencias morfológicas. Las plantas de interés fueron después trasplantadas a macetas, en las que completaron su ciclo de vida en las condiciones que se detallan en el apartado siguiente.

IV.2.2.- Cultivo en maceta y recolección de semillas

Los cultivos en maceta se efectuaron en bandejas de plástico de 28 x 50 cm, con 42 alveolos, cada uno de 5 x 5 cm (diámetro x altura), colocadas en cubetas de 7 cm de profundidad. En cada alveolo se introdujo una maceta de rejilla de 5 x 5 cm (diámetro x altura), previamente rellena con el sustrato. Estas macetas impiden que el sustrato se adhiera al alveolo, y facilitan la extracción de las plantas para la realización de cruzamientos o la recolección de semillas. Se usó como sustrato una mezcla de perlita (granulometría de 1 a 3 mm; $105\text{-}125 \text{ kg/m}^3$), vermiculita (granulometría de 1 a 3 mm; $80\text{-}100 \text{ kg/m}^3$) y turba no

fertilizada (turba rubia de musgo *Sphagnum*, de estructura gruesa; Grobmull Neuhaus), en una proporción volumétrica 2:2:1. Cada alveolo se destinó al cultivo de una sola planta, que fue trasplantada, con ayuda de unas pinzas, desde la placa de Petri en la que había permanecido durante las primeras tres semanas de su ciclo de vida.

Durante tres días, los cultivos permanecieron cubiertos con un plástico transparente perforado, a fin de evitar una excesiva condensación de agua. Cuando se produjo el alzado y la elongación de los entrenudos al término de la etapa vegetativa, se aisló a las plantas en cilindros de plástico transparente, denominados aracones (aracons; Beta Tech), que impiden el contacto entre individuos adyacentes y facilitan la recolección de las semillas.

Todos los cultivos se mantuvieron en una cámara climatizada visitable, a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y 50-60% de humedad relativa, bajo iluminación continua de $75 \mu\text{mol/s}\cdot\text{m}^2$ de luz blanca, suministrada por tubos LED Sylvania ToLEDo T8 V7 4FT 2000LM 840 RL.

Las bandejas permanecieron subirrigadas, manteniéndose un nivel de unos 2-3 cm de agua en el fondo de las cubetas. El aporte de nutrientes se hizo dos veces por semana, mediante la adición de una cantidad saturante de medio mínimo ATM (apartado IV.4, página 14). Cuando la floración se interrumpió, se suspendió el riego, propiciándose el secado de las plantas, que se mantuvieron en la cámara de cultivo al menos dos semanas más, para proceder finalmente a la recolección de sus semillas.

Para la recolección de las semillas de una planta seca, fruto de su autofecundación, esta se presionó contra un colador, el cual se sujetó sobre un papel de filtro sobre el que cayeron las semillas. La mezcla de semillas, fragmentos de silicuas y otras partes secas de la planta, que se acumuló sobre el papel, fue cribada a través de un colador adecuado, para eliminar en lo posible todas las partículas con un tamaño superior al de las semillas. Estas últimas se almacenaron en tubos *ependorf*, que se conservaron a 4°C .

IV.3.- Disoluciones

Todas las disoluciones que se mencionan en este apartado se prepararon utilizando agua desionizada, con una resistividad media de $15 \text{ M}\Omega/\text{mm}^2\cdot\text{m}$. Además, se conservaron a temperatura ambiente, salvo aquellas para las que se indica una temperatura diferente. Las esterilizaciones en autoclave se efectuaron a $1 \text{ kg}/\text{cm}^2$ y 121°C durante 20 min.

IV.4.- Medios de cultivo para *Arabidopsis*

Medio mínimo ATM (líquido): KNO_3 5 mM; KH_2PO_4 2,5 mM; MgSO_4 2 mM; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2 mM; FeNaEDTA 51 μM ; H_3BO_3 70 μM ; MnCl_2 14 μM ; CuSO_4 0,5 μM ; ZnSO_4 1 μM ; NaMoO_4 0,2 μM ; NaCl 10 μM , y CoCl_2 0,01 μM (Kranz y Kirchheim, 1987).

Medio GM (Germination Medium; sólido): NH_4NO_3 10,3 mM; H_3BO_3 50,1 μM ; CaCl_2 1,5 mM; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,05 μM ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,05 μM ; Na_2EDTA 55,4 μM ; MgSO_4 0,75 mM; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 50 μM ; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 μM ; KI 2,5 μM ; KNO_3 9,4 mM; KH_2PO_4 0,62 mM; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 μM ; sacarosa 29,2 mM; MES [ácido 2-(N-morfolino)-etano sulfónico] 2,3 mM, y 0,6% m/v de Gelrite.

Para su preparación se añadieron, a 900 ml de agua, 2,2 g de sales de Murashige y Skoog (Duchefa Biochemie; Murashige y Skoog, 1962), 10 g de sacarosa y 0,5 g de MES. Se agitó la suspensión en un agitador magnético hasta la disolución de todos sus componentes y se ajustó el pH a 5,7 con KOH 5 M y KOH 1 M (este último sirvió para aproximar el pH lo máximo posible). Posteriormente, se ajustó el volumen final a 1 l, se añadieron 6 g de Gelrite (Duchefa Biochemie), y se esterilizó en autoclave. Tras su esterilización, se mantuvo durante 30 min en un baño a 55°C antes de su vertido en placas de Petri de 15 cm de diámetro, que se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal Telstar BH-100 o MH-100. Las placas de Petri con medio sólido GM se conservaron hasta un mes a 4°C, en posición invertida y bien precintadas.

IV.4.1.- Tampones y otras disoluciones de uso general

IV.4.1.1.- Disoluciones para la purificación de ADN genómico

Tampón de extracción: Tris-HCl 100 mM pH 8; Na_2EDTA 50 mM, y NaCl 0,5 M. Se preparó a partir de las disoluciones madre Tris-HCl 1 M pH 8; Na_2EDTA 0,5 M pH 8, y NaCl 5 M. Se conservó hasta un mes a 4°C.

IV.4.1.2.- Disoluciones para la electroforesis de ADN en geles de agarosa

Tampón TAE 50x: Tris-base [Tris-(hidroximetil)aminometano] 2 M; 5,71% v/v de ácido acético glacial, y Na_2EDTA 50 mM. Para preparar 1 l de tampón se mezclaron 242 g de Tris-base, 57,1 ml de ácido acético glacial, y 100 ml de Na_2EDTA 0,5 M pH 8.

Tampón de carga 6x: 20% m/v de Ficoll; 0,25% m/v de xilencianol; 0,25% m/v de azul de bromofenol, y Na_2EDTA 10 mM.

Marcador de peso molecular: Se diluyó el marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder de Invitrogen; 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en el tampón de carga hasta una concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se usaron 10 μl por pocillo de un gel de agarosa convencional. Se conservó a -20°C.

IV.5.- Obtención y manipulación de ácidos nucleicos

IV.5.1.- Aislamiento de ácidos nucleicos

IV.5.1.1.- Aislamiento de ADN genómico de Arabidopsis

El ADN genómico usado como molde en las amplificaciones por PCR (Mullis *et al.*, 1986) se purificó utilizando una versión simplificada del método de Dellaporta *et al.* (1983). Para ello, se introdujo en un tubo *ependorf* el material vegetal, una hoja o cotiledón de la roseta de plantas 14 o 21 dde, y después se añadieron 500 µl de tampón de extracción y 3 perlas de vidrio de 3 mm de diámetro, esterilizadas en autoclave. La muestra se maceró a 30 Hz durante 3 min en un macerador automático (MM400; Retsch). A continuación, se añadieron 35 µl de SDS al 20% v/v, y se incubó la muestra durante 5 min a 65°C. Después, se añadieron 130 µl de KCH₃COO 5 M, incubando la muestra 8 min a 4°C, y centrifugándola durante 10 min a 13.500 rpm en una microfuga. El sobrenadante se transfirió a otro tubo *ependorf*, y se precipitó el ADN, incubando la muestra con 640 µl de isopropanol y 60 µl de NaCH₃COO 3 M durante 20 min a -20°C. Seguidamente, se centrifugó durante 10 min a 12.500 rpm, eliminando el sobrenadante por decantación y lavando el precipitado con 300 µl de etanol al 70% v/v. Se centrifugó otra vez durante 5 min a 13.500 rpm, se retiró el sobrenadante, y se dejó secar el precipitado. Finalmente, se resuspendió el ADN genómico en 50-100 µl de agua (según el material vegetal de partida), y se conservó a -20°C.

IV.5.2.- Amplificaciones mediante PCR

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 o 20 µl en termocicladores Bio-Rad T100. De forma rutinaria, se usó la polimerasa de ADN GoTaq G2 Flexi (Promega) a una concentración final de 0,04 U/µl. Los oligonucleótidos empleados como cebadores (Tabla 1) y los desoxirribonucleótidos se añadieron a una concentración final de 0,4 µM y 0,2 mM, respectivamente.

