



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Desarrollo de nanoestructuras ramificadas programables a través del autoensamblaje de dsDNA y su recubrimiento con proteínas de diseño”.

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
Maestro en Ciencias**

PRESENTA

Eddie Guillermo Sánchez Rueda

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Armando Hernández García
Instituto de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Ismael Bustos Jaimes
Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Luis Marat Alvarez Salas

Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Enero 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Sánchez Rueda Eddie Guillermo
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 12 de agosto del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis **"Desarrollo de nanoestructuras ramificadas programables a través del autoensamblaje de dsDNA y su recubrimiento con proteínas de diseño"**, dirigida por el/la Dr(a). **Hernández García Armando**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Rodríguez Romero Adela
VOCAL	Torres Larios Alfredo
VOCAL	Fernández Velasco Daniel Alejandro
VOCAL	Zelada Guillén Gustavo Adolfo
SECRETARIO	Palomares Aguilera Laura Alicia

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 12 de agosto de 2019.
COORDINADORA



Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio de Ingeniería Biomolecular y Bionanotecnología del Instituto de Química de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Armando Hernández García.

El proyecto de investigación recibió financiamiento por parte del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM con clave IA201917. Al autor de este escrito se le otorgó una beca CONACYT para realizar sus estudios de Maestría, con No. de Becario 631125 y No. de CVU 855699. Además, el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM otorgó un apoyo económico para una presentación en el XXXII Congreso Nacional de Bioquímica.

Este proyecto se hizo acreedor al Premio a la Innovación en Bionano Ciencia y Tecnología 2019, otorgado por el Cinvestav y Grupo Neolpharma.

Los resultados de esta tesis fueron publicados en la revista **Nanoscale**, con DOI: 10.1039/c9nr05225a.

Esta tesis está dedicada a mi madre y a mi padre. Gracias por confiar y apoyarme en todos mis proyectos. Gracias por estar a mi lado en los momentos de felicidad, frustración e incertidumbre.

Los amo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Armando Hernández García por su guía durante mis estudios de maestría. Has sido un excelente mentor y me has ayudado a seguir descubriendo mi vocación científica.

Gracias al Dr. Ismael Bustos Jaimes y al Dr. Luis Marat Alvarez Salas por todos sus consejos y correcciones durante las evaluaciones tutorales. Un agradecimiento especial al Dr. Luis por su disposición para trasladarse hasta Ciudad Universitaria.

A los miembros del Jurado: Dra. Adela Rodríguez Romero, Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera, Dr. Alfredo Torres Larios, Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco y Dr. Gustavo Adolfo Zelada Guillén, por la atenta revisión de esta tesis. Sus comentarios fueron de gran ayuda para enriquecer este escrito.

Gracias al CONACYT y al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para realizar mis estudios de maestría.

Al LANEM-IQ-UNAM por las facilidades otorgadas para el uso del Microscopio de Fuerza Atómica.

Madre y Padre, estoy en deuda infinita con ustedes por toda la ayuda incondicional y la confianza brindada para poder continuar con mis objetivos profesionales y personales.

A todos los integrantes del laboratorio de Bionano, gracias por los momentos que compartimos juntos, por los consejos, las observaciones y las bromas. Me llevo un poco de cada uno de ustedes en mi persona.

A la UNAM, por permitirme formar parte de su comunidad de estudiantes y darme las mejores herramientas para crecer en el ámbito científico, profesional y personal.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
NOMENCLATURA.....	xi
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	xiv
I. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES.....	1
Generalidades de la Nanotecnología.....	1
Bionanotecnología	3
Generalidades del DNA.....	5
Nanotecnología del DNA.....	8
Moléculas y nanoestructuras ramificadas.....	11
Polímeros ramificados.....	11
Nanoestructuras ramificadas de DNA.....	13
Estabilidad de las nanoestructuras de DNA.....	14
Rigidización y estabilización de las nanoestructuras de DNA mediante recubrimiento proteico.....	16
Otras estrategias para estabilizar nanoestructuras de DNA.....	19
II. JUSTIFICACIÓN.....	24
III. HIPÓTESIS.....	26
IV. OBJETIVO GENERAL.....	26
V. OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
Materiales y reactivos.....	27
Diseño de nanoestructuras ramificadas.....	28
Preparación de las nanoestructuras ramificadas de DNA.....	32
Evaluación del ensamblaje de las nanoestructuras de DNA.....	34
Purificación de las nanoestructuras ramificadas.....	35
Evaluación de la interacción entre las proteínas y las nanoestructuras de DNA.....	36
Caracterización de las nanoestructuras mediante microscopía de fuerza atómica.....	38
Evaluación de la estabilidad térmica.....	38
Evaluación de la resistencia a DNAsa I.....	38

Planteamiento de futuras construcciones.....	39
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
Evaluación de la formación de la estructura central CLS empleando las diferentes rampas de enfriamiento.....	40
Producción de dsDNA.....	43
Evaluación de la interacción de la estructura central CLS con dsDNA de 722 pb.....	44
Formación de nanoestructuras ramificadas con los ensamblados CLS y los fragmentos de dsDNA de cuatro tamaños distintos.....	46
Formación de nanoestructuras ramificadas mediante la interacción entre dsDNA biotinilado y estreptavidina.....	47
Caracterización de las nanoestructuras mediante microscopía de fuerza atómica.....	50
Efecto de técnicas purificación sobre la estabilidad de las nanoestructuras ramificadas.....	53
Evaluación de la interacción entre las proteínas y las nanoestructuras de DNA.....	56
Caracterización de las nanoestructuras recubiertas con proteínas mediante microscopía de fuerza atómica.....	60
Evaluación de la estabilidad térmica de las nanoestructuras.....	66
Evaluación de la resistencia a DNasa I.....	71
Planteamiento de futuras construcciones	74
VIII. CONCLUSIONES.....	77
IX. PERSPECTIVAS.....	78
X. BIBLIOGRAFÍA.....	80
ANEXOS.....	90
Secuencias de las proteínas.....	90
Secuencia del plásmido REDOX_switch_pMK-T.....	91
AFM de área 5 x 5 µm para nanoestructuras sin proteína.....	92
AFM de área 5 x 5 µm para nanoestructuras recubiertas con proteína.....	93
Distribuciones en número de las nanoestructuras de DNA.....	94
Distribuciones en número de las nanoestructuras incubadas a 37 y 50 °C...	95
Secuencias de oligonucleótidos complementarios a M13mp18.....	96
Publicación: Protein-coated dsDNA nanostars with high structural rigidity and high enzymatic and thermal stability.....	97
Premio a la Innovación en Bionano Ciencia y Tecnología 2019.....	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Comparación de las dimensiones de algunos nanomateriales con moléculas y objetos de distintos tamaños.....	1
Figura 1.2. Distintos nanomateriales orgánicos e inorgánicos.....	3
Figura 1.3. Estructura del ácido desoxirribonucleico.....	7
Figura 1.4. Estructuras ramificadas basadas en las uniones de Holliday.....	9
Figura 1.5. Dos estrategias para la rigidización de nanomateriales de DNA.....	10
Figura 1.6. DNA Origami.....	11
Figura 1.7. Polímeros tipo estrella.....	12
Figura 1.8. Nanoestructura ramificada con pequeñas extensiones, construida mediante hibridación de ssDNA.....	13
Figura 1.9. Representación del ensamblaje de nanoestructuras de DNA ramificadas, empleando biotina y estreptavidina.	14
Figura 1.10. Representación gráfica de la endocitosis de siRNAs hibridados con una unión de Holliday.....	14
Figura 1.11 Diseño de las proteínas con dominios de unión a ácidos nucleicos..	18
Figura 1.12. Caracterización mediante microscopía de fuerza atómica de la interacción de distintos tipos de DNA y las proteínas con bloques de unión.....	19
Figura 1.13. Diversas estrategias propician un incremento en la estabilidad de nanoestructuras de DNA.....	22
Figura 1.14. Modificaciones químicas en el esqueleto de los ácidos nucleicos permiten conferir mayor estabilidad a las nanoestructuras de DNA.....	23
Figura 6.1. Estructura general de los ensamblados de DNA.....	29
Figura 6.2. Esquema de la hibridación de las tres moléculas de ssDNA.	30
Figura 6.3. Obtención de moléculas de dsDNA con extremos cohesivos mediante PCR.	31
Figura 6.4. Estrategia de purificación empleando sacarosa al 30 %.....	36
Figura 6.5. Hibridación del ssDNA M13mp18 con oligonucleótidos complementarios.	39
Figura 7.1 Formación de ensamblados CLS a distintas proporciones molares..	42
Figura 7.2. Diversos amplicones, obtenidos mediante PCR, de la molécula de dsDNA de 722 pb.....	43
Figura 7.3. Electroforesis de los amplicones biotinilados de 732 pb, evaluados directamente de la reacción de PCR.....	43
Figura 7.4. Hibridación del oligo L con las moléculas de dsDNA con distintos extremos cohesivos complementarios.....	44
Figura 7.5. Formación de nanoestructuras ramificadas por hibridación con dsDNA de 722 pb.....	45
Figura 7.6. Comparación en la formación de nanoestructuras ramificadas por hibridación a distintas proporciones molares.....	46
Figura 7.7. Formación de nanoestructuras con ramificaciones de distintas longitudes mediante hibridación con el núcleo central CLS.....	47
Figura 7.8. Formación de nanoestructuras con distintas proporciones de estreptavidina y dsDNA biotinilado de 732 pb.....	49
Figura 7.9. Formación de nanoestructuras ramificadas con dsDNA biotinilado de distintas longitudes.....	49

Figura 7.10. AFM de las nanoestructuras obtenidas por hibridación con CLS.....	50
Figura 7.11. Corte en eje Z de una nanoestructura ramificada obtenida mediante hibridación del núcleo CLS y dsDNA de 722 pb	51
Figura 7.12. AFM de las nanoestructuras obtenidas mediante interacción entre estreptavidina y dsDNA biotinilado.....	52
Figura 7.13. Corte en eje Z de una nanoestructura ramificada obtenida mediante interacción con estreptavidina.....	52
Figura 7.14. Acercamientos de las micrografías de AFM para las nanoestructuras obtenidas por ambas estrategias.....	53
Figura 7.15. Efecto de la purificación por métodos electroforéticos.....	54
Figura 7.16. EMSA de nanoestructuras obtenidas por hibridación con CLS.....	58
Figura 7.17. EMSA de nanoestructuras obtenidas por interacción biotina-estreptavidina.....	59
Figura 7.18. Comparación mediante AFM de las nanoestructuras obtenidas por hibridación con CLS y recubiertas con las proteínas de diseño.....	61
Figura 7.19. Comparación mediante AFM de las nanoestructuras obtenidas por interacción con estreptavidina y recubiertas con las proteínas de diseño.....	61
Figura 7.20. Corte en el eje Z de las nanoestructuras obtenidas por hibridación entre CLS y dsDNA de 367 pb.....	62
Figura 7.21. AFM de las nanoestructuras recubiertas con C8-B ^{Sso7d}	63
Figura 7.22. Acercamientos de las micrografías de las nanoestructuras recubiertas con C8-B ^{Sso7d}	64
Figura 7.23. Distribuciones en masa de las nanoestructuras.....	66
Figura. 7.24. AFM de las nanoestructuras CLS con ramificaciones de 367 pb incubadas a 37 °C durante distintos periodos de tiempo.....	67
Figura. 7.25. AFM de las nanoestructuras CLS con ramificaciones de 367 pb incubadas a 50 °C durante distintos periodos de tiempo.....	68
Figura. 7.26. AFM de las nanoestructuras de estreptavidina con dsDNA biotinilado de 368 pb incubadas a 37 °C durante distintos periodos de tiempo....	69
Figura. 7.27. AFM de las nanoestructuras de estreptavidina con dsDNA biotinilado de 368 pb incubadas a 50 °C durante distintos periodos de tiempo...	69
Figura 7.28. Distribuciones en masa de las nanoestructuras CLS con dsDNA de 367 pb incubadas durante distintos periodos de tiempo.....	70
Figura 7.29. Evaluación de la resistencia de las nanoestructuras ante DNAsa I.	72
Figura. 7.30. AFM de las nanoestructuras CLS con ramificaciones de 367 pb incubadas con DNAsa I durante distintos periodos de tiempo.....	73
Figura 7.31. Estrategia para diseñar futuras construcciones.....	74
Figura 7.32. Evaluación electroforética de la hibridación entre oligonucleótidos y la hibridación con el ssDNA circular M13mp18.....	75
Figura 7.33. AFM del DNA circular M13mp18 y de la nanoestructura formada por la unión de dos moléculas de M13mp18.	76
Figura C. AFM de nanoestructuras obtenidas por hibridación con CLS y dsDNA (5 x 5 µm)	92
Figura D1. AFM de nanoestructuras recubiertas con C ₄ B ^{K12} (5 x 5 µm).....	93
Figura D2. AFM de nanoestructuras recubiertas con C ₄ S ₁₀ B ^{K12} (5 x 5 µm).....	93
Figura D3. AFM de nanoestructuras recubiertas con C8-B ^{Sso7d} (5 x 5 µm).....	93
Figura E. Distribuciones en número de las nanoestructuras.....	94

Figura F. Distribuciones en número de las nanoestructuras CLS con dsDNA de 367 pb incubadas durante distintos periodos de tiempo.....	95
---	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 6.1. Secuencias de los oligonucleótidos del núcleo central.....	29
Tabla 6.2. Secuencias de los cebadores utilizados para la obtención de las moléculas de dsDNA con extremos complementarios al núcleo CLS.....	31
Tabla 6.3. Secuencias de los cebadores utilizados para la obtención de moléculas de dsDNA biotiniladas.....	32
Tabla 6.4. Programación del ciclo de PCR para la amplificación de dsDNA.	32
Tabla 6.5. Diferentes rampas de enfriamiento empleadas para la síntesis del núcleo central CLS.....	33
Tabla 7.1. Valores de neutralización (proteína/pb).....	60
Tabla 7.2. Altura promedio (eje Z) de las moléculas de dsDNA.....	62

NOMENCLATURA

AFM	Microscopía de fuerza atómica.
CLS	Hibridación entre tres oligonucleótidos denominados C, L y S.
DLS	Dispersión dinámica de luz
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DNA-PAINT	Microscopía de súper-resolución que emplea ácido desoxirribonucleico para la obtención de imágenes topográficas a nanoescala.
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena.
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
N/P	Relación entre el I número de grupos amino de las lisinas de una proteína y el número de grupos fosfato presentes en una molécula de ácido desoxirribonucleico.
Oh _x	Hace referencia a un extremo cohesivo, donde x es el número de nucleótidos que lo conforman.
Pb	Pares de pases
pDNA	DNA plasmídico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PEG	Polietilenglicol.
pH	Medida de acidez o alcalinidad de una solución.
Prtn/pb	Relación de moléculas de proteína por par de bases de ácido desoxirribonucleico.
RNA	Ácido ribonucleico
Sp:	Molécula de trietilenglicol presente en un cebador para formar un espacio entre nucleótidos.
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla.
TA	Temperatura ambiente.
TAE	Amortiguador preparado con Tris, ácido acético y ácido etilendiaminotetraacético
TAE-Mg	Amortiguador preparado con Tris, ácido acético, ácido etilendiaminotetraacético y cloruro de magnesio.
TBE	Amortiguador preparado con Tris, borato y ácido etilendiaminotetraacético.

RESUMEN

El uso del DNA como unidad de construcción de nanomateriales tiene sus inicios en la década de 1980, cuando Nadrian Seeman propuso aprovechar el conocimiento que se tenía sobre la organización de esta biomolécula para programar la hibridación de los nucleótidos, de tal manera que se obtuvieran estructuras con diversas conformaciones bidimensionales y tridimensionales, que fueran más allá de las configuraciones vistas en la naturaleza.

Con base en los fundamentos generados por diseños anteriores, en esta tesis se lograron obtener nanoestructuras ramificadas empleando dsDNA. La estrategia se basa en la obtención de un constructo ramificado formado por la hibridación de tres oligonucleótidos de cadena sencilla. A continuación, se incrementó la longitud de las ramificaciones del constructo mediante la hibridación de cada una de éstas con moléculas de dsDNA con tamaños de varios cientos de pares de bases. A su vez, la formación de las nanoestructuras se comparó con un segundo método, previamente reportado, que emplea dsDNA biotinilado, aprovechando la alta afinidad de este ligando por la estreptavidina.

Es sabido que las nanoestructuras de DNA carecen de rigidez suficiente para formar nanoestructuras de gran tamaño, lo cual dificulta la preservación de una conformación específica. Para sortear este obstáculo, los constructos de ácidos nucleicos fueron recubiertos con tres diferentes proteínas que poseen dominios de unión al DNA, diseñadas y expresadas previamente (Hernandez-Garcia *et al.*, 2012; 2014; 2017). Estas han sido denominadas C₄-B^{K12}, C₄-S₁₀-B^{K12} y C₈-B^{Sso7d}, donde C hace referencia a un bloque de estabilidad coloidal, es decir, que confiere solubilidad, evitando agregaciones, con una secuencia derivada de la colágena; B denota el bloque de unión formado por lisinas (K₁₂) o por la proteína Sso7d; y S corresponde a un bloque de autoensamblaje.

Se obtuvieron nanoestructuras con un número de hasta seis ramificaciones, de 4 longitudes distintas, verificando su ensamblaje a través de una serie de análisis electroforéticos y mediante estudios de molécula única usando microscopía de

fuerza atómica (AFM). Las caracterizaciones mediante AFM demostraron que la proteína C₈-B^{Sso7d} es la mejor candidata para rigidizar y conservar la arquitectura ramificada del DNA. Adicionalmente, esta proteína preservó la integridad de las ramificaciones a temperaturas de 37 °C y 50 °C, y las protegió de la degradación por DNAsa I, en ambos casos por varias horas.

De esta forma, se logró diseñar una novedosa estrategia para programar el número de ramificaciones y las dimensiones de nanoestructuras de DNA, así como para estabilizar su arquitectura. Lo anterior abre la puerta a futuras aplicaciones, como el transporte de moléculas con actividad biológica, aprovechando la multivalencia conferida por la organización ramificada.

INTRODUCCIÓN

En décadas recientes ha tenido lugar una amplia investigación enfocada al diseño, síntesis, caracterización, producción y aplicación de materiales, estructuras y sistemas mediante el control del tamaño y la forma a escala nanométrica (entre 1×10^{-9} y 1×10^{-7} m), dando lugar al desarrollo de la nanotecnología (Sharon *et al.*, 2012). En términos generales, la nanotecnología incluye muchas estructuras y técnicas a una escala inferior a los 100 nm en al menos una de sus dimensiones (Oropesa y Jáuregui, 2012). La construcción de estos nuevos materiales se ha realizado a partir de una gran variedad de compuestos y elementos orgánicos e inorgánicos, con propiedades metálicas, cristalinas, poliméricas o cerámicas; y con aplicaciones en prácticamente todos los sectores productivos, como la electrónica, farmacéutica, cosmética y agricultura.

Los nanomateriales son un estado intermedio o de transición entre las moléculas y los materiales a microescala. Mientras que un material en el orden micrométrico aún presenta propiedades similares a las de un sólido volumétrico, en los nanomateriales, debido a su escala se modifican sus propiedades que, difieren del mismo material con dimensiones de mayor escala (Gutiérrez-Wing, 2005). Entre estas variaciones de las propiedades se encuentran cambios en el punto de fusión o en las propiedades ópticas, e incluso incrementos en la conductividad eléctrica, elasticidad, resistencia y reactividad (Khan *et al.*, 2019). Es por esto que diversos grupos de investigación y compañías a nivel internacional se han esforzado por evaluar una gran variedad de materiales, como las nanopartículas de hierro, oro y plata, los nanotubos de carbono, o nanopartículas poliméricas; con la intención de encontrar aplicaciones que superen aquellas ofrecidas por los materiales tradicionales.

