



**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.

## 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*.