Tabla 1.- Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Propósito	Nombre	Secuencia (5'→3')
Genotipado de las plantas editadas con los transgenes CRISPR	PRH75-2F	TCTTATGAGCAGTGTGTATCCAT
	PRH75-R	CACTTCATCCTCCTCCTCGG
	POL5p: POL5: GFP-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT TCAGTCAAAAGTACTCATTCTTTGGG
	POL5 exon1 Rev	CTTTATCAGGTAACATTCGTATTGC
Secuenciación	GT-3-7280 RP	CCACAGGTATAGGCTTAGGCC
	PRH75-2F	TCTTATGAGCAGTGTGTATCCAT

Los programas de PCR incluyeron una etapa previa a 94°C durante 2 min, seguida de 35 o 40 ciclos en los que se repitió una fase de 15 s a 94°C para la desnaturalización de los moldes, otra de 15 s a la temperatura de apareamiento para la hibridación de los cebadores (52-60°C), y una fase final a 72°C para la polimerización, de duración variable según el tamaño del fragmento a amplificar, asumiendo que la polimerasa utilizada sintetiza ADN a razón de 1 kb/min. Por último, se programó una etapa, no cíclica, de 5 min a 72°C, para rellenar las moléculas bicatenarias.

IV.5.3.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se emplearon geles de agarosa al 1% m/v, y como electrolito, TAE 1×, que se preparó a partir de tampón TAE 50× (apartado IV.4.1.2, página 15). Se disolvió la agarosa en TAE 1× por calentamiento en un microondas, y una vez enfriada la disolución a 55°C, se añadió bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml. Las electroforesis se hicieron en cubetas horizontales, a voltaje constante de 100 V, y durante 30-40 min. Para visualizar las moléculas de ADN, se iluminaron los geles con luz UV de 312 nm, y se tomaron fotografías en un documentador de geles Vilber E-Box VX5.

IV.5.4.- Secuenciación y análisis de secuencias de ADN

Las secuencias fueron obtenidas por la empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal), a la que se enviaron muestras de 20 µl, que contenían productos de PCR previamente tratados con 1,5 µl de Exonucleasa I (Exo I; 1 U/µl) y 1 µl de FastAp (1 U/µl), ambas de Invitrogen, para la eliminación de los cebadores y los desoxirribonucleótidos no incorporados durante las amplificaciones. También se enviaron a STAB VIDA alícuotas de 5 µl de los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de secuenciación (Tabla 1, página 16) a una concentración de 10µM.

IV.6.- Microfotografía y morfometría

Las fotografías de las plantas 14 o 21 dde, se tomaron con una lupa trinocular Nikon SMZ1500, con un dispositivo microfotográfico Nikon DS-Ri2, e iluminación anular de fibra óptica, provista por una fuente de luz fría Volpi Intralux 6000-1. Las fotografías de las plantas en placa de Petri 14 dde y en maceta 54 dde se efectuaron con una cámara digital Panasonic Lumix DMC-FX9, en un estudio fotográfico Havox HPB-40XD equipado con 120 luces LED.



V.- RESULTADOS

V.- RESULTADOS

V.1.- Estado del trabajo previo a mi llegada al laboratorio

Se diseñaron antes de mi llegada al laboratorio, vectores CRISPR para editar los motivos UP2ATMSD (AAACCCTA) y TELOBOXATEEF1AA1 (AAACCCTAA), localizados en la región 5'-UTR de los genes *POL5* y *PRH75* (Figura 6).

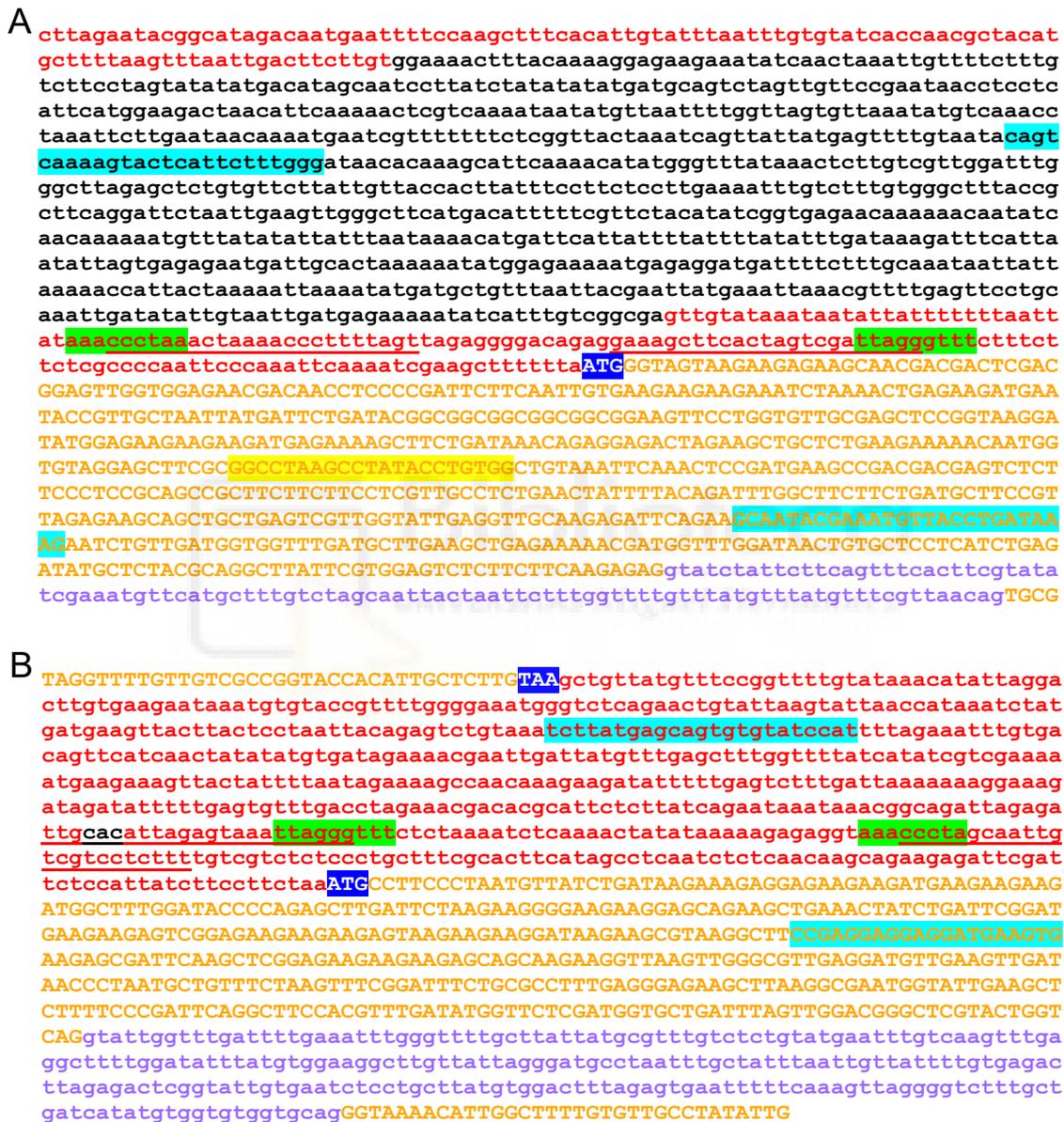


Figura 6.- Región de los genes *POL5* y *PRH75* sometida a edición. (A, B) Secuencias parciales de los genes *POL5* (A) y *PRH75* (B), en donde se han localizado los dos motivos UP2ATMSD (AAACCCTA) de cada gen, que se han resaltado en verde. Se representa con letras mayúsculas, los exones y con minúsculas con diferentes colores, las regiones no codificantes: las UTR (en letras rojas), los intrones (en morado) y las secuencias intergénicas (en negro) que separan los genes *POL5* y *PRH75* de los que se encuentran más próximos a sus extremos 5'. Se destaca en azul y con letras blancas el codón de inicio de la traducción ATG de los genes *POL5* y *PRH75* y el de terminación TAA del gen aguas arriba de

PRH75 (B). Se han subrayado, los ADN de las guías empleadas en cuyos extremos 5' se encuentran las secuencias complementarias a las PAM (CCC para la guía 1 y AGG para la 2; en la secuencia de *POL5* y AGG y CCC en *PRH75*). Las secuencias destacadas en azul corresponden a los sitios de hibridación de los cebadores *POL5p*: *POL5*: GFP-F y *POL5*exon1 Rev (A), y *PRH75_2F* y *PRH75_R* (B), utilizados en las amplificaciones. Se destaca en amarillo el sitio de hibridación del cebador GT-3-7280 RP que se utilizó para secuenciar la región candidata a la edición de *POL5*.

Al contener cada gen dos motivos, se diseñaron cuatro ARN guías, dos para cada gen. Se utilizaron los programas CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) y Breaking Cas (<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/>) para el diseño de las guías, que fueron de 20 nt, excluyendo el motivo PAM. Se utilizó la tecnología GoldenBraid (<https://gbcloning.upv.es/>) para el ensamble de los transgenes productores de las guías y una versión modificada del gen *Cas9* de *Streptococcus pyogenes*, que se abrevia como *hCas9*. El gen *hCas9* es una versión optimizada, en la que los codones de uso poco frecuente en eucariotas han sido sustituidos por los de mayor uso en humanos, para mejorar la eficacia de su traducción.

En lugar de emplear genes de resistencia a antibióticos para la selección de transformantes, se optó por utilizar el gen *DsRed* de *Discosoma* sp, regulado por el promotor del gen *2S SEED STORAGE PROTEIN 3* (pAt2S3) de *Arabidopsis*, que se expresa específicamente en las semillas de esta planta. Dicho gen se incorporó también a la construcción que contenía los elementos necesarios para la edición, mencionados en el párrafo anterior. De esta forma, se facilita y acelera la selección de las plantas que contengan los transgenes de interés en su genoma, ya que sus semillas serán rojas, en lugar de marrones, que es el color silvestre.