Entre toda esta gran diversidad de unidades de construcción, también se ha buscado emplear biomoléculas para diseñar y construir nuevos nanomateriales, dando lugar a una rama conocida como bionanotecnología, que se puede definir como la manipulación de la materia biológica a escala nanométrica para construir

nuevas estructuras y sistemas biomoleculares, mediante la ingeniería de componentes biológicos ya existentes o el diseño de nuevos (Sharon *et al.*, 2012). De esta manera, se ha evaluado el uso de DNA, proteínas, carbohidratos, lípidos, e híbridos de éstos, para construir acarreadores, nanotubos, micelas o liposomas (Becerril y Woolley, 2008; Mashaghi *et al.*, 2013; Preateorius y Dietz, 2017).

El descubrimiento de la función que poseen los ácidos nucleicos como almacén y mensajeros de la información genética ha propiciado una revolución biotecnológica con un gran impacto en los sectores agropecuario, farmacéutico y alimentario; sobre todo gracias al desarrollo de las tecnologías del DNA recombinante. Sin embargo, han surgido grupos de investigación interesados en el aprovechamiento de estas biomoléculas para diseñar y construir nuevas estructuras en escala nanométrica, que ofrezcan ventajas sobre otros nanomateriales inorgánicos o poliméricos.

La construcción de nanoestructuras a partir de DNA fue propuesta por primera vez en la década de 1980 por Nadrian C. Seeman (Seeman, 1982) tomando en cuenta que la complementariedad Watson-Crick podría ser aprovechada para diseñar nuevas estructuras diferentes a las ya vistas en la naturaleza. Actualmente, se ha logrado obtener una gran variedad de materiales con diversas formas geométricas de dos y tres dimensiones, que se comportan de manera excepcional al poseer una alta capacidad de reconocimiento molecular, autoensamblaje y programabilidad, además de requerir procesos de síntesis sencillos (Seeman, 2010). El autoensamblaje, entendido como la organización espontánea y reversible de unidades moleculares en estructuras ordenadas, mediante interacciones no covalentes, es esencial para la obtención de estructuras a partir de biomoléculas; junto con la capacidad de programabilidad, que en el caso de las nanoestructuras de DNA se refiere a que la secuencia de las bases nitrogenadas ya contiene la información necesaria para dirigir el ensamblaje en una conformación específica (Jones, Seeman y Mirkin, 2015).

Sin embargo, existen limitaciones en las aplicaciones de estos constructos, debido en gran parte a que el DNA es muy flexible, lo cual dificulta la generación y

preservación de la morfología deseada, así como el alto costo de la síntesis de varios cientos o hasta miles de pequeños oligonucleótidos. Tomando en cuenta estos obstáculos, se ha decidido desarrollar un proyecto que tiene como objetivo diseñar y construir nanoestructuras ramificadas, empleando dsDNA obtenido mediante una reacción de PCR, y recubriéndolas con las proteínas denominadas C₄-B^{K12}, C₄-S₁₀-B^{K12} y C₈-B^{Sso7d}, las cuales han sido caracterizadas previamente (Hernández-García *et al.*, 2012; Hernández-García *et al.*, 2014; Hernández-García *et al.*, 2017) y han demostrado ser útiles para la obtención de Partículas Tipo Virus (VLPs). Las primeras dos comparten un bloque catiónico (B^{K12}), responsable de la interacción con el DNA, y un dominio de estabilidad coloidal (solubilidad). En la tercera, el dominio de unión (B^{Sso7d}) es específico para DNA y es derivado de una proteína encontrada en la arquea *Sulfolobus solfataricus*, denominada Sso7d, la cual tiene una función similar al de las histonas en eucariontes, compactando y estabilizando el DNA en las altas temperaturas en las que se desarrolla este organismo (75-80 °C) (Agback *et al.*, 1998; Edmondson y Shriver, 2001).

La interacción de las nanoestructuras con estas proteínas permitirá incrementar la rigidez del DNA y regular su organización ramificada, pues se reducirá la flexibilidad de las moléculas y por tanto los entrelazamientos no deseados entre las cadenas. Incluso, se podría controlar la interacción con otras moléculas, pues a las proteínas de diseño se les podrían incorporar otros nanomateriales o bloques funcionales adicionales (Hernández-García *et al.*, 2012).

Cabe destacar que la construcción de estructuras ramificadas a partir de DNA no es una simple curiosidad científica. Las estructuras con esta arquitectura poseen una mayor superficie de contacto que el DNA lineal; pero al mismo tiempo son más fáciles de construir que otros nanomateriales de DNA con estructuras tridimensionales, como esferas o cubos.

Previamente se han construido polímeros ramificados con la finalidad de aprovechar sus propiedades multivalentes. Sin embargo, su obtención se realiza mediante síntesis química, lo cual limita la longitud de las extensiones a unos cuantos nanómetros, y además propicia la formación de intermediarios (Aloorkar *et*

al., 2012; Wu *et al.*, 2015). En este proyecto se demostró la viabilidad del uso de dsDNA para programar con mayor facilidad el número de ramificaciones y sus dimensiones, siguiendo estrategias previamente establecidas en el campo de la nanotecnología del DNA. Asimismo, se constató que el recubrimiento proteico permite preservar la arquitectura ramificada, y le confiere estabilidad térmica y enzimática ante la actividad de DNAsas.

Las ramificaciones podrán ser funcionalizadas con moléculas de interés para la industria farmacéutica, o de imagenología (Lee y Kim, 2013), o bien, se podría utilizar estas estructuras como templados en la construcción de circuitos eléctricos de interés para el sector tecnológico (Dietz, 2015).

I. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

1.1. Generalidades de la Nanotecnología

El término “nanotecnología” fue acuñado en 1974 por Norio Taniguchi, un profesor de la “Tokyo Science University”; aunque la idea inicial fue introducida por Richard Feynman en 1959, durante su ponencia titulada “There’s plenty of Room at the Bottom”.

Al parecer, Taniguchi tomó el prefijo “nano” a partir de una palabra del griego, que significa “extremadamente pequeño” (Sharon *et al.*, 2012). Un nanómetro (nm) equivale a 10^{-9} m, lo cual quiere decir que un nanómetro es la mil millonésima parte de un metro. Por lo que, al hablar de alguna partícula que tiene dimensiones nanométricas nos estamos refiriendo a aquella que no es visible para la vista humana ni, incluso, empleando microscopios ópticos. La figura 1.1 permite dimensionar de mejor manera la escala en que se desarrolla la nanotecnología.

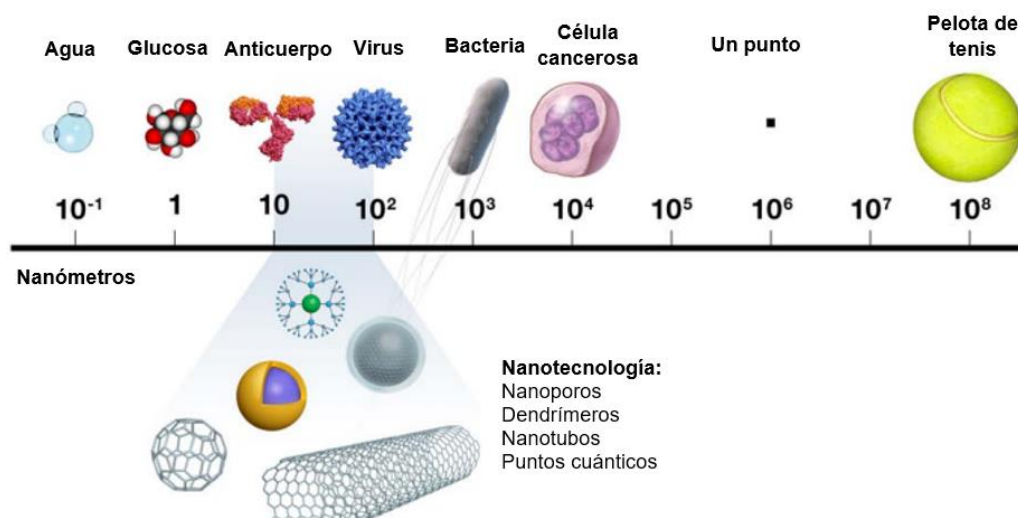


Figura 1.1. La nanotecnología busca diseñar, obtener y encontrar aplicaciones de materiales y sistemas con dimensiones en escala nanométrica. Esta figura permite comparar las dimensiones de algunos nanomateriales con moléculas y objetos de distintos tamaños (Imagen modificada del National Institute of Health, 2010).

Actualmente se entiende a la nanotecnología como “el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas mediante una manipulación controlada del tamaño y la forma a escala nanométrica, con la finalidad de obtener productos con al menos una característica o propiedad novedosa (Sharon *et al.*, 2012)”. En general, se acepta que la nanotecnología tiene una escala que va desde el tamaño de los átomos, hasta los 100 nm en una, dos o tres dimensiones, pues es en este rango que las propiedades de los materiales pueden ser diferentes a aquellos en la “macroescala”. A manera de comparación, un enlace carbono-carbono se encuentra en el rango de 0.12 a 0.15 nm, mientras que una molécula de DNA de doble cadena posee un diámetro aproximado de 2 nm (Krebs *et al.*, 2017).

Las nanopartículas son las unidades de construcción más básicas empleadas en nanotecnología, pues a partir de éstas se pueden construir nanoestructuras, nanomateriales y nanosistemas. Tales nanopartículas pueden ser definidas como “una partícula que posee una o más dimensiones con una longitud menor o igual a los 100 nm (Sharon *et al.*, 2012)”. Es así como a partir de éstas se ha logrado obtener estructuras como los nanotubos, nanoalambres, nanocristales, dendrímeros o fullerenos, con una gran diversidad de aplicaciones por descubrir, y con morfologías y arquitecturas específicas. La figura 1.2 ejemplifica algunos de los nanomateriales orgánicos e inorgánicos más explorados.

La morfología se puede entender como la estructura física de un material a nivel microscópico o submicroscópico (Costa, 2005). Las características morfológicas son evidentes a diferentes niveles de observación, desde los pequeños monocristales, hasta los grandes agregados cristalinos, y es así que se habla de nanomateriales con forma de esferas, cilindros, cristales, cubos o estrellas (Costa, 2005). Por su parte la arquitectura se refiere a la manera en que una construcción está dispuesta, diseñada, ordenada o construida (Rang *et al.*, 2008).

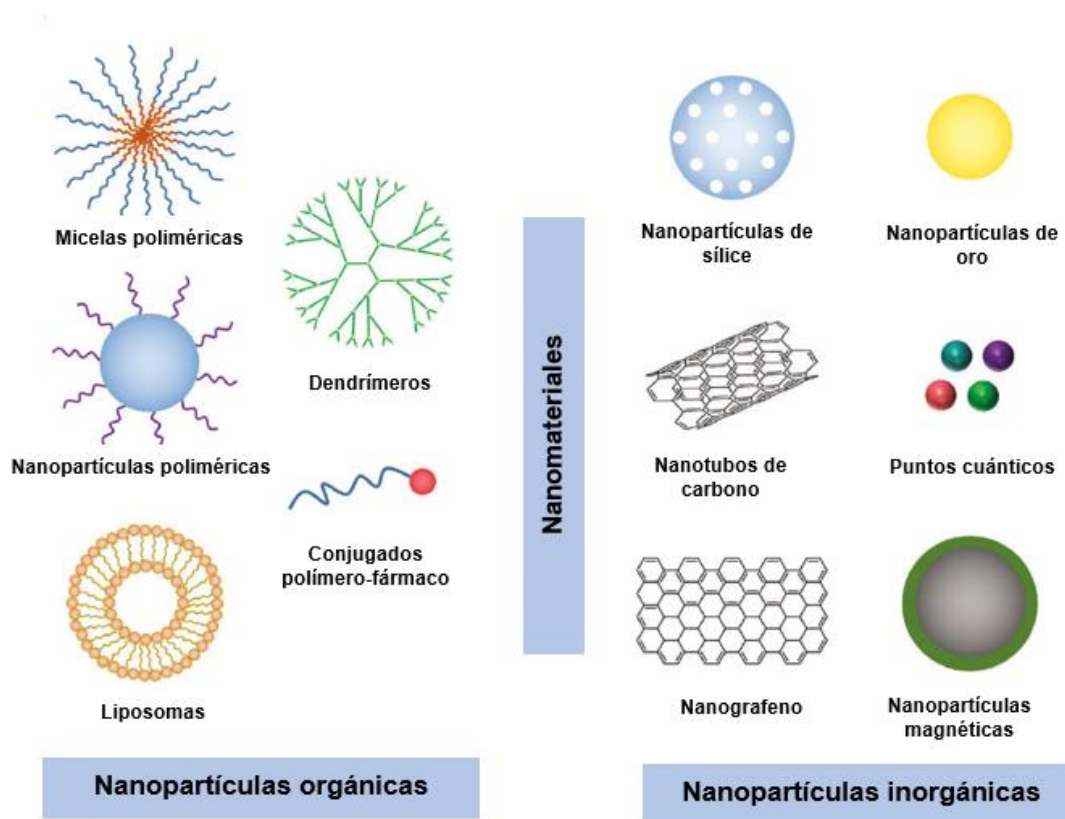


Figura 1.2. Distintos nanomateriales orgánicos e inorgánicos (Modificado de Zhou *et al.*, 2017).

Para obtener estos nanomateriales se han desarrollado diferentes metodologías que pueden ser agrupadas en dos enfoques diferentes. Uno es conocido como “bottom-up”, y consiste en la construcción de una nanoestructura átomo por átomo, molécula por molécula o clúster por clúster, para así organizarlos de forma homogénea. El segundo enfoque se conoce como “top-down”, y en éste un material a “macroescala” es utilizado para generar nanopartículas de tamaño y forma deseada, empleando molinos ultrafinos o láseres (Sharon *et al.*, 2012).

1.2. Bionanotecnología

Es de notar que la gran mayoría de los nanomateriales construidos a la fecha han sido desarrollados a partir de moléculas inorgánicas, polímeros o partículas metálicas. Sin embargo, también han surgido grupos de investigación interesados

en aprovechar biomoléculas para el desarrollo nanotecnológico, siguiendo el enfoque de construcción “bottom-up”, a partir de moléculas de carbohidratos, lípidos, proteínas o ácidos nucleicos; todo esto mediante la fusión de dos campos de investigación de enfoque interdisciplinario: la Biotecnología y la Nanotecnología.

La fusión de ambas disciplinas suele denominarse de forma indistinta como bionanotecnología o nanobiotecnología; sin embargo, resulta útil realizar una distinción entre ambos términos. La bionanotecnología puede ser entendida como la manipulación de la materia biológica a escala nanométrica para obtener materiales y dispositivos, es decir, emplear la biotecnología para mejorar o crear nuevas nanotecnologías a través del estudio del funcionamiento de sistemas biológicos y la comprensión de las biomoléculas. Algunos ejemplos relevantes son, la nanotecnología del DNA y RNA, en los que se emplea el conocimiento referente a la complementariedad de las bases para diseñar sistemas y estructuras complejas; el aprovechamiento del autoensamblaje de proteínas, péptidos y lípidos para obtener micelas, liposomas y otras estructuras tridimensionales; e incluso la aplicación del estudio de los polímeros de carbohidratos (Nagamune, 2017). Por otra parte, el término nanobiotecnología es más usado para referirse a la manera en que la nanotecnología es usada para crear materiales y dispositivos dirigidos al estudio de sistemas biológicos, al diagnóstico o terapéutica y en los que su unidad de construcción inicial no es necesariamente una biomolécula. En general, se puede decir que estos sistemas utilizan a la nanotecnología para lograr objetivos de las ciencias biológicas. El ejemplo más claro lo encontramos en la fabricación de materiales híbridos que contienen nanopartículas metálicas, magnéticas o poliméricas, puntos cuánticos o fullerenos, y además moléculas biológicas, que son útiles para imagenología o el diagnóstico clínico (Nagamune, 2017).

Se trate de nanobiotecnología o bionanotecnología, es ineludible que las biomoléculas son unidades de construcción indispensables para obtener nanomateriales funcionales, y si bien, las moléculas biológicas encontradas en la naturaleza ya tienen funciones y propiedades específicas, con los recientes avances en bioingeniería molecular, como la ingeniería genética y la ingeniería de proteínas,

se ha logrado mejorar, integrar y modificar las funciones intrínsecas de las biomoléculas, para encontrar nuevas aplicaciones y así emplearlas en la bioelectrónica, en biosensores, biocatálisis, imagenología molecular, sistemas de entrega de fármacos, ingeniería de tejidos, y prácticamente cualquier área tecnológica (Nagamune, 2017).

1.3. Generalidades del DNA

Si bien en las últimas décadas la biotecnología ha tenido un auge importante debido al descubrimiento y la mejora de las técnicas del DNA recombinante, también han surgido grupos de investigación interesados en aprovechar esta biomolécula como una unidad de construcción de nanoestructuras.

El DNA es un polímero de nucleótidos. Cada nucleótido está constituido por un glúcido con cinco átomos de carbono (la desoxirribosa) unido a una base nitrogenada, y a un grupo fosfato. Las bases nitrogenadas son clasificadas como purinas (guanina y adenina) y pirimidinas (citosina y timina), las primeras poseen una conformación de un anillo de seis carbonos unido a uno de cinco, mientras que las segundas están organizadas en un anillo de seis carbonos. Las bases nitrogenadas unen al carbono 1' de la desoxirribosa mediante un enlace glucosídico con el N₁ de las pirimidinas o el N₉ de las purinas (Krebs *et al.*, 2017).

Una cadena sencilla de DNA (ssDNA) se forma por el enlazamiento del carbono 5' de una desoxirribosa con el carbono 3' de otra desoxirribosa a través de la formación de un enlace fosfodiéster con el grupo fosfato. La unión de ambos elementos da lugar al “esqueleto desoxirribosa-fosfato”, y las bases nitrogenadas unidas al azúcar sobresalen a partir de éste. Debido a tal acomodo, el nucleótido terminal en uno de los extremos posee un grupo fosfato libre en 5', mientras que en el otro extremo se encuentra un grupo hidroxilo libre en 3' (Krebs *et al.*, 2017).

La formación de una molécula de DNA de doble cadena (dsDNA), o doble hélice, es debida a las interacciones no covalentes que ocurren entre bases nitrogenadas.

Las bases nitrogenadas se ubican al interior de la doble hélice, son planares y se posicionan perpendicularmente al eje de la hélice (Krebs *et al.*, 2017). La adenina forma dos puentes de hidrógeno con la timina, mientras que la guanina forma tres puentes con la citosina, tal complementariedad de las bases es conocida como apareamiento Watson-Crick (Vologodskii, 2015). Si bien, la formación de los puentes de hidrógeno es favorecida por la presencia de los grupos funcionales adecuados, y organizados en la geometría correcta, el mayor efecto sobre la estabilidad de la doble hélice es causado por las interacciones π - π que tienen lugar gracias a que las bases nitrogenadas, con propiedades aromáticas, se apilan una sobre otra (Cooper *et al.*, 2008). Para que una cadena se enlace con la otra es necesario que éstas se encuentren en direcciones antiparalelas, es decir, si una cadena se encuentra en dirección 5' a 3', la cadena con las bases complementarias debe ir de 3' a 5' (Krebs *et al.*, 2017).

Los esqueletos de azúcar-fosfato se encuentran en el exterior de la doble hélice y poseen una carga negativa presente en los grupos fosfato. Cuando el DNA se encuentra en una solución *in vitro* las cargas se neutralizan debido a la presencia de varios iones, como Na^+ y Mg^{2+} .

Las distintas caracterizaciones estructurales de la doble hélice han permitido la identificación de diversas conformaciones, siendo la más común aquella conocida como tipo B. En esta conformación un par de bases nitrogenadas se encuentra rotado 36° alrededor del eje de la hélice con respecto al siguiente par de bases; por lo tanto, aproximadamente cada 10 pares de bases tiene lugar una vuelta completa, con una dimensión de 3.4 nm, lo cual implica que la distancia aproximada entre cada par de bases es de 0.34 nm (dimensión estándar muy empleada en la caracterización de nanoestructuras de DNA). Cabe mencionar que la vuelta en el DNA-B ocurre en el sentido de las manecillas del reloj, por lo que se dice que la hélice es dextrógira. Además, durante el proceso de ensamblaje de la doble hélice se tiende a formar un surco menor, con una longitud promedio de 1.2 nm y un surco mayor de 2.2 nm y se considera que el diámetro de la hélice es de 2.0 nm

aproximadamente. (Krebs *et al.*, 2017; Vologodskii, 2015). En la figura 1.3 se pueden observar las principales características del DNA-B.

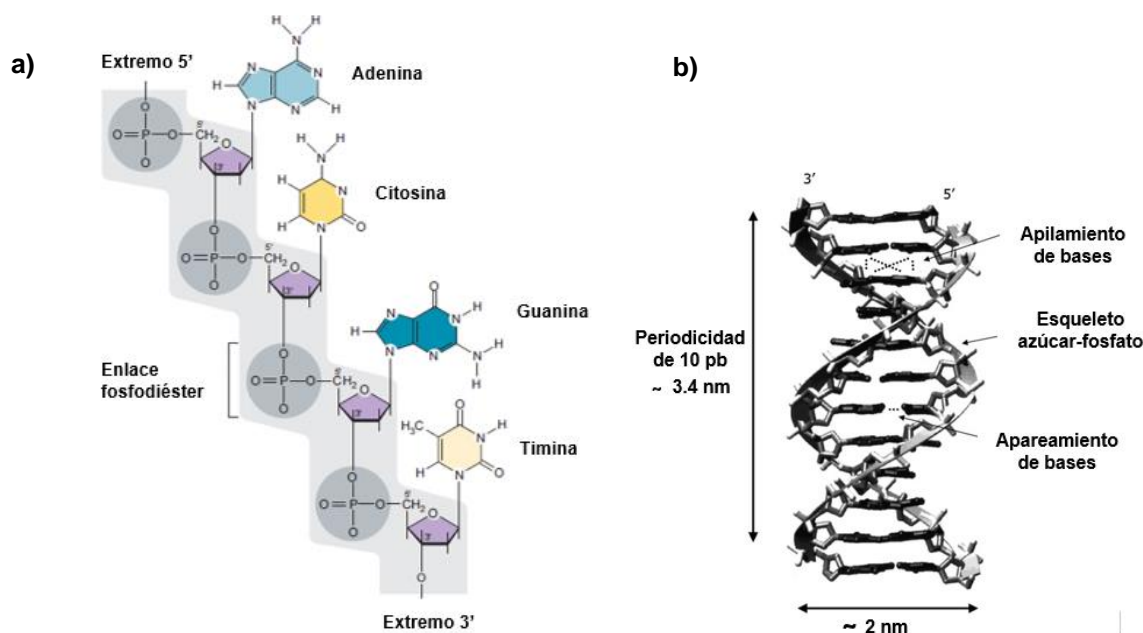


Figura 1.3. Estructura del ácido desoxirribonucleico. a) Cadena de polinucleótidos (Modificado de Watson *et al.*, 2014). b) Dimensiones de la doble hélice de DNA-B (Modificado de Bellini *et al.*, 2011).

Las dimensiones anteriormente descritas son aproximaciones del modelo de Watson-Crick para el DNA-B, y pueden ocurrir variaciones a nivel local o bien pueden ocurrir transiciones hacia otras conformaciones dependiendo de varios parámetros fisicoquímicos; por ejemplo, el DNA-A también posee una doble hélice dextrógira de menor longitud y con un mayor diámetro, pero se manifiesta cuando la molécula se encuentra deshidratada (Krebs *et al.*, 2017).

La vasta información que se posee sobre la estructura y conformación del DNA explican la ventaja de usar a esta biomolécula como una unidad de construcción de materiales a escala nanométrica, pues al conocer su organización molécula por molécula, la síntesis “bottom-up” se puede llevar a cabo de una forma casi ideal. Además, la complementariedad de las bases permite conocer con antelación la forma en la que las cadenas de DNA se pueden organizar, es decir, se puede

“programar” la hibridación de las unidades de construcción con base en la secuencia de las purinas y pirimidinas. Otra propiedad relevante para la nanotecnología del DNA es su capacidad para autoensamblarse. El autoensamblaje es la organización espontánea y reversible de unidades moleculares en estructuras ordenadas mediante interacciones no covalentes. En el caso del DNA esto ocurre durante la hibridación entre dos o más cadenas sencillas.

1.4. Nanotecnología del DNA

Uno de los principales objetivos de la bionanotecnología es la construcción de nanoestructuras programadas con precisión, a través de un control del material biológico comparable al que ocurre a nivel celular. Entre la gran diversidad de estrategias “bottom-up”, aquellas que involucran al DNA han demostrado ser muy efectivas en la obtención de los nanomateriales, gracias a su alto grado de reconocimiento molecular y autoensamblaje.

Aunque otras biomoléculas, como las proteínas, han sido usadas para el diseño y autoensamblaje de estructuras, el proceso es complicado debido a que existe una gran cantidad de combinaciones entre los 20 aminoácidos, y las interacciones entre éstas son muy complejas y difíciles de predecir. Por el contrario, la complementariedad de solo 4 bases nitrogenadas permite simplificar la programación de su construcción. Adicionalmente, el empleo de extremos cohesivos de cadena sencilla permite conectar dobles hélices de manera jerárquica y organizada (Lourdou y Chandrasekaran, 2018).

El uso del DNA para la construcción de estructuras inició durante la década de 1980, cuando Nadrian Seeman notó que la doble hélice de conformación lineal podía ser ensamblada de forma multidimensional a través de uniones de DNA ramificadas. La inspiración surgió a partir de un fenómeno biológico que ocurre durante la recombinación genética homóloga, conocido como “uniones de Holliday”, en el que a partir de las dos dobles hélices que poseen la misma secuencia se forma

una estructura ramificada de cuatro cadenas sencillas de DNA que integran entrelazados helicoidales (Holliday, 1964). Seeman sintetizó secuencias de DNA específicas que mediante la complementariedad de las bases formaron una unión con cuatro ramificaciones, la cual a su vez podía ser usada como una unidad de construcción para unirse con otras estructuras cruciformes mediante extremos cohesivos ubicados en los extremos, y así formar redes (Kallenbach y Seeman, 1983), como se observa en la figura 1.4.

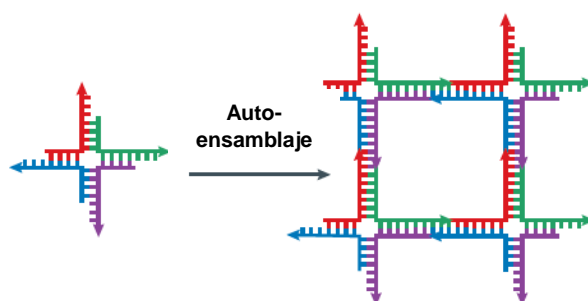


Figura 1.4. Estructuras ramificadas basadas en las uniones de Holliday (Tomado de Seeman y Sleiman, 2017).

El grupo de investigación de Seeman también diseñó uniones de cuatro y hasta doce brazos de DNA, para crear arreglos periódicos cuadrados y rectangulares (Wang y Seeman, 2007), y también estructuras tridimensionales como cubos y tetraedros (Goodman *et al.*, 2005). Sin embargo, estas estructuras han demostrado ser demasiado flexibles e inestables como para generar redes a gran escala. Para proporcionar mayor rigidez a tales conformaciones Seeman y colaboradores diseñaron el modelo conocido como doble entrecruzamiento (Fu y Seeman, 1993) que consiste en dos hélices de DNA vecinas que se enlazan por el intercambio de una de sus cadenas (Figura 1.5a)

Otra alternativa para rigidizar las construcciones consiste en emplear nanopartículas como moldes para la inmovilización y orientación de oligonucleótidos (Figura 1.5b). En este caso, en lugar de aprovechar el autoensamblaje por hibridación, la estructura depende de los enlaces iónicos o metálicos que forman un enrejado cristalino a partir de un núcleo de material inorgánico. Es así como las consideraciones estructurales de la doble cadena de DNA dejan de ser importantes,

pues el objetivo final es que el material inorgánico sea funcionalizado con una densa capa de cientos de moléculas de DNA (Jones, Seeman y Mirkin, 2015). Las primeras nanoestructuras de este tipo fueron desarrolladas empleando oligonucleótidos con un grupo tiol en el extremo 3' o 5', y adicionándolos en soluciones de nanopartículas de oro coloidales (Jin *et al.*, 2003).

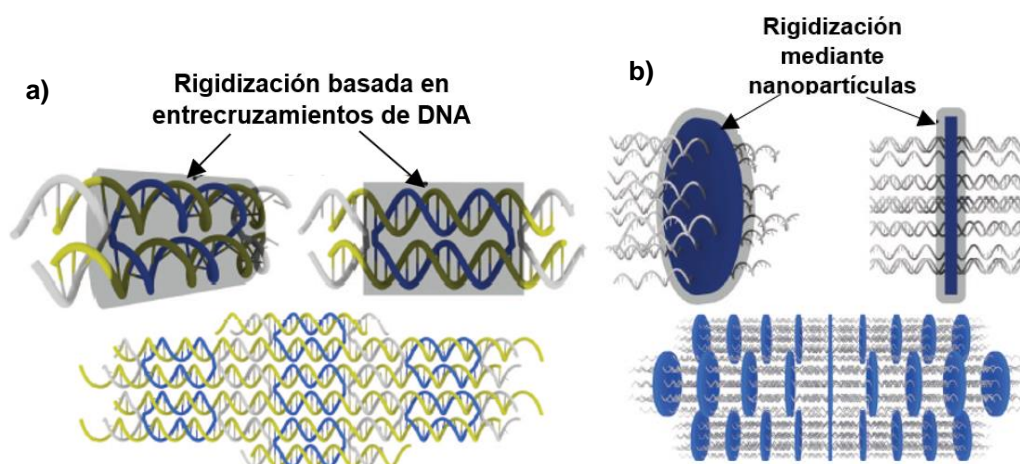


Figura 1.5. Dos estrategias para la rigidización de nanomateriales de DNA. a) Hibridación (doble entrecruzamiento). b) Funcionalización de nanopartículas inorgánicas (Imagen modificada de Jones, Seeman y Mirkin, 2015).

Por otra parte, en 2006, el surgimiento del origami de DNA revolucionó el proceso de obtención de nanomateriales. Desarrollado por Paul Rothemund, el método emplea pequeños oligonucleótidos de cadena sencilla que dirigen el plegamiento de una molécula circular de ssDNA de mayor tamaño, conocida como andamio. Suele usarse el DNA del bacteriófago M13 como el andamio y una variada cantidad de oligos de secuencia muy específica con la capacidad de unirse selectivamente a regiones distantes del DNA, actuando como “grapas” que crean el efecto de doblado o plegado (Rothemund, 2006), tal y como se observa en la figura 1.6. El origami de DNA ha resultado muy eficiente para la obtención de estructuras de dos dimensiones, aunque algunos grupos han logrado extender su alcance para producir estructuras tridimensionales, e incluso dinámicas, que cambian su conformación como respuesta a cambios en el medio (Ke *et al.*, 2009; Endo *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2011; Douglas *et al.*, 2012; Seeman y Sleiman, 2017).

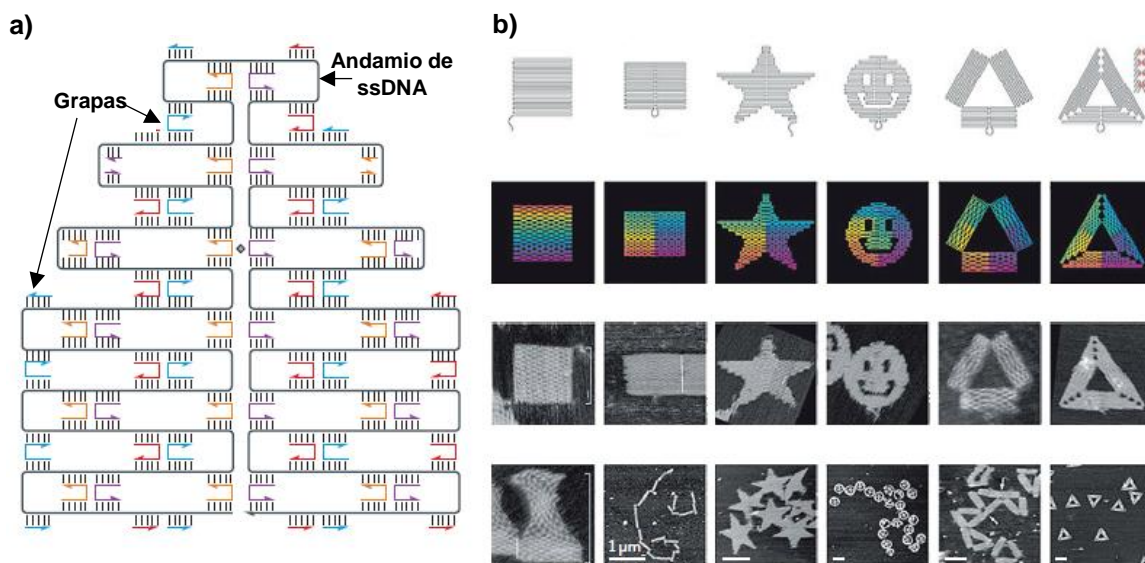


Figura 1.6. DNA Origami. a) Esquema del proceso de plegamiento del DNA de cadena sencilla. b) Microscopías de algunas nanoestructuras obtenidas mediante esta técnica (Tomado de Seeman y Sleiman, 2017).

1.5. Moléculas y nanoestructuras ramificadas

1.5.1. Polímeros ramificados

Existen antecedentes en la obtención de moléculas ramificadas a partir de diversos materiales. Los “polímeros tipo estrella” poseen conformaciones en las que una zona central sirve como punto de origen para varias cadenas que divergen en distintas direcciones, como se observa en la figura 1.7. Si las ramificaciones son iguales en composición son denominados homo-estrellas, pero si alguna varía en el algún elemento, longitud o topología, entonces se les suele denominar hetero-estrellas (Aloorkar *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2015).

Su arquitectura molecular está compuesta por al menos tres ramificaciones, y han sido estudiadas en química supramolecular debido a sus propiedades químicas, físicas y topológicas. Comparados con sus análogos lineales de mismo peso molecular, éstos poseen mayor densidad, lo que permite organizar más moléculas de interés en un menor volumen (Wu *et al.*, 2015). Además, el estudio de su

comportamiento en fluidos, ya sea de interés biológico o químico, se ve facilitado debido a que en algunos casos pueden ser modelados como esferas, sobre todo si el número de ramificaciones es elevado. Sin embargo, uno de los principales retos en el diseño de este tipo de arquitecturas está relacionado con la organización de las moléculas, pues ésta podría ser alterada como consecuencia del entrelazamiento e interacciones no deseadas entre las ramificaciones, debido a la flexibilidad que poseen, tal y como se representa en la figura 1.7c (Aloorkar *et al.*, 2012; Haydukivska y Blavatsk, 2017).

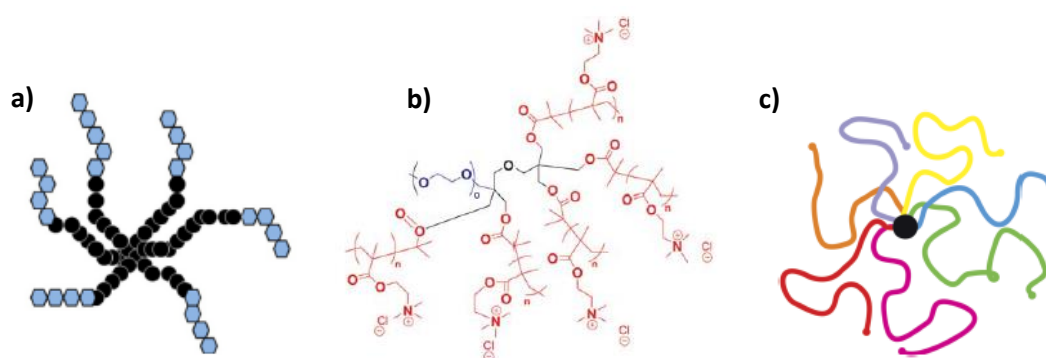


Figura 1.7. Polímeros tipo estrella: a) Modelo de polímeros ramificados (García y Quiroz, 2017). b) Polímero tipo estrella de PEG y cloruro de trietilamonio (Khanna *et al.*, 2010). c) Modelo de los loops y entrelazamientos que se generan en las ramificaciones (Haydukivska y Blavatsk, 2017).

El proceso de síntesis de polímeros ramificados requiere de una serie de reacciones, en la que tienden a formarse intermediarios. Sin embargo, esto no ha impedido el desarrollo de aplicaciones, sobre todo como sistemas de entrega de moléculas con actividad biológica que pueden ser incorporadas en las ramificaciones (Wu *et al.*, 2015).

Cabe mencionar que los polímeros tipo estrella son clasificados como estructuras macromoleculares (Wu *et al.*, 2015), debido a que las ramificaciones poseen longitudes de pocos nanómetros, y solo se consideran nanopartículas cuando el núcleo es de un tamaño tal que las propiedades del material se ven más dominadas por éste (Aloorkar *et al.*, 2012).

1.5.2. Nanoestructuras ramificadas de DNA

El presente proyecto de investigación busca obtener nanoestructuras ramificadas a partir de DNA. Posteriormente a las innovaciones de Seeman surgió una diversidad de construcciones de este tipo, y parte de este proyecto se fundamenta en una estructura sintetizada por Yu He y Chengde Mao (2006). Como se observa en la figura 1.8, se programó la hibridación de 3 variantes de ssDNA para formar un pequeño nudo con ramificaciones. Este trabajo busca ofrecer una innovación al obtener fragmentos de dsDNA de tamaño mayor, que mediante extremos cohesivos sintetizados mediante PCR sean capaces de unirse a los pequeños brazos del nudo central, y así extender sus dimensiones.

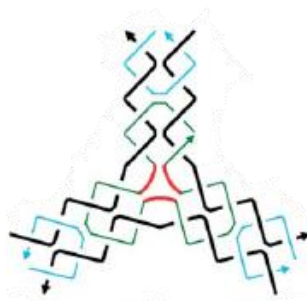


Figura 1.8. Nanoestructura ramificada con pequeñas extensiones, construida mediante hibridación de ssDNA (He y Mao, 2006).

Adicionalmente se seguirá una estrategia previamente desarrollada por Tian *et al.* (2006), en la que se obtiene dsDNA biotinilado en el extremo 5' mediante PCR, y posteriormente es mezclado con estreptavidina. La estreptavidina es una proteína tetramérica con un sitio de unión a un ligando por cada subunidad, por lo que en teoría puede unir hasta 4 moléculas de DNA biotinilado. Resulta importante mencionar que la interacción biotina-estreptavidina es altamente específica y, con una K_d de 10^{-14} M⁻¹ (Campbell, 2012) es una de las más fuertes de tipo no covalente. Un esquema general de esta estrategia se observa en la figura 1.9.

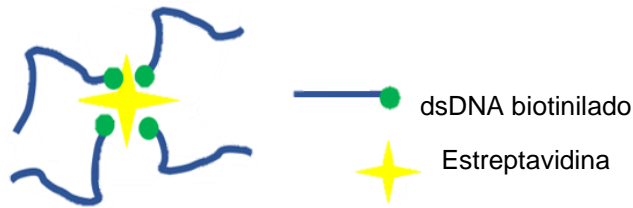


Figura 1.9. Representación del ensamblaje de nanoestructuras de DNA ramificadas, empleando biotina y estreptavidina.