Las construcciones se utilizaron para transformar células competentes de la estirpe C58C1 de *Agrobacterium thumefaciens* mediante electroporación, que posteriormente se emplearon para transformar plantas de *Arabidopsis*, denominadas T₀, cuya autofecundación produciría semillas que se seleccionarían por su color, ya que sólo las rojas serían realmente las únicas cuyos embriones serían portadores del transgén productor de ediciones. La siembra de las semillas rojas producirá plantas T₁ que pueden estar editadas o no y en mayor o menor grado, ya que no todas lo estarán ni contendrán en todas sus células la misma edición (Bao *et al.*, 2019). Mi trabajo comenzó una vez las semillas T₁ rojas fueron sembradas.

V.1.1.- Análisis fenotípico de las plantas T₁ transformadas

Los resultados de edición de un experimento con el sistema CRISPR-Cas9 son impredecibles y resultan en una población celular genotípicamente heterogénea. Las plantas T₁ obtenidas de la transformación son mosaicos, lo que significa que presentan una edición

genética distinta en cada célula de cada órgano, pero también hay células que no están editadas. La razón es que la enzima hCas9 corta el ADN de manera uniforme en todas las células, pero el mecanismo de reparación NHEJ, que es el más frecuente, repara las rupturas cromosómicas introduciendo inserciones y deleciones aleatorias, ya que en la reparación no emplea un molde de ADN (Figura 5, página 9).

Comencé caracterizando fenotípicamente 19 plantas T_1 transformadas con las construcciones portadoras de transgenes para generar dos guías (g1 y g2) para cada gen. Ocho de las plantas resultaron de la transformación con los transgenes para editar *POL5* y otras once para *PRH75*. Hemos denominado a estas plantas CR_PRH75 y CR_POL5 (Figura 7, página 20 y Figura 8, página 21).

Todos los individuos T_1 CR_POL5 presentaron en mayor o menor medida fenotipos característicos de mutantes en genes de proteínas ribosómicas FBR o PR, como esperábamos, siendo más pronunciados el de las plantas CR_POL5-1 y CR_POL5-5, que mostraron hojas muy apuntadas y con márgenes dentados (Figura 7).

La presencia de este fenotipo es indicativa de la eficacia del sistema CRISPR-Cas9 para inducir mutaciones. Por tanto, en los análisis de las secuencias esperaríamos obtener un porcentaje elevado de edición, sobre todo en estos dos individuos.

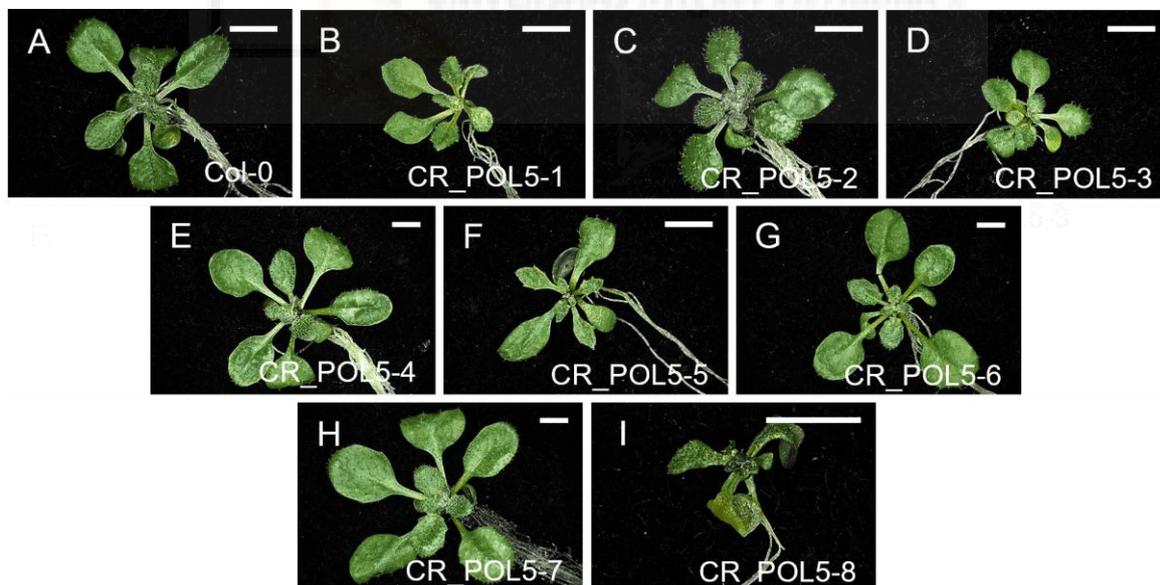


Figura 7.- Resultado de la edición del líder de *POL5*. (A-I) Rosetas de (A) la estirpe silvestre Col-0 y (B-I) de las plantas T_1 resultantes de la transformación con las construcciones CRISPR-Cas9 para editar los motivos de *POL5*. Por conveniencia, en la figura se ha abreviado el nombre de las plantas. Las barras de escala indican 1 mm.

Al igual que las plantas T₁ portadoras de la construcción CR_POL5, las de la edición de *PRH75* también son mosaicos genéticos, por lo tanto, en la muestra se detectarían múltiples alelos. Los individuos CR_PRH75-1, CR_PRH75-2, CR_PRH75-6 y CR_PRH75-9 fueron los que presentaron un fenotipo más acentuado en este grupo, con hojas algo apuntadas y márgenes dentados. También obtuvimos plantas con un crecimiento más retardado como CR_PRH75-3, CR_PRH75-10 y CR_PRH75-11 (Figura 8). Cabe mencionar que este fenotipo observado en las plantas de CR_PRH75 es similar al de los mutantes *athr7/prh75* descritos en la literatura científica para la pérdida de función de este gen (Figura 3, página 6). Estos mutantes también presentaron hojas apuntadas y márgenes dentados.

Además, las plantas T₁ portadoras del transgén (germinaron a partir de una semilla roja) serían heterocigotas para dicho transgén, por lo que se obtendría una segregación de semillas rojas y marrones en la descendencia. Otro rasgo fenotípico a destacar es que todas ellas segregaron mientras que la planta CR_PRH75-11, con una roseta más pequeña en comparación con el resto, no produjo semillas rojas.

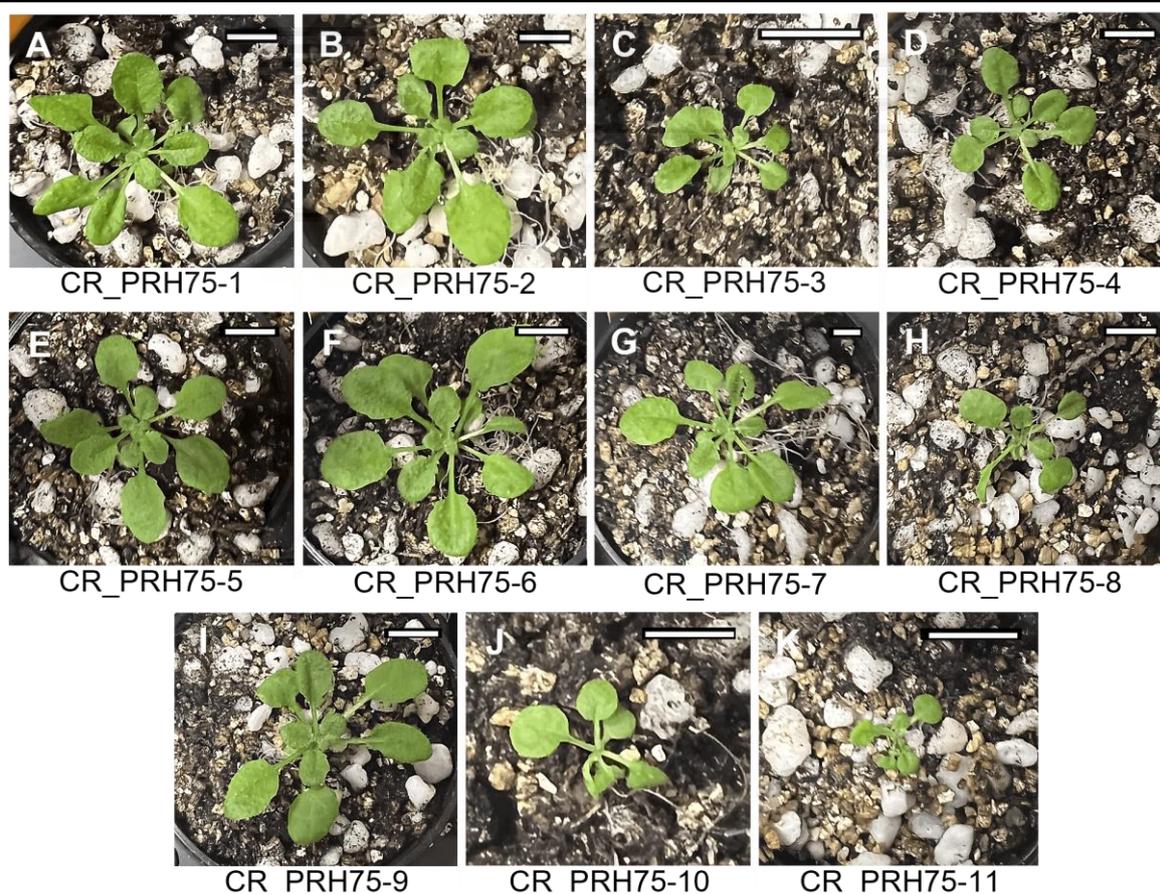


Figura 8.- Rosetas de las plantas T₁ resultantes de la transformación con CRISPR-Cas9 que edita los motivos de *PRH75*. Las barras de escala indican 1mm.