Se ha demostrado ya la viabilidad de nanoestructuras ramificadas de DNA para el transporte de moléculas y el incremento en la respuesta biológica gracias a la multivalencia. Jeong *et al.* (2017) incorporaron mediante hibridación un siRNA a los extremos de una unión de Holliday; el siRNA a su vez estaba acompañado por un aptámero afín a una glicoproteína transmembranal sobreexpresada en células de cáncer (Mucina-1). Los resultados indicaron un incremento en la endocitosis de siRNAs asociados a la unión de Holliday, a comparación de siRNAs libres (Figura 1.10).

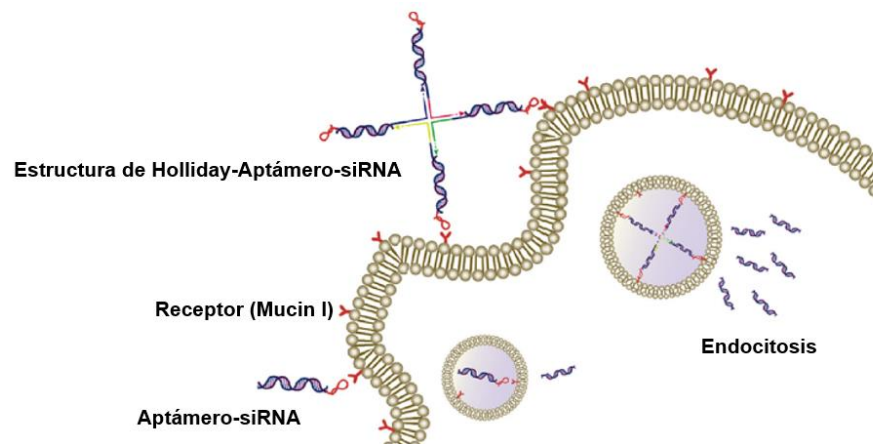


Figura 1.10. Representación gráfica de la endocitosis de siRNAs hibridados con una unión de Holliday (Modificado de Jeong *et al.*, 2017).

1.6. Estabilidad de las nanoestructuras de DNA

Las técnicas para diseñar y obtener nanoestructuras de DNA han alcanzado un nivel considerable de madurez, sin embargo, aún existen retos que enfrentar para lograr que estas construcciones tengan aplicaciones viables, sobre todo a nivel biológico.

La concentración de iones divalentes y la presencia de nucleasas son los principales factores que pueden afectar la integridad de estos materiales, además de cambios de temperatura, de pH y la presencia de otras partículas y moléculas que interactúen con los ácidos nucleicos (Bila *et al.*, 2019).

Las estructuras de DNA usualmente son sintetizadas en una solución amortiguadora (tampón) preparada con Tris, Acetato y EDTA (TAE), o en una solución de Tris, Borato y EDTA (TBE), suplementadas con $MgCl_2$ en concentraciones que van desde 5 hasta 20 mM. Los iones Mg^{2+} neutralizan las cargas negativas de los fosfatos, especialmente en aquellas zonas con alta densidad. Sin embargo, las concentraciones fisiológicas distan mucho de estos valores; en medios de cultivo rondan 0.04-0.8 mM, mientras que en sangre están en alrededor de 0.6-1 mM, por lo que las condiciones *in vivo* son inherentemente desestabilizantes para las construcciones de ácidos nucleicos (Bila *et al.*, 2019; Jahnen-Dechent y Ketteler, 2012; McKee y Komarova, 2017).

Tanto en el medio extracelular como en el intracelular se ha observado que distintas endonucleasas y exonucleasas son capaces de dañar la integridad estructural de las nanoestructuras de DNA. Gerling y colaboradores (2018) evaluaron un amplio espectro de estas enzimas, encontrando que Exo VIII y T7 generalmente son inocuas para las construcciones de ácidos nucleicos, pero Exo Ie, III y T, además de Endo T7 sí alteraron su conformación. De todas las nucleasas evaluadas, se notó que la DNAsa I tiene el mayor efecto destructivo.

Cabe mencionar que el efecto de los iones divalentes, las nucleasas y otros parámetros fisicoquímicos varía según la arquitectura de la estructura, por lo que es difícil extrapolar resultados experimentales y se recomienda evaluar la estabilidad para cada nuevo diseño (Bila *et al.*, 2019).

Para resolver la problemática de la estabilidad, en años recientes se han investigado varias estrategias que abarcan desde modificaciones químicas en los ácidos nucleicos, recubrimiento de las nanoestructuras con polímeros o

biomoléculas y el encapsulamiento (Bila *et al.*, 2019). La elección del método dependerá de la aplicación.

1.6.1. Rigidización y estabilización de las nanoestructuras de DNA mediante recubrimiento proteico

Además de las dos estrategias para disminuir la flexibilidad descritas en la sección 1.4, en años recientes se han realizado investigaciones enfocadas en el desarrollo de nanoestructuras de DNA rigidizadas con otras biomoléculas, sobre todo proteínas. El objetivo general ha sido obtener nanomateriales compuestos de DNA y proteína, capaces de autoensamblarse, conservando una morfología definida y, sobre todo, funcional. A grandes rasgos, estas construcciones están diseñadas de tal forma que la cadena de DNA es recubierta por las proteínas, formando una especie de “corona” o capa en su superficie.

Los polímeros tipo proteína ofrecen ventajas en comparación con los polímeros tradicionales, sobre todo porque pueden producirse mediante tecnologías de ADN recombinante, de tal forma que la composición monomérica puede estar determinada por el código genético. La monodispersidad también es más fácil de controlar, a diferencia de los procedimientos con síntesis química, en los que se suelen presentar intermediarios. Por otra parte, la producción en organismos recombinantes podría implicar una reducción de costos (Hernández-García *et al.*, 2014).

Hernandez-Garcia y colaboradores diseñaron una proteína capaz de recubrir DNA mediante interacciones electrostáticas, sin preferencia por secuencias específicas (Hernández-García *et al.*, 2012), la cual fue denominada C₄-B^{K12}. Ésta se encuentra conformada por dos bloques con una función específica: el bloque de estabilidad coloidal (denominado C₄) fue diseñado a partir de una secuencia derivada de la colágena, compuesta por 400 aminoácidos (\approx 36 kDa), sobre todo por prolina y aminoácidos hidrofílicos sin carga, y que exhibe una conformación de una cadena sin estructura secundaria. El segundo bloque permite la interacción de la proteína con el DNA, pues está integrado por 12 aminoácidos catiónicos (lisinas,

por lo que fue denominado B^{K12}); cada lisina interactúa con un grupo fosfato de la cadena de DNA, por lo que en una doble hélice la proteína debería ser capaz de unirse cada 6 pares de bases. Cabe mencionar que el bloque C₄ es lo suficientemente grande para conferir estabilidad coloidal, sin afectar las interacciones electrostáticas con el DNA ni favorecer la agregación del mismo. En cuanto al dominio catiónico, éste no fue diseñado con más aminoácidos con la intención de que fuera lo suficientemente corto para evitar interacciones intra e intermoleculares entre las moléculas de DNA (Hernández-García *et al.*, 2012). Para esta proteína se reportó una masa molecular experimental de 38,582 Da.

Más adelante se desarrolló una versión modificada de la proteína, denominada C₄-S₁₀-B^{K12}, añadiendo un tercer bloque (S₁₀) que, al menos en teoría, propiciaría el autoensamblaje de las proteínas por cooperatividad mediante interacciones proteína-proteína (Hernández-García *et al.*, 2014). El bloque S₁₀ tiene una secuencia similar a la de la seda (GAGAGAGQ) repetida 10 veces, y es capaz de plegarse en una estructura secundaria de hebras β. Para esta proteína se reportó una masa molecular experimental de 45,160 Da.

Finalmente, se diseñó la proteína denominada C₈-B^{Sso7d}. Ésta también posee el bloque derivado de la colágena para conferir estabilidad coloidal (C₈), mientras que el dominio de unión específico al DNA (Sso7d) está conformado por una pequeña proteína de 7 kDa, presente de manera natural en la arquea termofílica *Sulfolobus solfataricus*. La topología de esta proteína está determinada por dos hojas β, una formada por dos hebras β y la otra por tres hebras β, además de una hélice α en el extremo C-terminal. Esta proteína tiene una función similar a la de las histonas de los eucariontes, compactando y estabilizando el DNA para preservar su integridad en las altas temperaturas en las que la arquea se desarrolla (75-80 °C) (Agback *et al.*, 1998).

Para la proteína C₈-B^{Sso7d} previamente se reportó una masa molecular experimental de 80,210 Da. Además, se demostró su unión al DNA, sin preferencia por una secuencia determinada (Hernández-García *et al.*, 2017).

Las secuencias de las tres proteínas pueden ser consultadas en el Anexo A, y en la figura 1.11 se muestra el diseño de las tres proteínas.

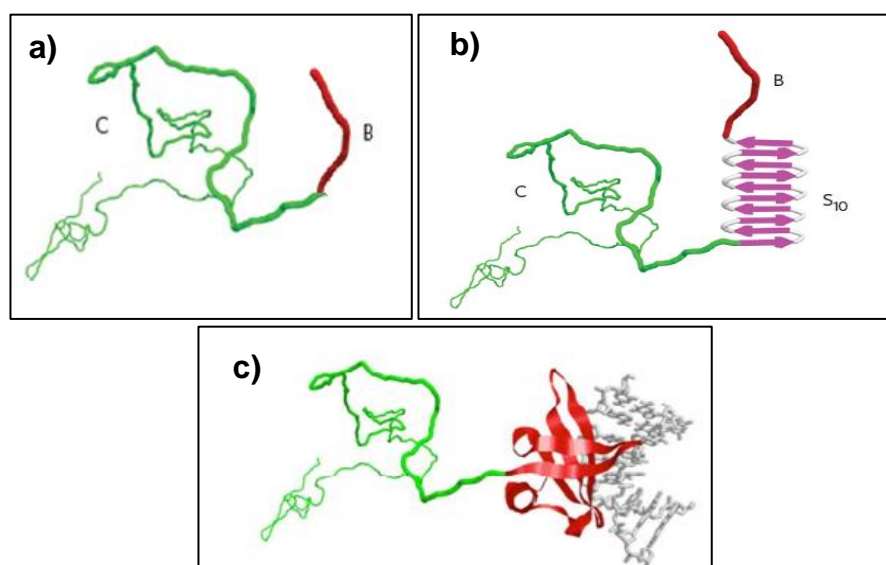


Figura 1.11 Diseño de las proteínas con dominios de unión a ácidos nucleicos. a) C_4-B^{K12} , b) $C_4-S_{10}-B^{K12}$ y c) C_8-B^{Sso7d} . El bloque de estabilidad coloidal está indicado en color verde, el bloque de unión al DNA con color rojo y el bloque para autoensamblaje en color rosa. Para la proteína C_8-B^{Sso7d} también se representa la interacción de Sso7d con el surco menor de la doble hélice de DNA (Imágenes modificadas de Hernandez-Garcia *et al.*, 2014 y Hernandez-Garcia *et al.*, 2017).

Con DNA lineal, tanto de cadena sencilla como de doble cadena, C_4-B^{K12} y C_8-B^{Sso7d} tienen un comportamiento similar, formando una corona alrededor del DNA e incrementando su longitud de persistencia (longitud máxima antes de presentar un cambio en el ángulo con la recta tangente) hasta en 4 veces (Hernandez-Garcia, 2014); sin embargo, con DNA circular, C_4-B^{K12} causa una disrupción en su conformación, organizando la molécula de tal manera que se forme una estructura lineal (Hernández-García *et al.*, 2017). Este fenómeno puede deberse a la inespecificidad de la interacción electrostática con las lisinas, que enlazan varias moléculas de DNA de manera inter e intramolecular. El mismo comportamiento se observa con $C_4-S_{10}-B^{K12}$, que forma estructuras fibrilares con una longitud de persistencia aún mayor, debido al bloque de autoensamblaje (Hernández-García *et al.*, 2014). También se ha evaluado el efecto de C_4-B^{K12} y C_8-B^{Sso7d} sobre nanoestructuras más complejas obtenidas mediante la técnica de origami (Estrich *et al.*, 2017). Con C_8-B^{Sso7d} se obtuvieron buenos resultados de recubrimiento,

además de una morfología homogénea y monodispersa, pero las estructuras con C_4-B^{K12} presentaron irregularidades en su forma. En este caso también se ha propuesto que tal afectación se debe al efecto de las lisinas. En la figura 1.12 se resumen estas caracterizaciones. Esta tesis busca aportar nueva información respecto a la interacción de estas proteínas con estructuras ramificadas.

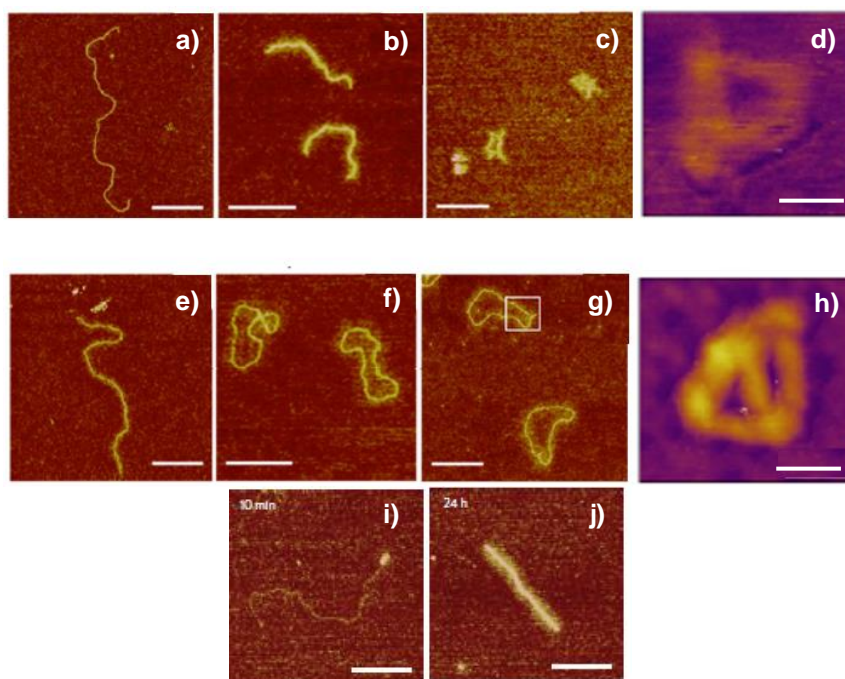


Figura 1.12. Caracterización mediante microscopía de fuerza atómica de la interacción entre distintos tipos de DNA y las proteínas con bloques de unión. C_4-B^{K12} con a) dsDNA lineal, b) pDNA, e) ssDNA circular y d) estructuras de origami. C_8-B^{Sso7d} con e) dsDNA lineal, f) pDNA, g) ssDNA circular y h) origami. $C_4S_{10}-B^{K12}$ con dsDNA lineal tras una incubación de i) 10 minutos y j) 24 h. Barra de escala: a-c= 500nm, d= 50 nm, e-g= 500 nm, h= 50 nm, i-j= 200nm. (Imágenes adaptadas de Hernández-García *et al.*, 2014; Hernández-García *et al.*, 2017 y Estrich *et al.*, 2017).

1.6.2. Otras estrategias para estabilizar nanoestructuras de DNA

Se ha evaluado el uso otras moléculas catiónicas que interactúan electrostáticamente con la carga negativa de los grupos fosfatos del DNA. Estas moléculas pueden ser dendrímeros, polímeros, azúcares y proteínas. Uno de los ejemplos más sencillos es un polímero formado por oligolisina y polietilenglicol (PEG). La lisina confiere la carga positiva, mientras que el PEG actúa como un armazón alrededor de toda la estructura, otorgando protección contra nucleasas y

otros componentes de medios de cultivo hasta por 24 horas (Ponnuswamy *et al.*, 2017). También se ha reportado el uso de polietilamina y quitosano (polisacárido catiónico), con los cuales nanoestructuras de origami presentaron estabilidad en diversos medios de cultivo por un periodo de hasta una semana (Ahmadi *et al.*, 2018). Comportamientos similares se observaron al recubrir nanoestructuras de DNA con espermidina (cadena alifática con 3 grupos amino) (Wang *et al.*, 2018; Ponnuswamy *et al.*, 2017).

Otra estrategia consiste en generar un enlaces o entrecruzamientos covalentes. Los primeros reportes utilizaron una ligasa T4 para formar un enlace fosfodiéster covalente entre el fosfato del extremo 5' y el grupo hidroxilo en 3' (O'Neill *et al.*, 2006). Cabe mencionar que los oligos sintetizados por vía química suelen carecer del grupo fosfato en 5', por lo que requieren de esta modificación adicional. Otra técnica emplea la molécula 8-metoxipsoraleno como agente intercalante que se activa al irradiarse con una longitud de onda de 365 nm (Rajendran *et al.*, 2011). Y, recientemente se buscó aprovechar el efecto mutagénico de la radiación UV, diseñando estructuras de origami con un alto contenido de timinas para favorecer la formación de dímeros de pirimidina (Gerling *et al.*, 2018). Experimentalmente se trabajó con longitud de onda de 310 nm, y para este método es necesario ajustar el tiempo de irradiación para cada diseño, debido a que periodos muy extensos tienen la capacidad de destruir las construcciones.

También se han desarrollado estrategias para encapsular nanoestructuras de origami con liposomas. Perrault y Shih (2014) diseñaron un sistema de encapsulamiento inspirado en membranas lipídicas de cápsides virales. De esta manera, utilizando colesterol, además de polietilenglicol, lograron encapsular hasta un 68 % de las estructuras. Con este diseño se logró una resistencia significativa ante la actividad de DNasa I, hasta por 24 h, y una vida media *in vivo* de 6 horas, en comparación con los 20 minutos identificados en las nanoestructuras sin encapsular.

Una solución diferente se basa en modificaciones químicas en el esqueleto de los ácidos nucleicos o en el uso de bases no canónicas. Desde décadas pasadas

se sabe que la degradación enzimática de oligonucleótidos puede ser limitada modificando las moléculas que forman los enlaces entre nucleótidos, reemplazando, por ejemplo, el enlace fosfodiéster con fosforotioato, o bien, sustituyendo en la posición 2' de la ribosa con 2'-OMe (Fisher *et al.*, 1993). Por otra parte, una timidina (dT) invertida puede ser incorporada en el extremo 3' (Ortigão *et al.*, 1992), o en el extremo 5' (Shaw *et al.*, 1991), en ambos casos reduciendo la degradación por exonucleasas. La fosforilación del extremo 3' o la incorporación de un espaciador C3 también inhiben la degradación enzimática (Eder *et al.*, 1991). Sin embargo, se ha observado que estas modificaciones pueden tener efectos inesperados en las nanoestructuras de DNA, como agregación, toxicidad, cambios en la estabilidad térmica, o efectos biológicos dependientes de la secuencia, como la activación de la respuesta inmune innata (Bila *et al.*, 2019). Por lo anterior, es recomendable que se realice una evaluación exhaustiva para encontrar la modificación más conveniente para cada tipo de construcción. En el caso de bases no canónicas, recientemente se demostró que un apareamiento entre 5-Me-isoC/isoG y A/2-thioT duplicó el tiempo de resistencia ante la exonucleasa T7 de nanoestructuras con 6 ramificaciones de DNA (Liu *et al.*, 2017).

Otra modificación que ha resultado promisoría consiste en la incorporación de hexaetilenglicol en ambos extremos de los oligonucleótidos. Se ha demostrado que con esta adición se incrementó la estabilidad de estructuras bidimensionales y tridimensionales en medios biológicos, sin afectar la función para la que fueron diseñadas (Conway *et al.*, 2013; Bujold *et al.*, 2014).

Las figuras 1.13 y 1.14 muestran representaciones gráficas de los procedimientos anteriormente descritos. Todas estas estrategias amplían el abanico de opciones para lograr nuevas aplicaciones para la nanotecnología del DNA, y la selección de alguna de éstas deberá ser realizada cuidadosamente atendiendo a factores funcionales y estructurales.

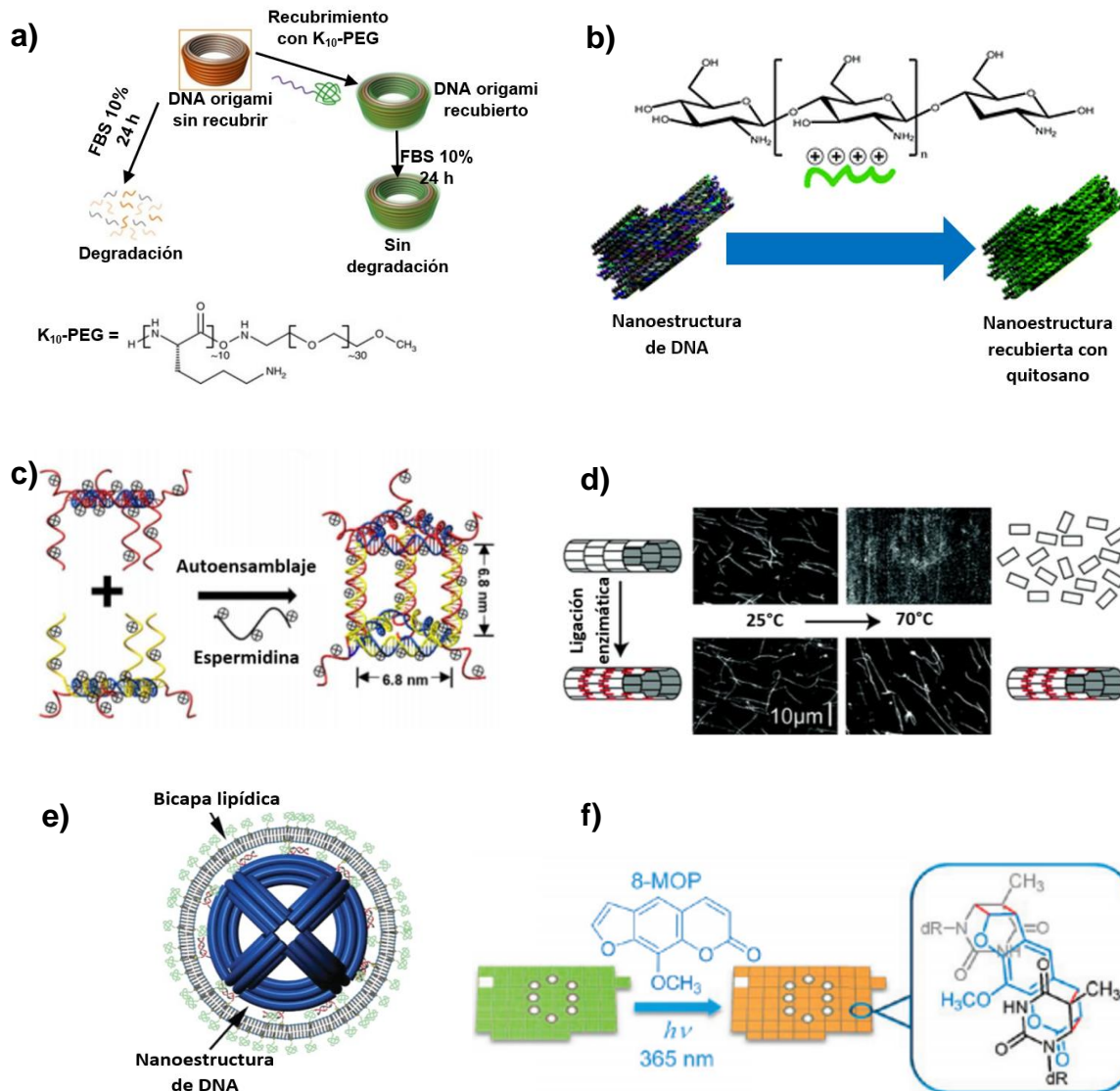


Figura 1.13. Diversas estrategias propician un incremento en la estabilidad de nanoestructuras de DNA. a) El recubrimiento de nanoestructuras con un polímero formado por oligolisina (K₁₀) y PEG evita su degradación en suero fetal bovino (FBS) (Ponnuswamy *et al.*, 2017). b) Representación del recubrimiento de una estructura de origami de DNA con quitosano (Ahmadi *et al.*, 2018). c) Nanoestructura recubierta con espermidina (Wang *et al.*, 2018). d) Ligación enzimática de nanotubos de carbono para conferirles estabilidad térmica (O'Neill *et al.*, 2006). e) Encapsulamiento de una nanoestructura de DNA en una membrana lipídica (Perrault y Shih, 2014). f) Entrecruzamiento covalente en origami de DNA utilizando 8-metoxipsoraleno como agente intercalante (Rajendran *et al.*, 2011).

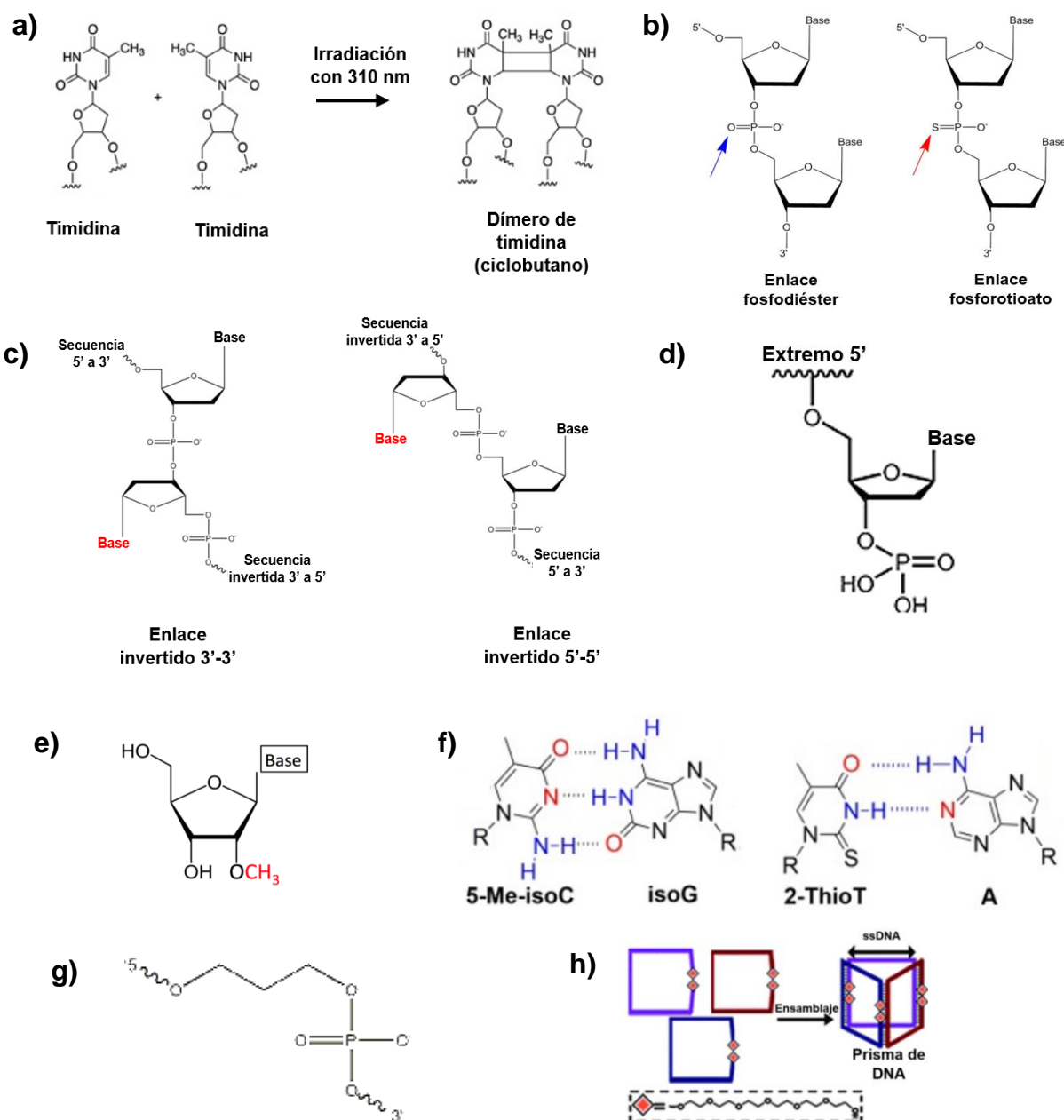


Figura 1.14. Modificaciones químicas en el esqueleto de los ácidos nucleicos permiten conferir mayor estabilidad a las nanoestructuras de DNA. a) Dímeros de timidina (Gerling *et al.*, 2018). b) Enlace fosforotioato reemplazando al típico enlace fosfodiéster (Sigma-Aldrich, s.f.) c) Esquema general de la incorporación de nucleósidos invertidos en 3' y 5', indicando en rojo la región donde suele colocarse una timina (Youtsey, 2015). d) Fosforilación en el extremo 3' (Biomers, 2019). e) Metilación de la ribosa en 2' (Dimitrova *et al.*, 2019). f) Apareamiento entre pares de bases no canónicas 5-Me-isoC/isoG y A/2-tioT (Liu *et al.*, 2017). g) Incorporación de un espaciador C3 en 5' (Integrated DNA Technologies, s.f.). h) Incorporación de hexaetilenglicol en ambos extremos de los ácidos nucleicos (Conway *et al.*, 2013).

II. JUSTIFICACIÓN

Diversas moléculas y nanoestructuras ramificadas han sido construidas para organizar moléculas y dotarlas de multivalencia, o bien para evaluar su utilidad en áreas como la litografía o la nanotecnología estructural (Rudiuk *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2015).

Los polímeros tipo estrella han sido las primeras macromoléculas desarrolladas con una morfología ramificada; sin embargo, su proceso de síntesis es complicado e involucra la formación de varios intermediarios. Por otra parte, la mayoría han sido contruidos a partir de moléculas orgánicas e inorgánicas cuya biocompatibilidad no ha sido evaluada detalladamente, además, inherentemente a sus métodos de síntesis, la longitud de sus ramificaciones tiende a ser de pocos nanómetros. Estas desventajas pueden ser sorteadas al construir nanoestructuras empleando DNA como unidad de construcción, pues su formación es más simple como consecuencia del autoensamblaje que rige la hibridación de las bases nitrogenadas, además de ser biocompatibles. He y Mao (2006) construyeron una estructura empleando tres moléculas de ssDNA. Sin embargo, el tamaño de cada ramificación resultó en solo 22 pb (7.5 nm). Extender sus longitudes siguiendo la misma estrategia requeriría de la hibridación de cientos de moléculas pequeñas de ssDNA o bien de moléculas de cadena sencilla más grandes que requieren de procesos de producción menos sencillos que su contraparte de doble cadena. El presente proyecto pretende incrementar el tamaño de las ramificaciones empleando dsDNA con extremos cohesivos. El dsDNA al ser más estable facilita el incremento en las longitudes, además de ser de rápida producción mediante PCR. Las nanoestructuras de mayor tamaño pueden ser funcionalizadas con un amplio espectro de moléculas.

Una desventaja compartida por todas las nanoestructuras con esta morfología es la falta de rigidez para cada una de las extensiones, por lo que tienden a formar asas y entrelazamientos, lo cual impide una arquitectura organizada e incluso podría favorecer interacciones no deseadas. Es por esto que este proyecto busca rigidizar

las ramificaciones recubriéndolas con proteínas que poseen dominios de unión al DNA.

La búsqueda de aplicaciones de las nanoestructuras de DNA también se ha visto obstaculizada por la existencia de ciertos factores que afectan su estabilidad. Al evaluar su comportamiento en sistemas *in vivo*, se ha visto que son fácilmente degradadas por nucleasas y no logran conservar su integridad por largos periodos de tiempo a 37 °C. Este proyecto también busca demostrar que el recubrimiento proteico ofrece una solución a esta problemática.

Las nanoestructuras obtenidas podrán ser empleadas en el futuro para transportar fármacos capaces de intercalarse en el dsDNA, o alguna molécula con actividad biológica que se pueda incorporar en los extremos para propiciar multivalencia. También podrían ser recubiertas con nanopartículas metálicas, o se podrán usar como unidades de construcción para nanoestructuras más complejas. Además, podría evaluarse si una mejor organización espacial, en la que se reduce el entrelazamiento de las cadenas, incrementa o regulariza la actividad multivalente, en comparación con estructuras no rigidizadas.

III. HIPÓTESIS

La interacción de proteínas de diseño con moléculas de dsDNA permitirá obtener nanoestructuras ramificadas, capaces de autoensamblarse con una morfología y tamaño controlados, además de incrementar su termoestabilidad y resistencia a la actividad de nucleasas.

IV. OBJETIVO GENERAL

Obtener nanoestructuras ramificadas de DNA recubiertas con proteína, con morfología definida y capacidad para el autoensamblaje.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar y obtener nanoestructuras ramificadas mediante hibridación de DNA.
- Diseñar y obtener nanoestructuras ramificadas empleando estreptavidina y dsDNA biotinilado.
- Investigar la interacción entre las estructuras de DNA y las proteínas C₄-B^{K12}, C₄-S₁₀-B^{K12} y C₈-B^{Sso7d} mediante ensayos de cambio en la movilidad electroforética.
- Verificar la arquitectura y morfología ramificada de las nanoestructuras mediante microscopía de fuerza atómica.
- Evaluar el efecto del recubrimiento proteico sobre la estabilidad térmica y ante la actividad de nucleasas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales y reactivos

El diseño de las secuencias para la obtención de las nanoestructuras se realizó con ayuda de la herramienta en línea *Oligo Analyzer 3.1*, de Integrated DNA Technologies™. Los oligos ssDNA y cebadores para la construcción de las nanoestructuras ramificadas fueron adquiridos con Integrated DNA Technologies™, y la estreptavidina de *Streptomyces avidinii* con Sigma—Aldrich® (CAT #S4762), mientras que el plásmido REDOX_switch_pMK-T, el tampón Tris-Acetato- EDTA (CAT #B49), la Master Mix Phire Green para la polimerasa Hot Start II (CAT #F126S) y el kit para extracción de DNA GeneJET (CAT #K0691) fueron adquiridos con Thermo Fisher Scientific™. Se obtuvo agua Milli-Q® a partir de un equipo Milli-Q® Direct marca Merck, propiedad del Instituto de Química, y se empleó un termociclador T-100 de Bio-Rad®. Para las evaluaciones mediante electroforesis se empleó agarosa Top Vision (CAT # R0491), soluciones de amortiguador TAE 50x (CAT #B49) y TBE 10x (CAT #B52), DNA Gel Loading Dye 6x (CAT #R0611), solución 10,000x Sybr Safe Gel Stain® (CAT # S33102) y marcadores moleculares de 100 bp (CAT # 15628050) y 1 kb (CAT #SM0311), los cuales fueron adquiridos con Thermo Scientific™, mientras que el persulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ – CAS 7775-27-1), cloruro de magnesio (MgCl_2 – CAS 7786-30-3), acetato de magnesio ($\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ – CAS 16674-78.5) y DTT se compraron con Sigma-Aldrich®. La tetrametiletilendiamina (CAT #1610801), acrilamida (CAT # 1610100) y bis-acrilamida fueron adquiridos con Bio-Rad. Además, se emplearon los sistemas Owl™ EasyCast™ B1 y B2 de Thermo Fisher Scientific; y Mini-PROTEAN Tetra Cell System de Bio-Rad. La documentación de los geles se realizó con ayuda del equipo c300 de Azure Biosystems. Las proteínas empleadas fueron obtenidas previamente mediante expresión en organismos recombinantes y liofilizadas. Para la caracterización mediante microscopía se empleó un microscopio de fuerza atómica MultiMode 8-HR ScanAsyst, marca Bruker. Se adquirieron puntas de silicona y nitruro para modo ScanAsyst Air con una constante elástica de 0.32 Nm^{-1} , marca Bruker y discos de mica de moscovita PELCO® de Ted Pella, Inc. La incubación de

las muestras a determinadas temperaturas requirió de un termobloque Benchmark Scientific Inc. Modelo H5000-HC. Para las pruebas de resistencia a nucleasas se adquirió DNAsa I de *Streptomyces avidinii* con Sigma-Aldrich (CAT AMPD1-1KT). Para evaluar la purificación de las nanoestructuras se usó una membrana de celulosa para diálisis (CAT #D9777) de Sigma Aldrich, con un corte de 14 kDa. El equipo para concentración al vacío “SpeedVac” se adquirió con Thermo Scientific, mientras que un kit Freeze n´ Squeeze se adquirió de Bio-Rad®. El ssDNA M13mp18 empleado para el diseño de nanoestructuras más complejas se adquirió con Guild Biosciences (CAT # D441).

6.2. Diseño de nanoestructuras ramificadas

Para construir nanoestructuras ramificadas se diseñaron dos estrategias; una basada en la hibridación de oligonucleótidos de cadena sencilla con moléculas de dsDNA que poseen extremos cohesivos de 10, 15 y 20 nucleótidos (nt). La segunda estrategia hace uso de DNA biotinilado, aprovechando la afinidad de este ligando con la molécula de estreptavidina.

En la primera estrategia, inicialmente se diseñaron tres secuencias de DNA de cadena sencilla (ssDNA) con tamaños de 78 nt, 48 nt y 27 nt, basadas en aquellas reportadas por He y Mao (2006). Las secuencias se pueden observar en la tabla 6.1. El ssDNA más largo, denominado oligo C, con un tamaño de 78 nt contiene secuencias complementarias con el fragmento de 48 nt (oligo L), en tres repeticiones separadas por espaciadores de 5 timinas. A su vez, el fragmento L posee secuencias complementarias con el oligo S, y al ocurrir la hibridación entre estos últimos, se forman 6 extremos cohesivos de 10, 15 o 20 nt, en las orillas de las ramificaciones, que serán complementarios con DNA de doble cadena (dsDNA). En general, la interacción de estas moléculas de ssDNA da lugar a la formación de una estructura formada por 1 oligo C, 3 oligos L y 3 oligos S, y es de notar que, podrían unirse hasta con un máximo de 6 moléculas de dsDNA. En el presente escrito se ha determinado nombrar a la formación integrada por estos 3 oligonucleótidos como “estructura central CLS” o “núcleo CLS”. Un esquema

general de los ensamblados de DNA se observa en la figura 6.1, mientras que en la figura 6.2 se presenta la hibridación de los oligonucleótidos.

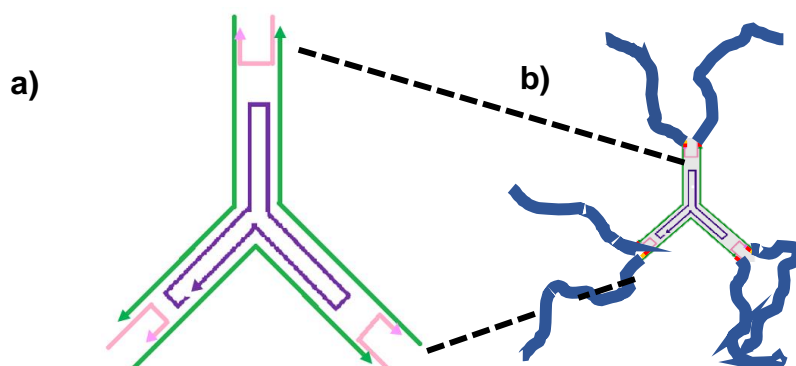


Figura 6.1. Estructura general de los ensamblados de DNA: a) Estructura central constituido por un fragmento C (morado), 3 fragmentos L (verde) y 3 fragmentos S (rosa). b) Nanoestructura ramificada de DNA integrada por la estructura central y los fragmentos de dsDNA (en color azul) con extremos cohesivos complementarios a los fragmentos L y S.