El fenotipo mutante de las plantas CR_PRH75 fue más suave que el de CR_POL5, probablemente porque *PRH75* juega un papel menos importante que *POL5* en la biogénesis del ribosoma. De hecho, aunque ambos son de copia única en humanos, las mutaciones nulas de *MyBBP1a* y de *Pol5* de la levadura son letales, mientras que las de *DDX21*, ortólogo de *PRH75*, son viables, tal y como se comentó en la Introducción.

V.1.2.- Análisis de las secuencias de las plantas presuntamente editadas

Aunque sólo puede haber dos alelos en una célula de *Arabidopsis*, ya que es diploide, una edición CRISPR-Cas9 genera múltiples alelos que resultan en un electroferograma ilegible con los programas habituales de análisis. La razón es que el ADN genómico no procede de una única célula y el proceso de edición opera independientemente en cada célula, constituyendo un mosaico genético, tal como se comentó anteriormente. Para solventar el problema, hemos utilizado la herramienta ICE (Inference of CRISPR Edits), diseñada para el análisis de los resultados de las ediciones CRISPR-Cas. ICE es capaz de analizar los electroferogramas en donde aparecen múltiples picos en una posición y en múltiples posiciones, descomponer en secuencias individuales y cuantificar la frecuencia de cada una en el conjunto. Además, es capaz de analizar la edición que provoca el uso simultáneo de varias guías (Medina, 2023).

ICE evalúa en primer lugar la calidad de los datos de la secuenciación e identifica los sitios en los que debería haber cortado la endonucleasa Cas9, en este caso la hCas9, en la secuencia que se introduce en el programa como control. Luego, realiza un alineamiento con las secuencias, marca la región del corte con una línea vertical discontinua y resume el efecto de la edición. A continuación, ejecuta una regresión de mínimos cuadrados no negativos para identificar qué secuencias de las propuestas son más probables en la muestra. Por último, calcula la eficacia de la edición indicando el porcentaje de la población de células de la muestra que ha sido editada y el efecto de la edición en la proteína resultante, si se ha editado una región codificante, que no es el caso de las ediciones de este TFG. Además, puede detectar y analizar ediciones grandes o inesperadas (Hsiau *et al.*, 2019).

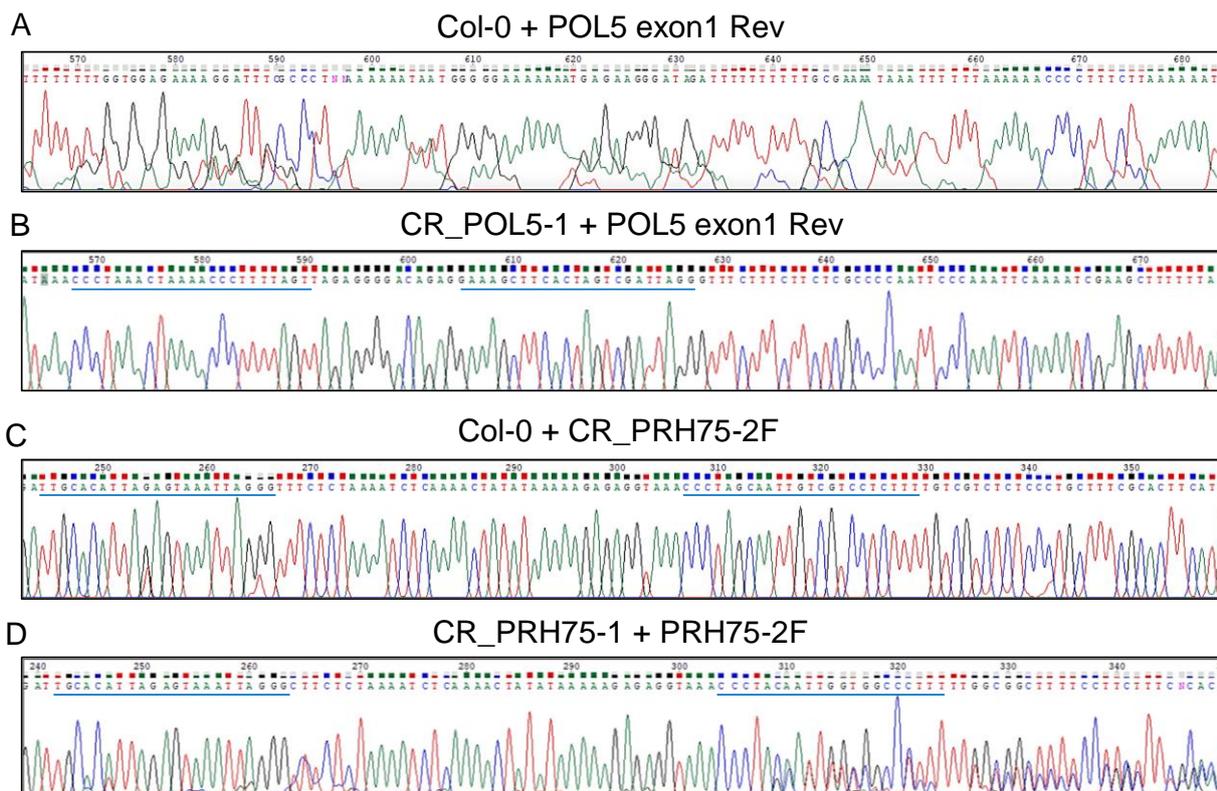


Figura 9.- Ejemplo de electroferogramas obtenidos de la secuenciación de plantas CR_POL5 y CR_PRH75. (B y C) Controles usados para el análisis de las ediciones con el programa ICE donde se observan picos simples y definidos, indicando la presencia de un único alelo, que corresponde con la ausencia de edición. (A) Electroferograma de la planta de Col-0 secuenciada con el cebador POL5 exon1 Rev en la que vemos múltiples picos, y por esta razón no la tomamos como referencia para el análisis de las ediciones con el programa ICE. (D) Planta editada CR_PRH75-1. Se observa dónde empieza la edición mostrándose a partir de la posición 310, múltiples picos que representan la variedad de alelos generados, resultando en un mosaico genético. Subrayado en azul están las secuencias correspondientes a las guías. En Col-0 + POL5 exon1 Rev no se encontraron las secuencias de las guías, por eso no están representadas en la figura. El programa ICE descompondrá los electroferogramas complejos de las plantas editadas en secuencias individuales y cuantificará la frecuencia de cada alelo en la muestra.

V.1.3.- Análisis de la edición en las plantas transformadas T₁ CR_POL5

Para poder analizar las ediciones mediante el programa ICE, se extrajo ADN genómico de las hojas de roseta de las plantas CR_POL5 (apartado IV.5.1.1, página 16). Se amplificó mediante PCR la región diana de *POL5* con los cebadores POL5p:POL5:GFP-F y POL5 exon1 Rev (Tabla 1, página 16 y Figura 6, página 18) y los productos de PCR se secuenciaron por el método de Sanger. Para la secuenciación de estas plantas CR_POL5, elegimos el cebador GT-3-7280 RP, cuya posición de hibridación es más cercana que los otros dos a los sitios diana (Figura 6, página 18), por lo que se podría obtener una mejor secuencia.

Como se mencionó anteriormente, para el análisis de las ediciones con el programa ICE, se recomienda utilizar un electroferograma control para realizar el alineamiento con las muestras supuestamente editadas. Sin embargo, en el caso de CR_POL5, no se utilizó el electroferograma de Col-0 como referencia, que hubiera sido el control más adecuado, debido a que la calidad de esta muestra no era lo suficientemente buena. Esto impidió que el programa ICE encontrara los sitios de corte de una de las guías, imposibilitando el análisis.

Para la selección del nuevo control, revisamos los electroferogramas de cada una de las muestras de CR_POL5 y seleccionamos las que no presentaban múltiples picos (Figura 9, página 23). Realizamos a continuación un alineamiento de sus secuencias con la de la secuencia depositada en la base de datos de Arabidopsis (TAIR; <https://www.arabidopsis.org/>) y seleccionamos la de CR_POL5-1 como control para el análisis con ICE.

En la mayoría de los individuos editados aparece el alelo silvestre y como mínimo un alelo mutante. Por ejemplo, en CR_POL5-3 y CR_POL5-8 obtuvimos dos alelos mutantes adicionales además del alelo de tipo silvestre. En el caso de CR_POL5-3, los alelos mutantes representan un 12% y un 7% de las secuencias, mientras que en CR_POL5-8, los alelos mutantes tienen un porcentaje de 27% y 6% (Figura 10).

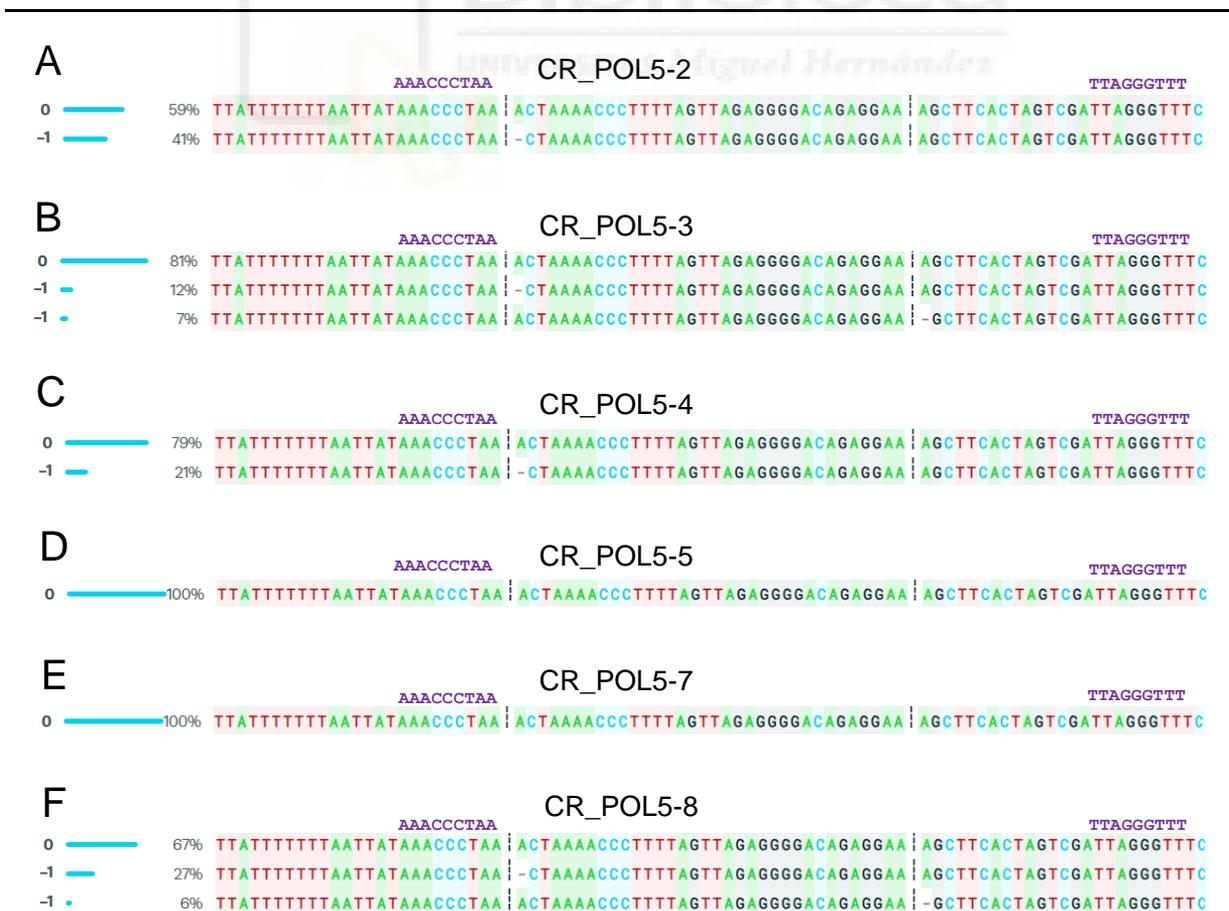


Figura 10.- Análisis de las ediciones de las muestras de CR_POL5 usando la herramienta ICE. Las barras azules horizontales representan la contribución de cada presunto alelo en el total de las secuencias analizadas. A la derecha de la barra, se muestran los porcentajes de edición y a la izquierda, el número de bases insertadas (+) o delecionadas (-). El cero indica que la secuencia es silvestre (no está editada). Las líneas de puntos verticales marcan los dos sitios de corte de la hCas9 en el genoma de la planta. En la figura se representa con letras moradas, la secuencia de los dos motivos (AAACCCTA y TTAAGGGTTT) y la posición en la que se encuentran.

No se obtuvieron mutaciones en las secuencias diana, sino próximas a ellas, siendo la deleción de la A adyacente al motivo AAACCCTAA, la más frecuente (Figura 10).

Esta deleción también podría ser un artefacto producido durante las reacciones de secuenciación, ya que las polimerasas de ADN cometen frecuentemente errores de adición o deleción de un nucleótido, sobre todo en tramos de varias adeninas. Sin embargo, este hecho debería haber ocurrido también en otras secuencias. Consideramos también la posibilidad de que se hubiera producido una confusión en la rotulación de las muestras ya que, sorprendentemente los únicos individuos con electroferogramas de calidad que no presentaron mutaciones fueron CR_POL5-1 y CR_POL5-5, cuyos fenotipos mutantes eran los más extremos. También pensamos en la posibilidad de que se hubiera producido *off-targets*, es decir, ediciones en otras regiones que no son las dianas para las que se diseñaron las guías, pero descartamos esta opción porque se seleccionaron con el programa de generación de ARN guías aquellas que no presentaban *off-targets*. Además, los fenotipos de ambas plantas coincidían con lo esperado de mutaciones de pérdida de función en un gen que codificara un FBR o PR (Figura 7, página 20). La edición de la muestra CR-POL5-6 no se pudo analizar debido a la baja calidad de su secuencia, por ello no se representó en la Figura 10.

V.1.4.- Análisis de la edición en las plantas transformantes T₁ CR_PRH75

Extrajimos el ADN de las muestras, amplificamos la región que contiene la secuencia presuntamente editada utilizando los cebadores PRH75-2F y PRH75-R y seleccionamos para secuenciar el cebador PRH75-2F (Figura 8, página 21). Escogimos este cebador, debido a que se encontraba más cerca a los sitios diana, pero a una distancia mayor de 100 pb para asegurar una buena calidad de la secuenciación. Para el análisis de las ediciones con el programa ICE, se utilizó como secuencia control la del silvestre Col-0. Sin embargo, solo obtuvimos secuencias de calidad suficiente a partir del ADN genómico de dos plantas, CR_PRH75-1 y CR_PRH75-2. Al revisar las ediciones, solo encontramos el individuo CR_PRH75-1 con uno de los motivos editados. En CR_PRH75-2, las ediciones se presentaron en regiones contiguas a los dominios (Figura 11).

Se separaron las semillas rojas de las marrones y se sembraron, en una primera fase, únicamente las marrones, que ya no portarían los transgenes para las ediciones CRISPR-Cas9, ya que se encuentra en la región de ADN-T del vector utilizado, junto con el gen *DsRed*. Por tanto, las plantas T₂ procedentes de las semillas marrones no seguirían editando su genoma, al carecer de los genes de la *hCas9* ni de los ARN guías.

Se esterilizaron y sembraron en placas de Petri una parte de las semillas T₂ marrones recogidas de las plantas T₁ CR_POL5 y CR_PRH75. Las plantas T₁ CR_POL5-5 y CR_POL5-8, que tenían un fenotipo extremo (Figura 7, página 20), fueron prácticamente estériles, rindiendo aproximadamente diez y cinco semillas T₂ respectivamente. En el caso de CR-POL5-1, también rindió pocas semillas, de las cuales la mayoría eran de color rojo. De las plantas CR_POL5-1 y CR_POL5-5, solo se pudo seleccionar una semilla de color marrón. La obtención de tan pocas semillas puede indicar que la modificación de *POL5* en estas plantas puede estar interfiriendo en el desarrollo reproductivo y es contradictorio con la ausencia de edición que observamos en estas plantas T₁ parentales.

Se observaron sus fenotipos 15 dde, encontrándose que no reapareció en ninguna de ellas el fenotipo mutante de las plantas parentales T₁ (Figura 12, página 28), lo que sugería que, si los alelos mutantes que se habían identificado en las plantas T₁ eran responsables del fenotipo, estos no habían pasado a la línea germinal. No obstante, se trasplantaron todas ellas a maceta y se recolectaron sus semillas T₃, que se analizarán más adelante.

Se volvió a realizar una segunda selección de semillas marrones, procedentes de plantas T₁ CR_POL5 y CR_PRH75 (Figura 12 A-C). Nuevamente, no observamos fenotipos mutantes en las plantas (Figura 12 E y F), salvo en el individuo CR_POL5-8.1 (Figura 12D y G, página 28). Este individuo procede de la planta T₁ CR_POL5-8, que mostró un fenotipo mutante muy acusado. En el análisis por secuenciación de la edición de esta planta parental, se observó una deleción de una A contigua a uno de los motivos en el 27% de las secuencias (Figura 10, página 25). Su descendiente, CR_POL5-8.1, también mostró un fenotipo mutante aberrante, tanto en la roseta como en el alzado, que fue mucho más corto (Figura 12, página 28).