Tabla 6.1. Secuencias de los oligos del núcleo central (5'->3').

Oligo C (Central)
CCATCGTAGGTTTTCTTGCCAGGCACCATCGTAGGTTTTCTTGCCAGGCA CCATCGTAGGTTTTCTTGCCAGGCA
Oligo L (Large) – extremo cohesivo de 10 nt
CGCGCTCGGCTAGCAACCTGCCTGGCAAGCCTACGATGGACACGGTAA
Oligo S (Short) – extremo cohesivo de 10 nt
CGCGCTCGGCTTACCGTGTGGTTGCTA
Oligo L (Large) – extremo cohesivo de 15 nt
TCCCACGCGCTCGGCTAGCAACCTGCCTGGCAAGCCTACGATGG ACACGGTAA
Oligo S (Short) – extremo cohesivo de 15 nt
TCCCACGCGCTCGGCTTACCGTGTGGTTGCTA
Oligo L (Large) – extremo cohesivo de 20 nt
GCTGCTCCACGCGCTCGGCTAGCAACCTGCCTGGCAAGCCTACGATGG ACACGGTAA
Oligo S (Short) – extremo cohesivo de 20 nt
GCTGCTCCACGCGCTCGGCTTACCGTGTGGTTGCTA

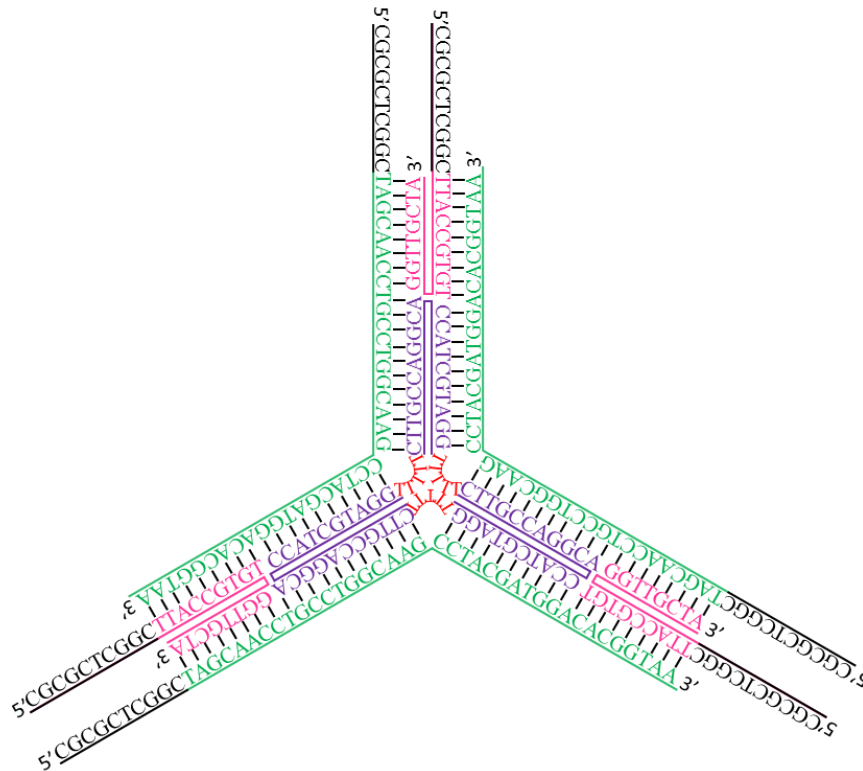


Figura 6.2. Esquema de la hibridación de las tres moléculas de ssDNA.

Para la construcción de las ramificaciones de dsDNA se diseñaron cebadores, constituidos por secuencias complementarias a dos regiones del plásmido REDOX_switch_pMK-T (Anexo B). Además, en el extremo 5' del cebador directo se añadió la secuencia de 10, 15 o 20 nt, complementaria a los fragmentos L y S, y un espaciador de trietilenglicol que favorecería la formación de extremos cohesivos mediante PCR. Las secuencias de estos cebadores se presentan en la tabla 6.2. Adicionalmente se ordenaron cebadores sin el espaciador de trietilenglicol, esperando que originaran fragmentos sin los extremos cohesivos, y, por tanto, sin la capacidad para autoensamblarse. En la figura 6.3 se observa un esquema general que permite comprender la función de la molécula espaciadora en la PCR. Se diseñaron 5 distintos cebadores inversos, para obtener moléculas de 211, 367, 539 y 722 pb, además de uno más con 10 nt adicionales, acompañados del espaciador de trietilenglicol en 5', con la finalidad de que el fragmento de dsDNA tuviera un segundo extremo cohesivo cuya complementariedad pudiera ser empleada para el diseño de futuras construcciones.

Tabla 6.2. Secuencias de los cebadores utilizados para la obtención de las moléculas de dsDNA con extremos complementarios al núcleo CLS.

Clave*	Secuencia 5' -> 3'
Fw_722	CGCAACTGTTGGGAAGGGCG
Fw_Oh ₁₀	GCCGAGCGCGCGCAACTGTTGGGAAGGGCG
Fw_Oh ₁₀ _Sp	GCCGAGCGCG/iSp9/CGCAACTGTTGGGAAGGGCG
Fw_Oh ₁₅ _Sp	GCCGAGCGCGTGGGA/iSp9/CGCAACTGTTGGGAAGGGCG
Fw_Oh ₂₀ _Sp	GCCGAGCGCGTGGGAGCAGC/iSp9/CGCAACTGTTGGGAAGGGCG
Rv_211	TCTGGACAAGACACGTGGCC
Rv_367	CACCACCACAACCACCACCG
Rv_539	GCAACACGTTTTGCAACCTGTTTG
Rv_722	TCAGTGAGCGAGGAAGCGGA
Rv_Oh ₁₀ _Sp	AAAGGCCCCC/iSp9/TCAGTGAGCGAGGAAGCGGA

*Fw: Forward; Rv: Reverse; Oh_x: Secuencia complementaria (overhang) de 10, 15 o 20 nt; Sp: Espaciador de trietilenglicol.

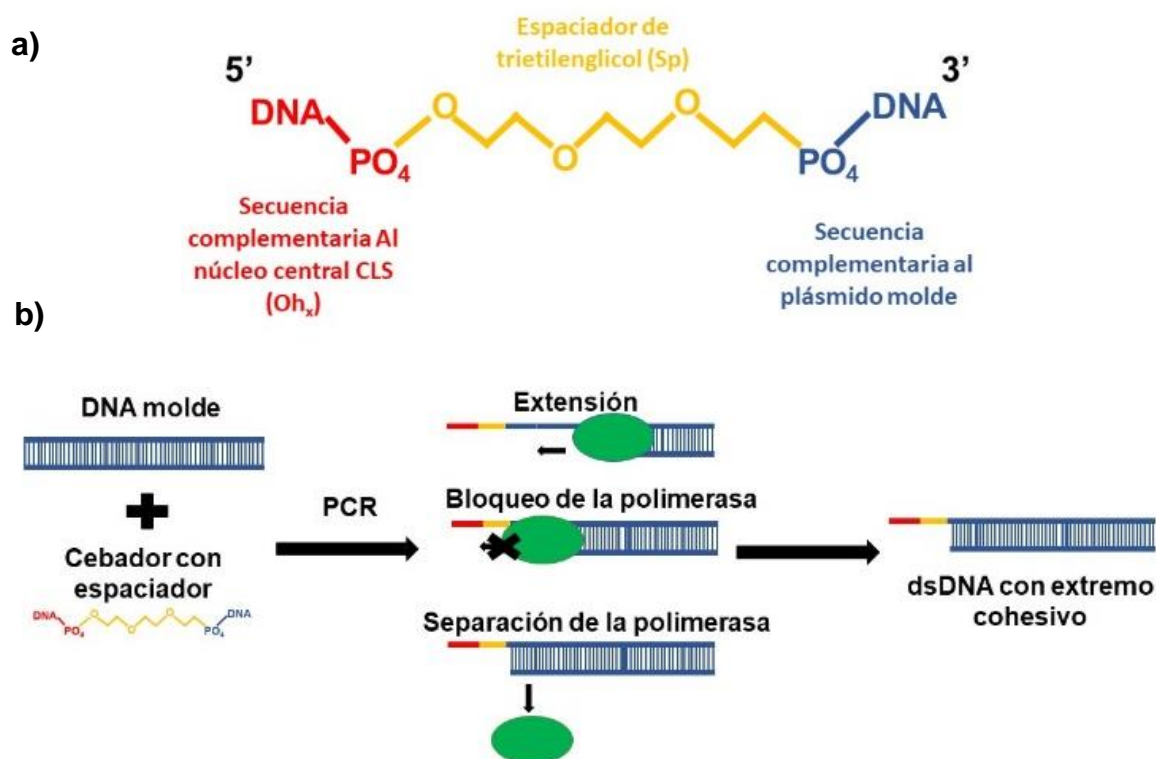


Figura 6.3. Obtención de moléculas de dsDNA con extremos cohesivos mediante PCR. a) Representación de los cebadores con el espaciador de trietilenglicol (amarillo) y la secuencia complementaria a la estructura central CLS (rojo). b) Esquema general del bloqueo de la actividad de la polimerasa por el espaciador de trietilenglicol.

En lo concerniente a la segunda estrategia, para la construcción de dsDNA con un extremo biotinilado se diseñaron cebadores para obtener moléculas de 201, 368, 555 y 732 pb, y añadiendo una molécula de biotina en el extremo 5' del cebador inverso. Las secuencias se presentan en la Tabla 6.3.

Todos los oligonucleótidos fueron resuspendidos en agua Milli-Q (esterilizada y filtrada con membranas de 0.45 µm) inmediatamente después de su recepción.

Tabla 6.3. Secuencias de los cebadores utilizados para la obtención de moléculas de dsDNA biotiniladas.

Clave	Secuencia 5' -> 3'
Fw_201	GGTTGCAAAACGTGTTGCAGCA
Fw_368	GGTTGTGGTGGTCAAATTCGTGC
Fw_555	GGCGAATTGAAGGAAGGCCG
Fw_732	GCCGAGCGCGCGCAACTGTTGGGAAGGGCG
Rv_Bt	/5Biosg/TCAGTGAGCGAGGAAGCGGA

6.3. Preparación de las nanoestructuras ramificadas de DNA

Para la obtención de las moléculas de dsDNA, en todos los casos se realizó una amplificación por PCR en un volumen de 50 µL, empleando al plásmido REDOX_switch_pMK-T (30 ng), el cebador directo (1 mM), cebador inverso (1 mM) y la Phire Green Hot Start II PCR Master Mix (1x), siguiendo el programa de temperaturas indicado en la tabla 6.4. Los amplicones obtenidos fueron evaluados mediante electroforesis en agarosa al 1 %, corriendo en amortiguador TAE 1x a 100 V, durante 70 minutos, y tiñendo con Sybr Safe (de manera posterior a la corrida electroforética). El fragmento de interés fue purificado por corte de banda empleando el kit GeneJET de Thermo Fisher Scientific.

Tabla 6.4. Programación del ciclo de PCR para la amplificación de dsDNA.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Repetición
Desnaturalización inicial	98 °C	30 s	1 x
Desnaturalización	98 °C	5 s	30 x
Extensión	72 °C	10 s	
Extensión final	72 °C	1 min	1 x
En espera	4 °C	∞	∞

La estandarización del proceso de autoensamblaje por hibridación de las nanoestructuras requiere de una serie de pruebas experimentales que permitan verificar la interacción entre los fragmentos a distintas proporciones molares. Para esto se realizaron experimentos con distintas proporciones de los oligonucleótidos C, L y S, en amortiguador TAE 1x con $MgCl_2$ (12.5 mM), y empleando las cinco distintas rampas de enfriamiento que se muestran en la tabla 6.5. En todos los casos se mantuvo una concentración constante del oligo C de 200 nM.

Tabla 6.5. Diferentes rampas de enfriamiento empleadas para la síntesis del núcleo central CLS.

Rampa de Enfriamiento 1 (tiempo total: 21 min)	Rampa de enfriamiento 2 $\Delta 5\text{ }^{\circ}\text{C} / 5\text{min}$ (tiempo total: 76 min)	Rampa de enfriamiento 3 $\Delta 5\text{ }^{\circ}\text{C} / 10\text{min}$ (tiempo total: 150 min)	Rampa de enfriamiento 4 $\Delta 1\text{ }^{\circ}\text{C} / 30\text{ min}$ (tiempo total: 24 h)	Rampa de enfriamiento 5 $\Delta 1\text{ }^{\circ}\text{C} / 1\text{h}$ (tiempo total: 48 h)
95 $^{\circ}\text{C}$ / 1 min 65 $^{\circ}\text{C}$ / 5 min 50 $^{\circ}\text{C}$ / 5 min 37 $^{\circ}\text{C}$ / 5 min 22 $^{\circ}\text{C}$ / 5 min	95 $^{\circ}\text{C}$ / 1 min Disminución de 5 $^{\circ}\text{C}$ cada 5 min, hasta alcanzar una temperatura de 20 $^{\circ}\text{C}$	95 $^{\circ}\text{C}$ / 1 min Disminución de 5 $^{\circ}\text{C}$ cada 10 min, hasta alcanzar una temperatura de 20 $^{\circ}\text{C}$	95 $^{\circ}\text{C}$ / 1 min 90 $^{\circ}\text{C}$ / 5 min 85 $^{\circ}\text{C}$ / 5 min 80 $^{\circ}\text{C}$ / 5 min 75 $^{\circ}\text{C}$ / 10 min Disminución de 1 $^{\circ}\text{C}$ cada 30 minutos, hasta los 4 $^{\circ}\text{C}$	95 $^{\circ}\text{C}$ / 1 min 90 $^{\circ}\text{C}$ / 5 min 85 $^{\circ}\text{C}$ / 5 min 80 $^{\circ}\text{C}$ / 5 min 75 $^{\circ}\text{C}$ / 10 min Disminución de 1 $^{\circ}\text{C}$ cada hora, hasta los 4 $^{\circ}\text{C}$

Posteriormente, se evaluó la capacidad que poseían las moléculas de dsDNA de 722 pb para ensamblarse a la estructura central, añadiendo distintas proporciones molares de los fragmentos a los núcleos CLS previamente construidos con la rampa de enfriamiento 3 ($\Delta 5\text{ }^{\circ}\text{C} / 10\text{min}$), y dejando reposar por 1 hora a temperatura ambiente.

Una vez que las proporciones estequiométricas fueron determinadas se estableció la siguiente estrategia de formación: se preparó una mezcla de oligos C (200 nM), L (600 nM) y S (600 nM) en amortiguador TAE-Mg 1x, en un volumen de

50 μ L calentando a 95 °C y enfriando con la rampa 3. A continuación se realizó una preparación con 250 ng de dsDNA de 211, 367, 539 o 722 pb, a la que se añadió la preparación CLS, ajustando para una proporción molar final de 1:3:3:6 para C:L:S:dsDNA, también con tampón TAE-Mg 1x. Las muestras se reposaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

Con esta misma estrategia también se evaluó la interacción entre el núcleo de CLS y dsDNA de 722 pb con los extremos cohesivos de 10, 15 y 20 nt.

Para fines prácticos, en esta tesis a las nanoestructuras obtenidas mediante esta estrategia se las denomina como “nanoestructuras obtenidas mediante la hibridación del núcleo CLS con dsDNA” o simplemente “nanoestructuras CLS”.

En el caso de las nanoestructuras a partir de DNA biotinilado, se prepararon soluciones con estreptavidina (14 nM) y DNA biotinilado de 732 pb (a diferentes concentraciones molares) en amortiguador TBE 0.25x, con acetato de magnesio 2 mM, dejando reposar por 16 h a temperatura ambiente. En este caso se cambió el amortiguador, en comparación con el empleado en las nanoestructuras CLS, para coincidir con la estrategia previamente reportada por Tian *et al.* (2006). La estrategia final de formación quedó de la siguiente manera: una alícuota de estreptavidina 500 nM (en agua ultrapura Milli-Q) fue mezclada con 250 ng de dsDNA de 201, 368, 555 o 732 pb, ajustando a una proporción molar final de 1:4 para estreptavidina:dsDNA y reposando a temperatura ambiente por 16 horas.

6.4. Evaluación del ensamblaje de las nanoestructuras de DNA

Para evaluar el autoensamblaje del núcleo central formado por los oligos C, L y S, se realizaron electroforesis bajo condiciones nativas en poliacrilamida al 6 % (19:1 acrilamida:bis-acrilamida), a 80 V, y en amortiguador de corrida TAE 1x, durante 60 minutos y a 4 °C.

Para analizar el autoensamblaje del núcleo central con los fragmentos de dsDNA, se realizaron electroforesis en agarosa al 1 %, con amortiguador TAE 1x, a

80 V, durante 85 minutos, a 4 °C. Para estudiar la formación de estructuras con DNA biotinilado se realizaron electroforesis en agarosa al 1 %, en tampón TBE 0.25x y las mismas condiciones.

Se realizaron electroforesis por triplicado para posteriormente llevar acabo los análisis densitométricos de las bandas con el software ImageJ.

6.5. Purificación de las nanoestructuras ramificadas

La purificación se realizó con un procedimiento de electroelución, colocando los fragmentos de agarosa dentro de una membrana de celulosa y añadiendo 300 µL de amortiguador TAE-Mg 1x. La membrana fue colocada dentro de una cámara de electroforesis, con amortiguador TAE-Mg 1x, y sometida a un voltaje de 75 V, durante 20 minutos. Finalmente se recuperó el tampón TAE y el DNA fue concentrado empleando un concentrador al vacío.

Una segunda estrategia consistió en un procedimiento de electroelución diseñado por Bellot *et al.* (2011), en el que un gel de agarosa al 1 % es preparado sobre una capa de agarosa al 4 %. La cámara es llenada con tampón de corrida, de tal manera que éste solo entre en contacto con la agarosa al 4 %. Las muestras se corren de forma habitual en el gel superior y una vez que se identifica la banda de interés, se corta un pocillo frente a ésta, para ser llenado con solución de sacarosa al 30 % en tampón TAE-Mg o TBE-Mg. El DNA de interés ingresa a dicha solución al migrar por efecto del campo eléctrico (Figura 6.4). Los creadores de esta estrategia argumentan que el gel al 4 % protege a las nanoestructuras de la fuerza ejercida por el campo eléctrico, y que la sacarosa otorga la densidad necesaria para recuperar el DNA, sin necesidad de ser concentrado posteriormente.

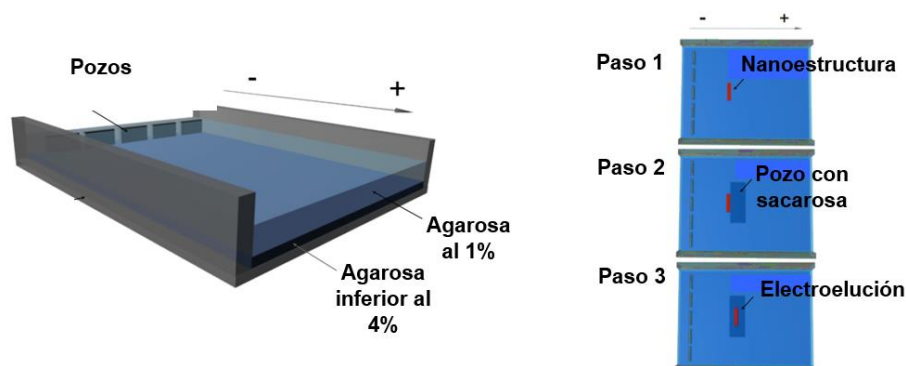


Figura 6.4. Estrategia de purificación empleando sacarosa al 30 % (Figura adaptada de Bellot *et al.*, 2011).