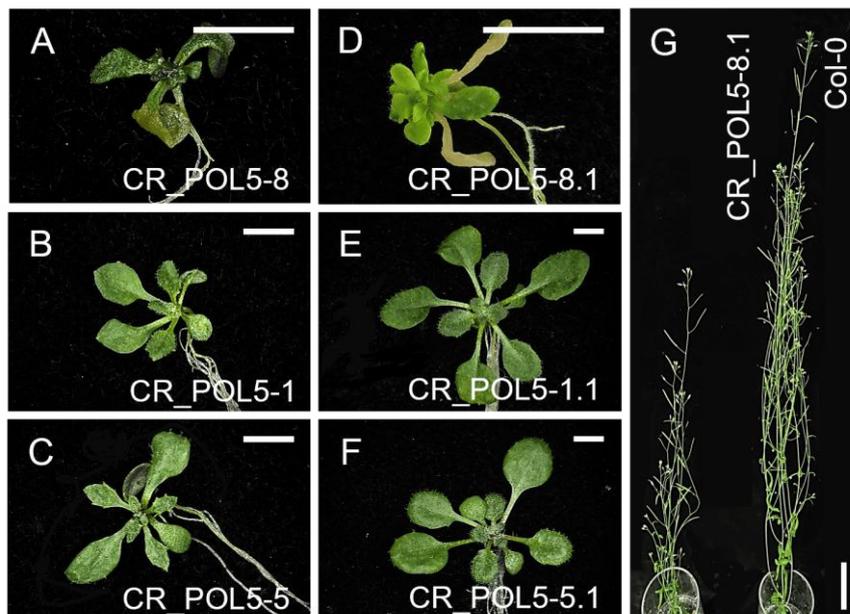


Figura 12.- Fenotipos de las plantas CR_POL5-1 y CR_POL5-5 y CR_POL5-8 y de su progenie T₂. (A-F) Rosetas de las plantas (A, B, C) T₁ y (D, E, F) de sus respectivas progenies T₂. (G) Porte de las plantas Col-0 y CR_POL5-8.1 que fueron las únicas que mostraron un fenotipo mutante, como también lo tenía su parental. Las fotografías de las plantas T₂ se tomaron 21 (D, E y F) y 48 dde (G). Las barras de escala de (A-F) indican 1 mm y la de (G) 8 cm.

Es posible que las ediciones producidas en la primera generación no hayan afectado a las células germinales y, por ende, la transmisión de las mutaciones no se produjo a las plantas T₂. Secuenciamos el único individuo que presentó fenotipo mutante, CR_POL5-8.1 pero no presentó ediciones, además el programa ICE mostró un mensaje indicando que era necesario reposicionar las guías.

V.2.1.- Estudio de la generación T₂ proveniente de semillas rojas

Dado que en la progenie T₂ solo obtuvimos una planta con fenotipo mutante cuando seleccionamos las semillas marrones, decidimos realizar una tercera siembra de semillas T₂, utilizando las semillas rojas, que deberían ser portadoras de los transgenes CRISPR-Cas9 y continuarían editando la región. La idea era intentar volver a obtener plantas T₂ con el fenotipo mutante esperado, y que se había observado en las T₁.

La siembra de semillas T₂ rojas fue aparentemente mucho más eficaz que la de las marrones, ya que resultó en la identificación de ocho plantas CR_POL5 y trece CR_PRH75 con fenotipos mutantes más o menos severos, y que en el caso de estas últimas algunos fueron inesperados (Figura 14, página 30).

Los fenotipos más extremos entre las ocho plantas CR_POL5 fueron los de CR_POL5-6.1 y CR_POL5-7.1, ya que eran plantas muy pequeñas y con una arquitectura de la roseta muy aberrante. Además, mostraron un crecimiento retardado (Figura 13) que se detuvo a los 34 dde. Debido a la similitud del fenotipo, a la escasez de material por su pequeño tamaño y a la necesidad de obtener ADN y ARN para secuenciar la región editada y determinar la expresión de *POL5*, decidimos utilizar una de las plantas completas (CR-POL5-7.1) para extraer ADN y la otra (CR-POL5-6.1) para obtener ARN en un futuro.

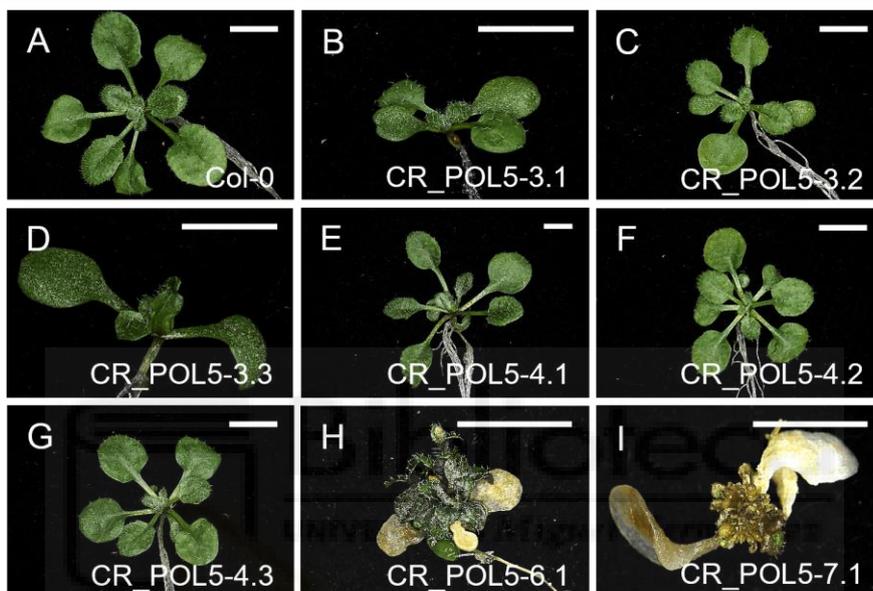


Figura 13.- Rosetas de las plantas CR_POL5 provenientes de semillas T₂ rojas. Las fotografías se tomaron 21 (A-G) y 34 dde (H e I). Las barras de escala indican 1 mm.

En el caso de las plantas CR_PRH75 T₂ provenientes de semillas rojas pudimos establecer tres clases fenotípicas: plantas con hojas apuntadas y margen dentado, plantas con rosetas muy compactas y plantas albinas (Figura 14, página 30), estos dos últimos fenotipos fueron inesperados. Las rosetas de los individuos CR_PRH75-10.1, 10.2 y 10.3, procedentes de la planta CR_PRH75-10, fueron muy compactas. En la descendencia de la planta CR_PRH75-9, obtuvimos tres albinas, además de la planta CR_PRH75-9.6, que presentó el fenotipo más extremo de la primera clase fenotípica y que es el característico de mutantes de pérdida de función en genes que codifican FBR o PR, con hojas muy apuntadas y margen dentado. Este fenotipo también recuerda a las plantas mutantes *athr7/prh75* anteriormente descritas, que son portadoras de alelos de pérdida de función de *PRH75* (Figura 3, página 6).

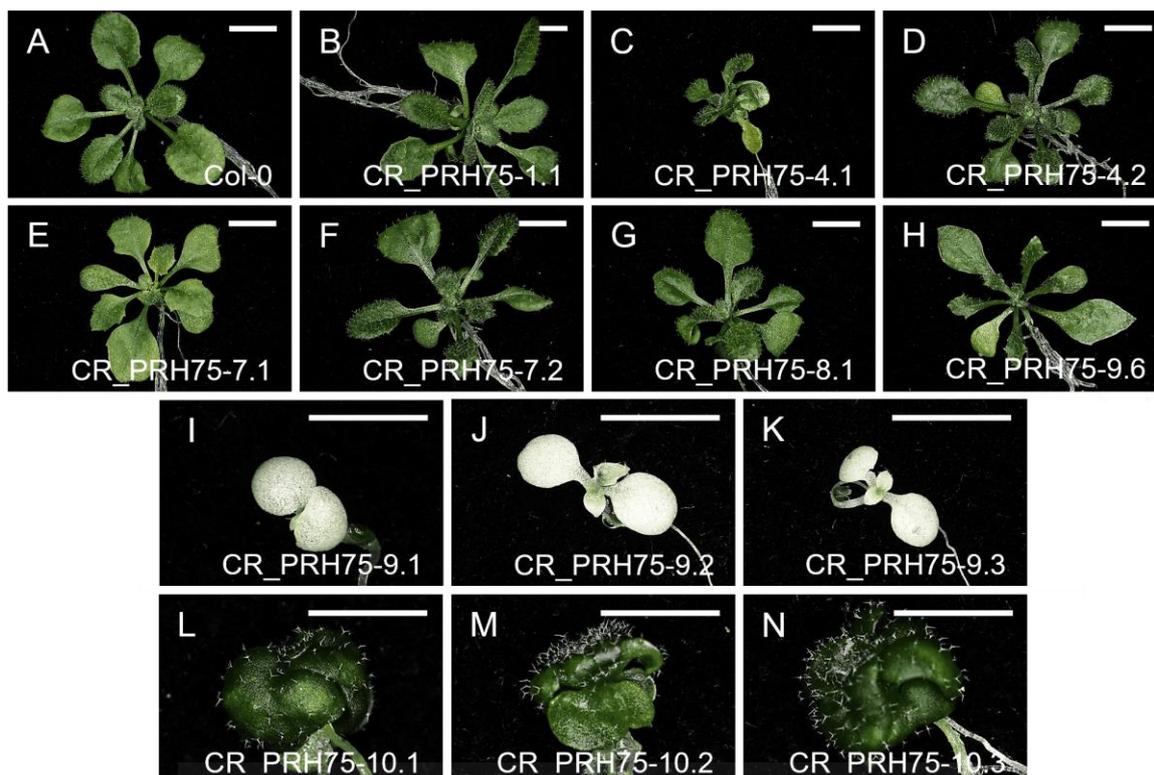


Figura 14.- Rosetas de las plantas CR_PRH75 provenientes de semillas rojas T₂. Rosetas de (A) Col-0 y de plantas CR_PRH75 en la que se pueden establecer tres clases fenotípicas: Plantas con hojas más o menos apuntadas y márgenes dentados (B-H), albinas (I-K) y compactas (L-N). Las fotografías se tomaron 21 dde. Las barras de escala indican 1mm.

Dado que los fenotipos de roseta compacta o albina no son característicos de mutantes en genes que codifican FBR o PR, es probable que la inserción del ADN-T proveniente del vector que se empleó en la transformación haya interrumpido en las dos plantas T₁ de las que proceden, un gen no relacionado con la traducción. En el caso de las plantas compactas, podría ser un gen implicado en la síntesis o percepción de brasinosteroides, una hormona vegetal cuya ausencia o insensibilidad produce ese fenotipo compacto y enano. En el caso de las plantas albinas, probablemente el ADN-T interrumpe un gen cuyo producto actúa directa o indirectamente en la síntesis de clorofilas. En las plantas T₁ la inserción de ADN-T estaría en hemigocosis y pasaría en algunos individuos a estar en homocigosis como resultado de su autofecundación. Esto podría explicar que los parentales de todas estas plantas no tuvieran estos fenotipos (Figura 8, página 21) ya que la inserción tendría un efecto recesivo y el de la planta CR_PRH75-9.6, que tendría el ADN-T en hemigocosis, como su parental. Esta hipótesis se podría verificar mediante el estudio de la segregación del transgén en la progenie de estas plantas o secuenciando masivamente su ADN genómico. Sin embargo, se descartó realizar estos experimentos al no ser el objetivo de este TFG, ni del laboratorio.

Se extrajo el ADN genómico de hojas de todas las plantas, se amplificaron las respectivas regiones diana de la edición, se secuenciaron por el método de Sanger y se analizaron las secuencias con el programa ICE, tal como se había hecho previamente.

No pudimos obtener buenos resultados en el caso de las plantas T₂ provenientes de semillas rojas de CR_POL5. Todas las secuencias de las plantas CR_POL5 resultaron ser silvestres, excepto las de CR_POL5-3.1 y CR_POL5-3.2, de las cuales no pudimos extraer conclusiones debido a la mala calidad de sus secuencias. En experimentos futuros habrá que repetir la secuenciación con el fin de determinar si están editadas o no. Además, la planta CR_POL5-7.1 que mostró un fenotipo claramente mutante, tampoco pudo ser leída por el programa ICE.

Durante el análisis de las secuencias de las plantas CR_POL5, que resultaron ser silvestres según ICE, el programa mostró de nuevo el mensaje de error que sugeriría la necesidad de reposicionar la guía CRISPR, indicando que podría estar mal posicionada en relación con los sitios de corte esperados. Este aviso, que aún no entendemos completamente, podría explicar la ausencia de ediciones detectables en las muestras de las plantas T₁ y T₂ con fenotipos muy severos, cuando analizamos la región diana.

En cuanto a las plantas CR_PRH75, decidimos secuenciar el ADN de las plantas albinas en su conjunto ya que teníamos poco material de partida, pero no fue suficiente para obtener una banda en la amplificación por PCR. En cuanto a las plantas con fenotipo de roseta compacta, y por la falta de material y la similitud de su fenotipo, decidimos secuenciar únicamente una de ellas, la planta CR_PRH75-10.3, y el resto conservarlo para su futura extracción de ARN.

De las plantas que sí se pudieron analizar con ICE, los individuos CR_PRH75-4.1 y CR_PRH75-4.2 presentaron electroferogramas de baja calidad. Por esta razón, no están representadas en la Figura 15 de la página 31 ya que ICE no puede procesar datos de baja calidad, y por tanto no pudo leerlas.

Las plantas de CR_PRH75 que no mostraron errores en el análisis de sus secuencias, mostraron una clara edición de la región candidata. En algunos casos, se observaron deleciones amplias, aunque con baja frecuencia en el conjunto de las ediciones (Figura 15, página 31). CR_PRH75-1.1, CR_PRH75-7.1, CR_PRH75-8.1 y CR_PRH75-10.3 parecen estar editadas en alguno de los dos motivos de interés por lo que se utilizarán en un futuro para cuantificar los niveles de expresión del gen *PRH75*, mediante retrotranscripción de su ARN (RT) y amplificación por PCR a tiempo real (RT-qPCR). De esta forma, se podría establecer si las ediciones detectadas tendrían un efecto transcripcional (Figura 15, página 31).

De igual forma, seleccionamos al individuo CR_PRH75-9.6 para extraer su ARN, aunque no presentó ediciones en ninguno de los motivos estudiados. Esto se debió a que mostró modificaciones en otras regiones que quizás sean importantes y, además, presentó el fenotipo mutante más aberrante de la primera clase fenotípica.





VI.- DISCUSIÓN

VI.- DISCUSIÓN

En este TFG se ha dado inicio al estudio de los motivos UP2ATMSD (AAACCCTA) y TELOBOXATEEF1AA1 (AAACCCTAA), presentes en el líder de los genes *POL5* y *PRH75*, implicados en la biogénesis de ribosomas en *Arabidopsis*. Estos motivos, no estudiados anteriormente, pueden ser relevantes para la función de los genes en los que se encuentran, o carecer de función. Sin embargo, dado que están conservados en muchos FBR y PR, es probable que tengan alguna función reguladora relevante para su transcripción o traducción. Si estos motivos afectan la expresión de genes clave, se podrán desarrollar en un futuro estrategias para manipularlos y obtener plantas con ribosomas más eficaces, por ejemplo.

El sistema CRISPR-Cas9 demostró ser eficaz en la generación de mutaciones en las plantas T_1 transformadas. Prueba de ello son los fenotipos característicos de mutantes en genes que codifican FBR o PR observados en CR_POL5-1 y CR_POL5-5 en mayor medida, pero también se obtuvieron fenotipos en CR_POL5-8 y en las plantas de CR_PRH75. En estas últimas, los fenotipos fueron menos extremos debido, probablemente a que PRH75 juega un papel menos importante en la biogénesis de ribosomas. Sin embargo, la ausencia de ediciones en las secuencias diana en esta primera generación, plantea dudas acerca de la precisión del corte de la hCas9 o en el diseño de las guías, ya que no obtuvimos ediciones en los motivos de las muestras de CR_POL5 ni en las de CR_PRH75, sino en regiones adyacentes a ellos, excepto para CR_PRH75-1 que presentó un alelo con una delección en uno de los motivos.

La elección de un nuevo electroferograma como control en las muestras de CR_POL5 fue necesaria debido a que el programa ICE no reconoció el sitio de corte de la hCas9 en el electroferograma de Col-0 y debido a que la calidad de su electroferograma no era la óptima. Por esta razón, elegimos a CR_POL5-1 como el nuevo control que mostró un electroferograma con picos simples y no presentó ediciones en la región amplificada. Esto es contradictorio con los fenotipos observados, ya que tanto CR_POL5-1 como CR_POL5-5 mostraron fenotipos mutantes sin presentar mutaciones. Concluimos que la explicación más probable es un error en la rotulación de estos tubos.

La transmisión de mutaciones a la generación T_2 fue muy escasa en plantas procedentes de las semillas marrones, en la que los transgenes CRISPR-Cas9 habían segregado. La ausencia de fenotipos mutantes en la progenie T_2 procedentes de semillas marrones, sugiere que las ediciones en las plantas T_1 no afectaron a la línea germinal. El único individuo que presentó fenotipo mutante en la segunda selección de semillas marrones fue CR_POL5-8, cuyo parental T_1 también presentó fenotipo mutante y edición, por lo que en este caso las mutaciones sí se pasaron a la línea germinal.

La siembra de semillas rojas resultó en fenotipos mutantes más evidentes, indicando la continuidad de la actividad de CRISPR-Cas9 y la posible introducción de nuevas mutaciones durante el desarrollo de las plantas T₂.

Los fenotipos inesperados, como rosetas compactas y plantas albinas, observados en las plantas CR_PRH75, podrían deberse a inserciones del ADN-T que interrumpieron genes no relacionados con la traducción, como aquellos implicados en la síntesis de brasinosteroides o clorofilas, como se comentó anteriormente.

En cuanto a los resultados de la secuenciación de las plantas T₂ proveniente de semillas rojas, solo obtuvimos resultados significativos de CR_PRH75. En las plantas CR_POL5 T₂, el programa ICE sugirió la necesidad de reposicionar la guía CRISPR, indicando que podría estar mal posicionada en relación con los sitios de corte esperados, aspecto que tendremos que investigar.





VII.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

VII.- CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

En este TFG se ha contribuido al estudio funcional de dos motivos conservados en la región líder de los genes *POL5* y *PRH75*, que codifican FBR en *Arabidopsis thaliana*.

Hemos analizado las ediciones producidas en 19 plantas T_1 portadoras de los transgenes CRISPR-Cas, diseñados para editar los motivos. Los fenotipos obtenidos incluyeron características típicas de mutantes en genes que codifican FBR o PR, destacando entre los más extremos los de las plantas CR_POL5-1 y R_POL5-5.

Para el análisis de la segunda generación, se seleccionaron semillas T_2 marrones y rojas utilizando el gen *DsRed* como marcador alternativo a los marcadores de resistencia a antibióticos. En las dos ocasiones en que seleccionamos semillas marrones, no obtuvimos plantas con fenotipo mutante, salvo en la planta CR_POL5-8.1 que provenía de la planta CR_POL5-8 que también tenía un fenotipo mutante severo y un porcentaje de edición mayor del 20%. Estos resultados indican que casi la totalidad de las mutaciones que encontramos en algunas de las plantas T_1 no trascendieron a la línea germinal.