Adicionalmente se purificaron estructuras empleando el Kit “Freeze N’ Squeeze” de Bio-Rad, siguiendo el protocolo indicado por el proveedor, que básicamente consiste en recuperar el DNA directamente del fragmento de agarosa, sometiéndolo a una centrifugación a través de un filtro de 0.45 μm , hecho con acetato de celulosa.

6.6. Evaluación de la interacción de las proteínas C₄-B^{K12}, C₄-S₁₀-B^{K12} y C₈-B^{Sso7d} con las nanoestructuras de DNA

Para los ensayos se trabajó con nanoestructuras a una concentración final de 21 nM previamente preparadas en tampón TAE 1x con MgCl₂ 12.5 mM, en el caso de las obtenidas por hibridación; y con tampón TBE 0.25x - Mg(CH₃COO)₂ 2 mM para las de biotina-estreptavidina. A estas preparaciones se les agregaron las proteínas previamente resuspendidas en agua ultra pura (Milli-Q®) en distintos volúmenes para ajustar diferentes proporciones, y tampón Tris a una concentración final de 1 mM. Además, la proteína C₄-S₁₀-B^{K12} se encontraba previamente suplementada con DTT 1 mM. Finalmente, se les dejó reposar por una hora a temperatura ambiente. Los ensayos de movilidad electroforética fueron realizados en agarosa al 1 %, con tampón TAE 1x o TBE 0.25 X, a 80 V, durante 90 minutos y a 4 °C.

En el caso del dibloque C₄-B^{K12} y el tribloque C₄-S₁₀-B^{K12} se evaluaron distintas relaciones N/P, donde *N* es el número de grupos amino de las lisinas del bloque de unión al DNA y *P* el número de grupos fosfato presentes en dsDNA. Esto debido a que en teoría se sabe que una proteína C₄-B^{K12} se une al DNA cada 6 pares de bases, tal y como está descrito en los antecedentes. Como se desconoce la forma en que la proteína C₈-B^{Sso7d} se organiza una vez que se une al DNA, para esta molécula se decidió trabajar con distintas proporciones de moléculas de proteína por par de bases (proteína/pb).

El cálculo de los valores N/P para C₄-B^{K12} y C₄-S₁₀-B^{K12} es sencillo, pues se puede resumir en una relación entre la concentración molar de proteína y la concentración molar de DNA, ajustando esta última al número de pares de bases del DNA en los que se estima que ocurra la interacción, que como se explicó anteriormente, tiene lugar cada seis pb. Por lo que la fórmula puede resumirse de la siguiente manera:

$$\frac{N}{P} = \frac{C_P}{(C_{DNA})\left(\frac{pb}{6}\right)}$$

Donde:

C_P= Concentración final de la proteína (nM)

C_{DNA}= Concentración final del DNA (nM)

Pb= Número de pares de bases del DNA

Para calcular las proporciones proteína/pb, se empleó la siguiente fórmula previamente reportada por Estrich *et al.* (2017):

$$prtn/pb = \frac{V_P C_P}{(V_{DNA})(C_{DNA})(pb)}$$

Donde:

V_P= Volumen empleado del stock de proteína (μl)

C_P= Concentración del stock de proteína (nM)

V_{DNA}=Volumen empleado del stock de DNA (μl)

C_{DNA}= Concentración del stock de DNA (nM)

pb= Número de pares de bases del DNA

6.7. Caracterización de las nanoestructuras mediante microscopía de fuerza atómica

Las nanoestructuras sin recubrir fueron preparadas a una concentración de 4.2 nM en amortiguador TAE 1X con MgCl_2 12.5 mM, mientras que las recubiertas fueron preparadas a una concentración 21 nM (ambas concentraciones respecto a las moléculas de dsDNA). Entre 5 y 10 μL de las preparaciones se colocaron en el centro de una mica con carga negativa (el ion divalente Mg^{2+} permite la fijación del DNA), y se dejaron reposar por 5 min a temperatura ambiente; posteriormente se realizó un lavado con 500 μL de agua ultrapura Milli-Q y la muestra se secó rápidamente con aire comprimido. La mica se colocó en el piezoeléctrico del equipo de microscopía de fuerza atómica (AFM), y se programó el equipo para usar la función ScanAsyst®, que determina automáticamente las frecuencias vibracionales a las que debe ser monitoreada la muestra, con una velocidad de barrido entre 0.8 y 1 Hz, y una resolución entre 896 y 1024 muestras/línea. Finalmente, las imágenes obtenidas fueron analizadas y procesadas con el software NanoScope Analysis v 8.0 de Bruker®, mientras que para realizar mediciones se usó ImageJ, reportando el error estándar de la media.

6.8. Evaluación de la estabilidad térmica

Las nanoestructuras sin recubrir (4.2 nM) o recubiertas (21 nM) con $\text{C}_8\text{-B}^{\text{Sso7d}}$ (ptn/pb=0.5) se prepararon en una solución en amortiguador TAE 1X o TBE 0.25 x, y fueron incubadas a 37 °C y 50 °C durante distintos tiempos. Posteriormente las muestras fueron brevemente centrifugadas y depositadas en una mica para ser analizadas mediante AFM.

6.9. Evaluación de la resistencia a DNAsa I

Soluciones 25 nM (respecto al dsDNA) del DNA lineal o ramificado, recubierto ($\text{C}_8\text{-B}^{\text{Sso7d}}$, ptn/pb=0.5) o sin recubrir, fueron mezcladas con la enzima DNAsa I a 0.4 U/ μg de DNA en un tampón de reacción (20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 2 mM MgCl_2). A continuación, las preparaciones fueron incubadas a 37 °C y después de tiempos

específicos de incubación se tomaron alícuotas de 5 μ L para ser mezcladas con 5 μ L de EDTA 50 mM, incubándolas en hielo, con el objetivo de detener la actividad de la DNAsa. Las muestras tomadas se analizaron mediante electroforesis en agarosa al 1 % a un voltaje de 80 V, y empleando TAE 1x o TBE 0.25x (estructuras CLS y estructuras biotina-estreptavidina, respectivamente). Adicionalmente, se tomaron 5 μ L de las muestras a distintos tiempos de incubación para ser evaluadas mediante microscopía de fuerza atómica, con el procedimiento habitual.

6.10. Planteamiento de futuras construcciones

Para averiguar si el ssDNA circular M13mp18 era capaz de hibridar de manera estable con pequeñas moléculas de ssDNA, se diseñaron dos oligonucleótidos (denominados 42c32 y 42c32c) complementarios entre sí en 32 nt, y que además tenían una región complementaria al DNA M13mp18, de 42 nt, de tal manera que se organizaran como se indica en la figura 6.5, uniendo dos moléculas de M13mp18. Las secuencias de estos dos oligonucleótidos pueden encontrarse en el Anexo G.

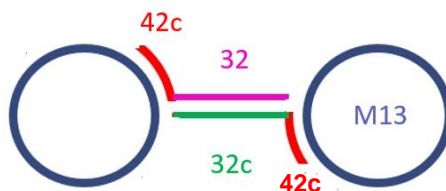


Figura 6.5. Hibridación del ssDNA circular M13mp18 con oligonucleótidos complementarios.

Inicialmente se evaluó la hibridación de ambos oligonucleótidos a proporciones equimolares para posteriormente añadirlos en exceso en una solución con amortiguador TAE-Mg 1x del ssDNA M13mp18. Las evaluaciones se realizaron por medio de electroforesis en agarosa al 1 % y en microscopía de fuerza atómica, siguiendo el procedimiento habitual.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Evaluación de la formación de la estructura central CLS empleando las diferentes rampas de enfriamiento

En la figura 7.1. se observa la formación de ensamblados con los oligos C, L y S a distintas proporciones molares, usando las diferentes rampas de enfriamiento. En todos los geles de esta figura se considera que la banda de mayor tamaño (cercana al marcador de peso molecular de 200 pb) corresponde a la estructura CLS formada por la hibridación completa de todos los oligonucleótidos (1 oligo C, 3 oligos L y 3 oligos S), mientras que las bandas por debajo de ésta corresponden a intermediarios en los que no se ensamblaron uno o más oligonucleótidos. Además, las tres bandas más inferiores pertenecen a los oligos C, L y S sin hibridar, con tamaños respectivos de 78 nt, 48 nt y 27 nt. Es importante notar que las muestras analizadas no migran de la misma manera que el marcador de peso molecular de doble cadena, esto en parte porque los oligonucleótidos son de cadena sencilla, y sobre todo porque el ensamblado CLS adquiere una configuración ramificada. Previamente ya se ha reportado que el desplazamiento de nanoestructuras ramificadas varía en comparación con el del DNA lineal (He y Mao, 2006; Tian *et al.*, 2006; Rudiuk *et al.*, 2013).

Al preparar soluciones con los tres oligos, sin haber calentado ni sometido a una rampa (figura 7.1a), se observa la aparición de bandas con tamaños superiores a los de los oligonucleótidos individuales, lo cual indica que éstos manifiestan un fenómeno de hibridación, sin embargo, también se nota un número considerable de bandas de tamaños intermediarios. Con la rampa 1, de un tiempo total de 21 min (disminución rápida de la temperatura), y la rampa 2, que tarda 76 minutos en completarse, también se notó un número considerable de bandas intermediarias, lo cual es poco deseable en términos de eficiencia de un proceso de autoensamblaje. He y Mao (2006) reportan un alto rendimiento, y sin intermediarios, en la formación de nanoestructuras ramificadas a partir de tres fragmentos de ssDNA y con una rampa de enfriamiento de tan solo 21 minutos, esta variación en la eficiencia podría

deberse a que ellos emplearon un fragmento central C circularizado covalentemente, y no lineal como en este caso. Cabe mencionar que con la rampa 2, de disminución de 5 °C cada 5 min, sí se observó una disminución en la formación de estructuras intermediarias al usar una proporción CLS 1:3:6 y 1:6:6, aunque teóricamente esto debería ocurrir a una proporción CLS 1:3:3, pues el fragmento C tiene la capacidad de hibridar con 3 fragmentos L.

Finalmente, al evaluar la rampa de enfriamiento 3, con disminuciones de 5 °C cada 10 min (150 min totales), la rampa 4, con disminución de 1 °C cada 30 minutos (24 horas totales), y la rampa 5, de 1 °C cada hora (48 horas totales), se logró observar la formación de la banda superior correspondiente al núcleo central CLS, y la nula presencia de bandas intermediarias cuando los oligos se combinaron en proporciones molares C:L:S de 1:3:3, 1:3:6, 1:6:3 y 1:6:6. Lo anterior puede deberse a que una rampa de enfriamiento lenta favorecería una disminución de los procesos espontáneos de ensamblaje y desensamblaje que ocurren durante la hibridación de las moléculas de ssDNA (Vologodskii, 2015). Sin embargo, en los 3 casos se observa que un número considerable de oligos L y S se mantienen en su estado libre y no se asocian a la estructura central. A pesar de esto, la nula presencia de bandas intermediarias y la formación de la banda superior correspondiente al núcleo CLS se pueden considerar como resultados exitosos para los fines de este proyecto, por lo que para los experimentos posteriores se decidió trabajar con los oligonucleótidos C, L y S a proporciones molares 1:3:3, sometiéndolos a la rampa de enfriamiento 3, con una disminución de 5 °C cada 10 min.

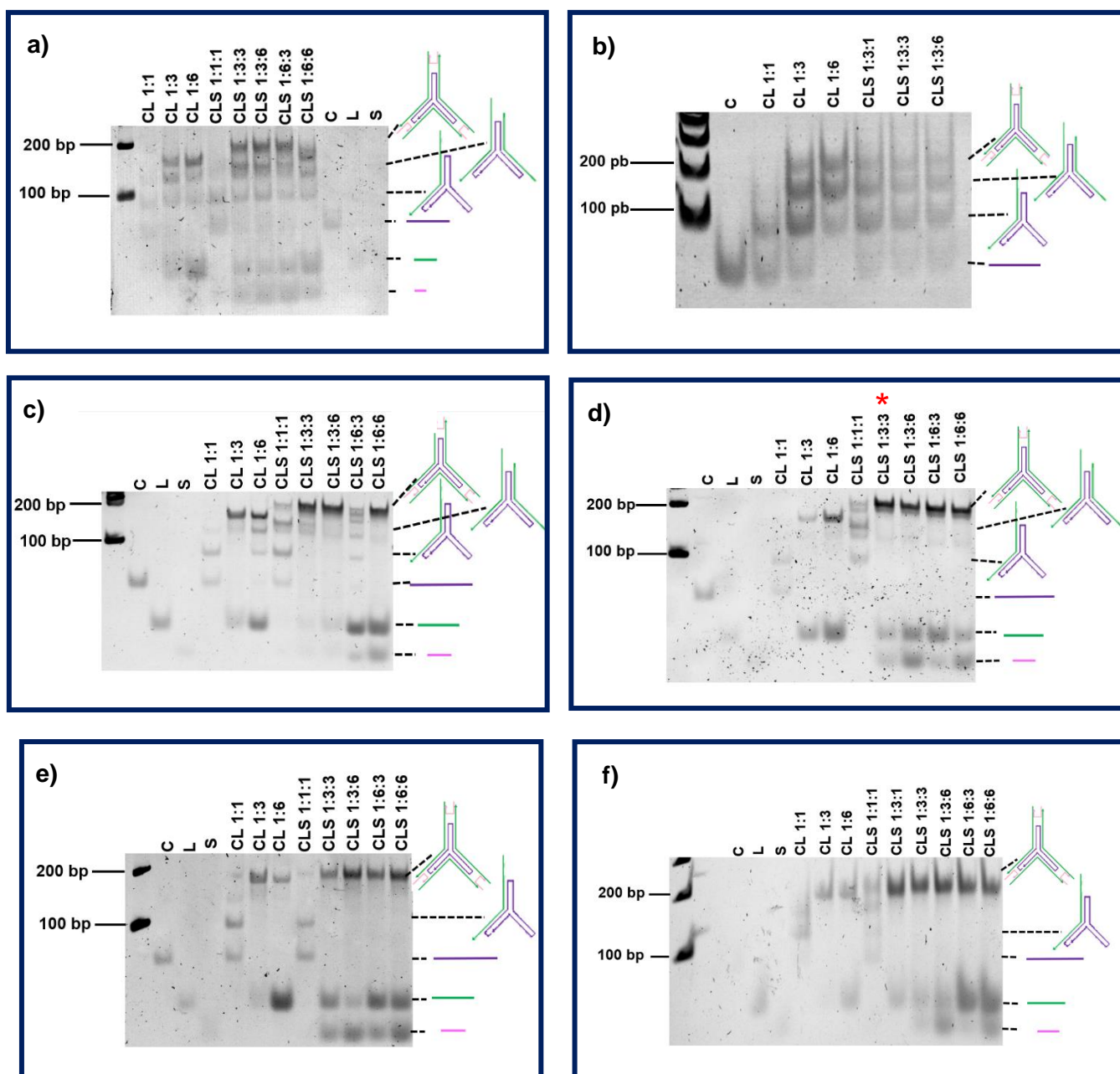


Figura 7.1 Formación de ensamblados CLS a distintas proporciones molares: a) sin rampa de enfriamiento. Con rampa de enfriamiento de b) 21 min, c) 76 min (disminución de 5 °C/5min), d) 150 min (disminución 5 °C/10min), e) 24 h (disminución de 1 °C/30min) y f) 48 h (disminución de 1 °C/h). En el lado derecho de cada electroforesis se indica con figuras la migración del ensamblado completo CLS, así como de algunos posibles intermediarios y de los oligonucleótidos individuales C (morado), L (verde) y S (rosado). La estrella roja indica la estequiometría y el tratamiento térmico seleccionados para experimentos subsiguientes.

7.2. Producción de dsDNA

En la figura 7.2 se observan diversos amplicones de los fragmentos de 722 pb obtenidos mediante PCR, con y sin el espaciador de trietilenglicol (Sp) y con los extremos cohesivos de 10, 15 y 20 nt (Oh_x), así como una molécula de dsDNA con dos extremos cohesivos de 10 nt, en los que uno no es complementario a la estructura central CLS. Se puede notar que no se obtuvieron productos inespecíficos.

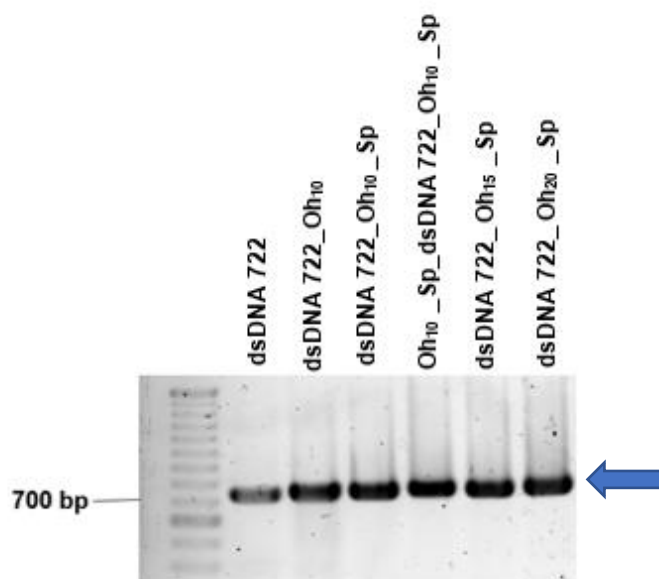


Figura 7.2. Diversos amplicones, obtenidos mediante PCR, de la molécula de dsDNA de 722 pb. Oh_x : secuencia complementaria (overhang) al núcleo CLS, donde x puede ser 10, 15 o 20 nt. Sp: Espaciador de trietilenglicol.

Por otra parte, en la figura 7.3 se observan diversos amplicones obtenidos mediante PCR, de los fragmentos de 732 pb con la molécula de biotina en el extremo 5', de nueva cuenta se puede notar que no se obtuvieron productos inespecíficos.

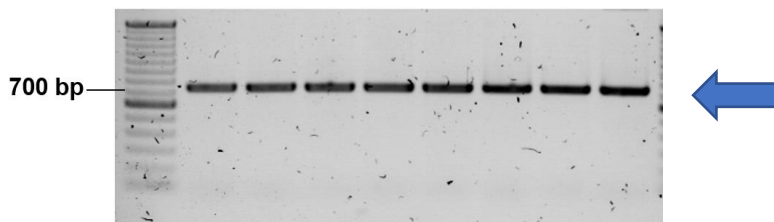


Figura 7.3. Electroforesis de los amplicones biotinilados de 732 pb, evaluados directamente de la reacción de PCR.

7.3. Evaluación de la interacción de la estructura central CLS con dsDNA de 722 pb

En la figura 7.4 se puede notar el comportamiento de los distintos fragmentos de 722 pb al hibridar con el fragmento L a proporción molar 1:1. Fácilmente se identifica que en el fragmento sin la secuencia complementaria y el fragmento sin el espaciador no ocurre una hibridación con el oligo L, mientras que en los otros 4 sí. La hibridación está indicada por la desaparición de la banda correspondiente al oligo L, pues esta se desplaza con la molécula de 722 pb. Con esta sencilla prueba se verifica la función de la molécula de trietilenglicol para obtener extremos cohesivos mediante PCR.

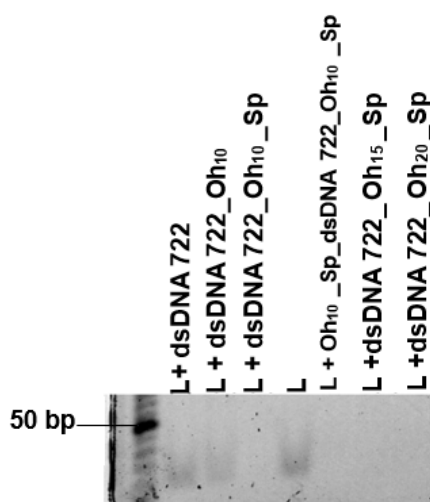


Figura 7.4. Hibridación del oligo L con las moléculas de dsDNA con distintos extremos cohesivos complementarios.