Decidimos sembrar semillas rojas T_2 para intentar obtener plantas con los fenotipos inequívocamente mutantes observados en las plantas T_1 , y que no se obtuvieron con la selección de semillas T_2 marrones. Este enfoque resultó en la identificación de dos plantas T_2 de CR_POL5 y siete de CR_PRH75 con fenotipos mutantes muy aberrantes. En el caso de CR_PRH75, pudimos establecer tres clases fenotípicas, dos de ellas probablemente no relacionadas con la edición del líder de *PRH75* y que podrían estar causadas por la interrupción de genes involucrados en la síntesis de clorofila, en el caso de las plantas albinas que encontramos y en la producción de brasinosteroides, una hormona vegetal cuya ausencia produce el fenotipo de rosetas compactas y enanas que detectamos en otra familia.

En la edición de *PRH75* identificamos seis individuos que mostraron ediciones en alguno de los motivos conservados y que, además, tenían un fenotipo mutante que recordaba a los mutantes *athr7/prh75* citados en esta memoria. En un futuro, se recogerá tejido de varios órganos de estas plantas para extraer ARN y realizar análisis mediante la técnica de la RT-qPCR. Si se observa que los niveles de ARN mensajero están alterados, se concluiría en principio, que la edición de los motivos tiene un efecto transcripcional y que, por tanto, los motivos están implicados en el control transcripcional de la expresión génica. Sin embargo, no cabe excluir que las mutaciones en esta región impacten en la estabilidad del ARNm, ya que se encuentran en la región líder y no promotora.

Respecto a la ausencia de ediciones detectables en las plantas CR_POL5, aún no comprendemos la causa. Proponemos realizar una secuenciación completa del genoma para investigar posibles explicaciones. También, se analizarán las posiciones de las ARN guías

respecto a los sitios de corte y si están mal posicionadas, reposicionarlas. Esto es necesario ya que el programa ICE mostró repetidamente mensajes de error que sugerían la necesidad de reposicionar las guías.

El objetivo final que se persigue es obtener semillas marrones en las que las mutaciones se hayan estabilizado y que sean alelos homocigóticos mutantes ya que permitiría una interpretación más clara de la función de los motivos eliminados. Para esto, se recolectarán todas las semillas T₃ de plantas T₂ provenientes de semillas rojas con alelos mutantes de interés y se seleccionarán únicamente las marrones. Se sembrarán las semillas marrones y se analizará el genotipo de las plantas resultantes. Aquellas que presenten un fenotipo similar al de su parental, se dejarán que se autofecunden y se recolectarán las semillas. Se seleccionarán aquellas que sólo generen semillas marrones que serán aquellas en las que haya segregado los transgenes CRISPR-Cas9 y, por tanto, tendrán un genotipo estable.

Sería de gran interés poder discernir si las secuencias a estudio regulaban la transcripción o la traducción de los genes *POL5* y *PRH75*. Para responder a esta pregunta, se deberían editar los motivos en plantas portadoras de los transgenes *POL5_{pro}:POL5:GFP* y *PRH75_{pro}:PRH75:GFP*, que se han obtenido en el laboratorio para visualizar la localización subcelular de las respectivas proteínas. Para ello se transferirían a estas plantas los transgenes necesarios para la edición, estos son, los productores de los ARN guía y de la endonucleasa hCas9. El razonamiento que subyace en esta propuesta es, que si el efecto es transcripcional se observarían cambios en los niveles de los ARNm quiméricos *POL5-GFP* y *PRH75-GFP*, que se podría cuantificar mediante la técnica de RT-qPCR, utilizando una pareja de cebadores para amplificar el gen de la GFP. Si la edición de los elementos tiene un efecto traduccional, los niveles de ARNm no se alterarían, pero sí la intensidad de la fluorescencia procedente de la GFP, que sería cuantificable tras su observación en un microscopio confocal. Esta aproximación tiene limitaciones, ya que no podríamos establecer si la vida media del ARNm editado es diferente a la del silvestre, ya que la técnica de la RT-qPCR cuantifica el ARNm total, que sería el resultado de la transcripción menos la degradación.



VI.- BIBLIOGRAFÍA

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

- Bao, A., Burritt, D.J., Chen, H., Zhou, X., Cao, D., y Tran, L.P. (2019). The CRISPR/Cas9 system and its applications in crop genome editing. *Crit Rev Biotechnol* **39**, 321-336.
- Braun, C.M., Hackert, P., Schmid, C.E., Bohnsack, M.T., Bohnsack, K.E., y Perez-Fernandez, J. (2020). Pol5 is required for recycling of small subunit biogenesis factors and for formation of the peptide exit tunnel of the large ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res* **48**, 405-420.
- Charpentier, E., y Marraffini, L.A. (2014). Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering. *Curr Opin Microbiol* **19**, 114-119.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., y Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**, 19-21.
- Dörner, K., Ruggeri, C., Zemp, I., y Kutay, U. (2023). Ribosome biogenesis factors-from names to functions. *Embo j* **42**, e112699.
- Gaspin, C., Rami, J.F., y Lescure, B. (2010). Distribution of short interstitial telomere motifs in two plant genomes: putative origin and function. *BMC Plant Biol* **10**, 283.
- Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Zeyland, J., y Słomski, R. (2017). CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **65**, 233-240.
- Hsiau, T., Conant, D., Rossi, N., Maures, T., Waite, K., Yang, J., Joshi, S., Kelso, R., Holden, K., Enzmann, B.L., y Stoner, R. (2019).
- Huang, C.-K., Shen, Y.-L., Huang, L.-F., Wu, S.-J., Yeh, C.-H., y Lu, C.-A. (2015). The DEAD-Box RNA Helicase AtRH7/PRH75 Participates in Pre-rRNA Processing, Plant Development and Cold Tolerance in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **57**, 174-191.
- Jiang, F., y Doudna, J.A. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys* **46**, 505-529.
- Kranz, A.R., y Kirchheim, B. (1987). Genetic resources in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service* **24**.
- Lillo, J.Z. (2023). Establecimiento de la localización subcelular de POL5, UTP18, PRH75 y RRP36 de *Arabidopsis thaliana*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Lino, C.A., Harper, J.C., Carney, J.P., y Timlin, J.A. (2018). Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv* **25**, 1234-1257.
- Liu, Y., Tabata, D., y Imai, R. (2016). A Cold-Inducible DEAD-Box RNA Helicase from Arabidopsis thaliana Regulates Plant Growth and Development under Low Temperature. *PLoS One* **11**, e0154040.
- Medina, M.A.M. (2023). Una contribución a la mejora en la edición CRISPR/Cas9 y la selección de plantas editadas en *Arabidopsis thaliana*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Miao, W., Porter, D.F., Lopez-Pajares, V., Siphshvili, Z., Meyers, R.M., Bai, Y., Nguyen, D.T., Ko, L.A., Zarnegar, B.J., Ferguson, I.D., Mills, M.M., Jilly-Rehak, C.E., Wu, C.G., Yang, Y.Y., Meyers, J.M., Hong, A.W., Reynolds, D.L., Ramanathan, M., Tao, S., Jiang, S., Flynn, R.A., Wang, Y., Nolan, G.P., y Khavari, P.A. (2023). Glucose dissociates DDX21 dimers to regulate mRNA splicing and tissue differentiation. *Cell* **186**, 80-97.e26.
- Mohannath, G., Pontvianne, F., y Pikaard, C.S. (2016). Selective nucleolus organizer inactivation in Arabidopsis is a chromosome position-effect phenomenon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 13426-13431.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., y Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-273.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Pruett-Miller, S.M. (2015). Preface. Chromosomal mutagenesis. *Methods Mol Biol* **1239**, vii-ix.
- Ramos-Sáenz, A., González-Álvarez, D., Rodríguez-Galán, O., Rodríguez-Gil, A., Gaspar, S.G., Villalobo, E., Dosil, M., y de la Cruz, J. (2019). Pol5 is an essential ribosome biogenesis factor required for 60S ribosomal subunit maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna* **25**, 1561-1575.
- Sáez-Vásquez, J., y Delseny, M. (2019). Ribosome Biogenesis in Plants: From Functional 45S Ribosomal DNA Organization to Ribosome Assembly Factors. *Plant Cell* **31**, 1945-1967.

- Shimizu, K., Kawasaki, Y., Hiraga, S., Tawaramoto, M., Nakashima, N., y Sugino, A. (2002). The fifth essential DNA polymerase phi in *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the nucleolus and plays an important role in synthesis of rRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9133-9138.
- Soltanieh, S., Lapensée, M., y Dragon, F. (2014). Nucleolar proteins Bfr2 and Enp2 interact with DEAD-box RNA helicase Dbp4 in two different complexes. *Nucleic Acids Res* **42**, 3194-3206.
- Tan, B.C., Yang, C.C., Hsieh, C.L., Chou, Y.H., Zhong, C.Z., Yung, B.Y., y Liu, H. (2012). Epigenetic silencing of ribosomal RNA genes by Mybbp1a. *J Biomed Sci* **19**, 57.
- Weterings, E., y Chen, D.J. (2008). The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res* **18**, 114-124.
- Woodward, A.W., y Bartel, B. (2018). Biology in Bloom: A Primer on the *Arabidopsis thaliana* Model System. *Genetics* **208**, 1337-1349.
- Yaschenko, A.E., Alonso, J.M., y Stepanova, A.N. (2024). *Arabidopsis* as a model for translational research. *Plant Cell*.