A continuación, se evaluó el ensamblaje entre el núcleo central CLS, preparado previamente con la rampa de disminución de 5 °C cada 10 min, y el dsDNA de 722 pb con los diferentes extremos cohesivos. En la figura 7.5a se puede observar que con una proporción C:L:S:dsDNA de 1:3:3:6 (exceso de dsDNA de 6 veces respecto al oligo C) se presentaron hasta 5 bandas con distintos desplazamientos, que corresponderían a las nanoestructuras con un número de hasta 5 ramificaciones. Hay que recordar que, según el diseño del nudo central, se deberían encontrar estructuras con hasta 6 ramificaciones, por lo que teóricamente deberían observarse 6 bandas distintas. Es posible que la alta densidad de moléculas de

dsDNA en el centro de la estructura sea responsable de un bajo rendimiento de la estructura con 6 ramificaciones, debido a fenómenos de impedimento estérico y repulsión de cargas (Bila *et al.*, 2019), por lo que cual no pueden ser identificadas mediante esta técnica. Adicionalmente, no se observa la presencia de estas 5 bandas con aquellas moléculas de dsDNA que no tienen el espaciador de trietilenglicol (Sp).

El análisis de densitometría (Figura 7.5b) de estas electroforesis permite identificar que con el extremo cohesivo de 10 nt se obtiene un porcentaje mayor de estructuras con más ramificaciones respecto a los que tienen 15 y 20 nt.

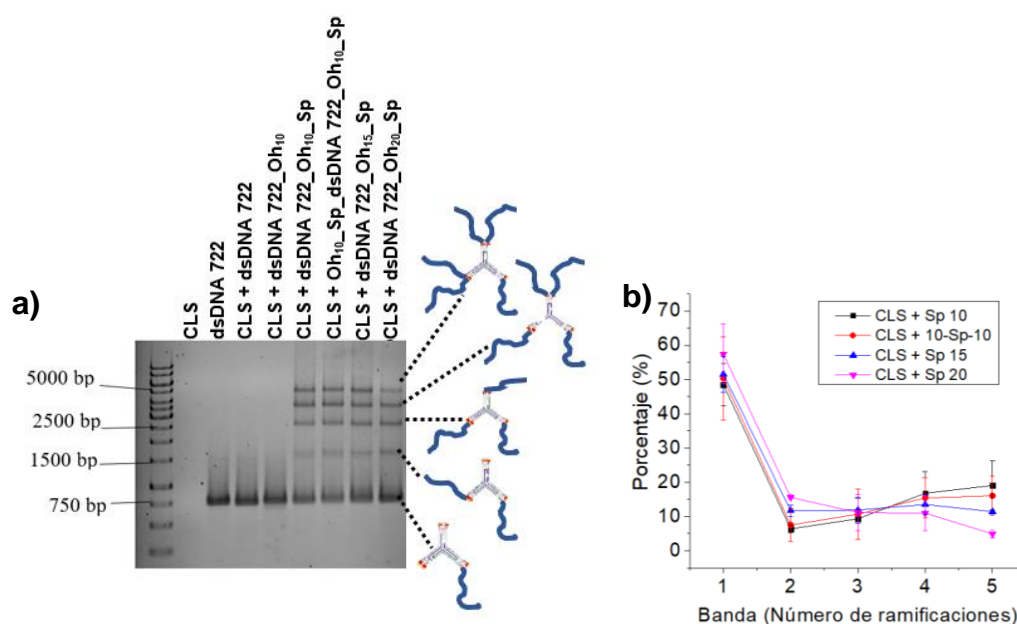


Figura 7.5. Formación de nanoestructuras ramificadas por hibridación con dsDNA de 722 pb. La proporción molar de C:L:S:dsDNA es de 1:3:3:6. a) Electroforesis con dsDNA de 722 pb con extremos cohesivos de diferentes tamaños. b) Análisis densitométrico indicando el porcentaje correspondiente a cada una de las bandas. Se indica la desviación estándar de los triplicados.

Por otra parte, al evaluar proporciones molares 1:3:3:3 y 1:3:3:10 se observó que el porcentaje de estructuras con más ramificaciones resultó menor a comparación de las preparadas con la proporción teórica 1:3:3:6. (Figura 7.6). Esto indica que una proporción diferente a la estequiometría ideal desfavorece la formación de las estructuras ramificadas. En el caso de estequiometrías menores

esto se debe a que las moléculas de dsDNA no son suficientes para saturar todos los extremos cohesivos en el centro CLS; sin embargo, con un exceso de dsDNA la alta densidad de cargas negativas podría desfavorecer la unión y formación de la estructura ramificada (Bila *et al.*, 2019).

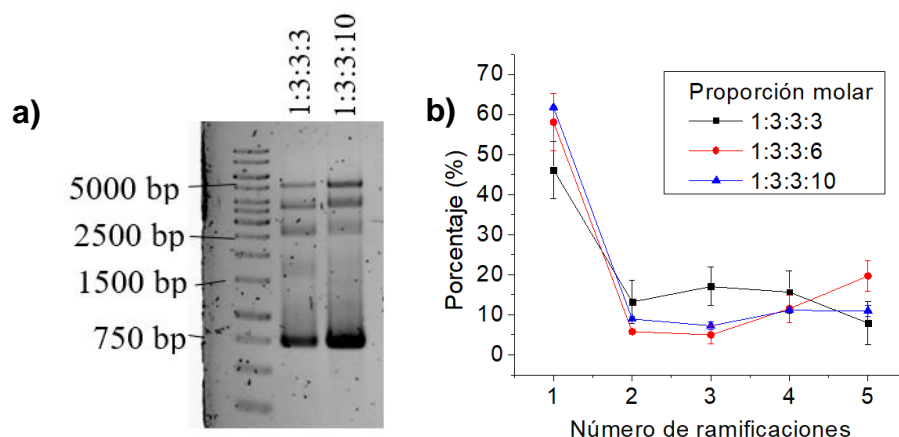


Figura 7.6. Comparación en la formación de nanoestructuras ramificadas por hibridación. C:L:S:dsDNA en proporciones 1:3:3:3 y 1:3:3:10. a) Electroforesis. b) Análisis densitométrico. Se indica la desviación estándar de los triplicados (Para la electroforesis de la proporción 1:3:3:6 consultar la figura 7.5).

7.4. Formación de estructuras ramificadas con los ensamblados CLS y los fragmentos de dsDNA de cuatro tamaños distintos

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se llevó a cabo la producción de moléculas de dsDNA de 211, 367 y 539 pb, todas conteniendo el espaciador de trietilenglicol y un extremo cohesivo de 10 nt. Posteriormente, los distintos fragmentos fueron mezclados con la estructura CLS a un exceso molar 6 veces mayor respecto al oligo C. La figura 7.7 muestra los fragmentos de dsDNA lineales y ramificados. En las figuras se puede notar que la longitud de las moléculas no tuvo un efecto significativo en la formación de estructuras, y en todos los casos se identificó un máximo de 5 bandas, correspondiente con estructuras de hasta 5 ramificaciones. Esto indica que el proceso de formación está más influenciado por

la alta densidad de DNA en el centro de la estructura, que por la totalidad de cargas negativas asociadas al tamaño total de cada cadena de dsDNA.

Para fines prácticos, las formaciones son denominadas en este escrito como estructuras obtenidas por hibridación con el nudo CLS, o simplemente nanoestructuras CLS.

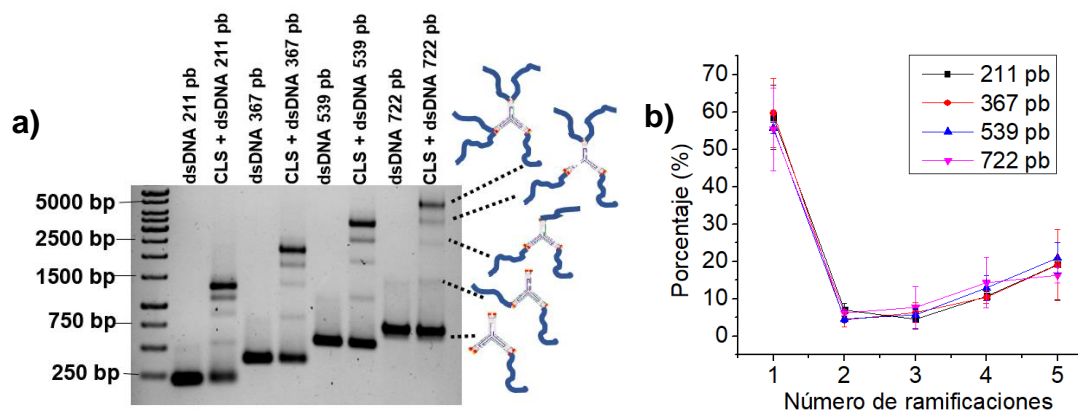


Figura 7.7. Formación de nanoestructuras con ramificaciones de distintas longitudes mediante hibridación con el núcleo central CLS. a) Electroforesis. b) análisis densitométrico, donde se indica la desviación estándar de los triplicados. Todas las moléculas de dsDNA contienen la secuencia complementaria a CLS (Oh_x) y el espaciador de trietilenglicol (Sp).

7.5. Formación de nanoestructuras ramificadas mediante la interacción entre dsDNA biotinilado y estreptavidina

Se prepararon diferentes proporciones molares de estreptavidina: dsDNA (732 pb). En la figura 7.8 se observa la caracterización electroforética de las construcciones, pudiéndose notar hasta 4 bandas de diferente tamaño, que corresponderían con las estructuras con un número máximo de 4 ramificaciones. La banda inferior podría corresponder a dsDNA biotinilado libre o a una molécula de estreptavidina asociada a una de dsDNA; bajo las condiciones evaluadas es imposible diferenciar entre éstas.

El análisis densitométrico (figura 7.8b) permite determinar que, si bien las proporciones 1:3 y 1:4 tienen un porcentaje mayor de estructuras de 3 y 4 ramificaciones respecto a las otras proporciones, la diferencia no se puede considerar como significativa. Cabe destacar que con la proporción molar más baja (1:1) se obtuvo un mayor porcentaje de estructuras con 2 ramificaciones respecto a proporciones más elevadas. Este comportamiento ya había sido previamente reportado por Niemeyer *et al.* (1999). Sus análisis de densitometría arrojaron que aún a excesos molares de dsDNA 5 veces mayores respecto a la estreptavidina, las bandas correspondientes a 3 y 4 ramificaciones solo estuvieron presentes en un 5-10 %, y argumentaron que este mismo sistema es más estable en un acomodo divalente.

Si bien la interacción entre biotina y estreptavidina es una de las interacciones no covalentes más fuertes de la naturaleza ($K_D = 10^{-14}$ M), se ha observado que tal comportamiento se ve afectado cuando la biotina se une a DNA. Kennedy (2017) señala que este fenómeno se debe a la alta densidad de cargas negativas de los grupos fosfato. Además, se explica que la interacción con moléculas de ssDNA biotiniladas es más estable, debido a que posee un mayor número de ángulos de rotación a comparación del dsDNA. De esta manera, la presencia de varias moléculas de doble cadena en el centro de la estructura causaría un impedimento estérico, que se minimiza con las moléculas de cadena sencilla debido a que poseen mayor flexibilidad.

Para contrarrestar el efecto de las cargas Tian *et al.* (1999) adicionaron acetato de magnesio al amortiguador TBE. En experimentos posteriores, Rudiuk *et al.* (2013) adicionaron además NaCl 0.2 M, incrementando el porcentaje de estructuras con 3 y 4 ramificaciones. Sin embargo, en este proyecto únicamente se evaluó la metodología establecida por el grupo de Tian, a fin de que el recubrimiento proteico fuera comparable con las estructuras obtenidas por hibridación con el núcleo CLS.

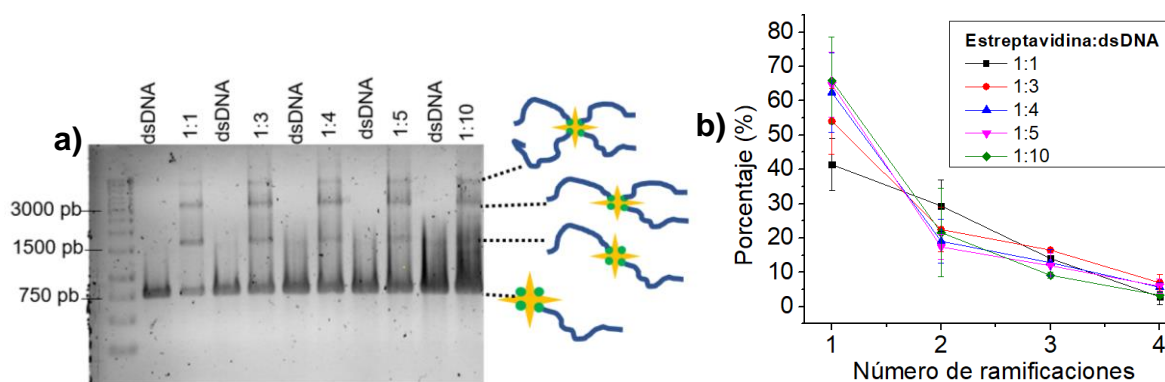


Figura 7.8. Formación de nanoestructuras con distintas proporciones estreptavidina:dsDNA biotilado 732 pb. Las columnas etiquetadas como dsDNA corresponden al control de dsDNA biotilado sin estreptavidina. a) Electroforesis, b) Análisis densitométrico donde se indica la desviación estándar de los triplicados.

Con base en los resultados anteriores, se prepararon mezclas a proporción 1:4 (estreptavidina:dsDNA) con los 4 distintos fragmentos de 201, 368, 555 y 732 pb. En todos los casos se identificaron 4 bandas, correspondientes con estructuras de hasta 4 ramificaciones. La intensidad de las bandas indica que la longitud de las moléculas no tuvo un efecto cuantificable en la formación de las estructuras con 3 y 4 ramificaciones (Figura 7.9). A partir de esto se puede hipotetizar que el ensamblaje es afectado por la alta densidad de moléculas en el núcleo, mientras que los nucleótidos presentes en la periferia no tienen tal efecto.

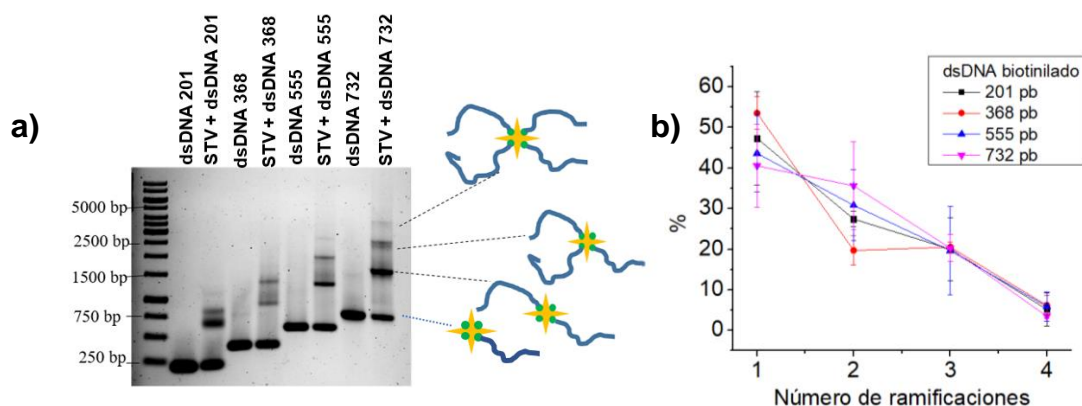


Figura 7.9. Formación de nanoestructuras ramificadas con dsDNA biotilado de distintas longitudes. Proporción streptavidina: dsDNA = 1:4. A) Electroforesis, b) Análisis densitométrico. Se indica la desviación estándar de los triplicados.

7.6. Caracterización de las nanoestructuras mediante microscopía de fuerza atómica

En la figura 7.10 se observan las nanoestructuras construidas por hibridación de dsDNA con el núcleo CLS, verificándose la formación de estructuras con 3, 4, 5 y 6 ramificaciones. Cada uno de los brazos posee distintas orientaciones, lo que inmediatamente denota flexibilidad, y las ramificaciones presentaron una longitud experimental de 67.8 ± 4.2 , 123 ± 4.9 , 170.8 ± 8.04 y 238.9 ± 5.5 nm, correspondiendo a moléculas de dsDNA de 211, 367, 539 y 722 pb, respectivamente. Estos valores se acercan a los respectivos valores teóricos de 71.7, 125.0, 183.3 y 249.0 nm. La altura en el eje Z del DNA tuvo un valor promedio de 0.85 ± 0.04 nm, mientras que en la zona central, con mayor densidad de dsDNA, la altura fue de 1.23 ± 0.13 nm. En la figura 7.11 se presenta un corte representativo en el eje Z.

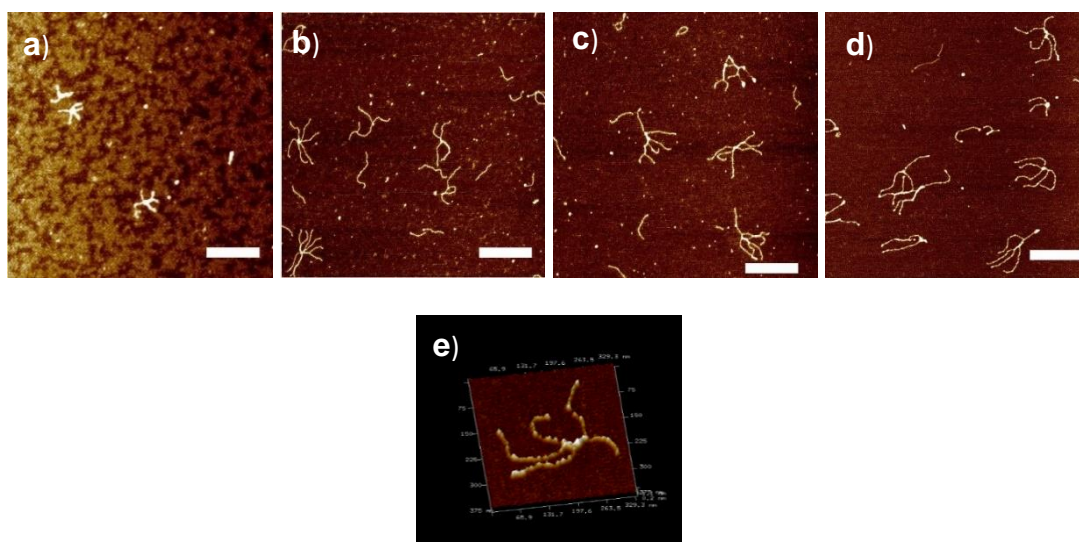


Figura 7.10. AFM de las nanoestructuras obtenidas por hibridación con CLS. a) Ramificaciones de 211 pb, b) ramificaciones de 367 pb, c) ramificaciones de 539 pb, d) ramificaciones de 722 pb, e) vista tridimensional de una estructura con ramificaciones de 722 pb. Barra de escala: 300 nm (área: $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$).

Diversas investigaciones han demostrado que las variaciones entre las dimensiones teóricas del DNA y las experimentales están sujetas a ciertas variables como el proceso de fijación y secado de la muestra, el tipo de superficie, y por

supuesto, la resolución de la punta, que generalmente posee un radio de 10nm (Pyne y Hoogenboom, 2016; Pang *et al.*, 2015; Marek *et al.*, 2005; Rivetti y Codeluppi, 2001).

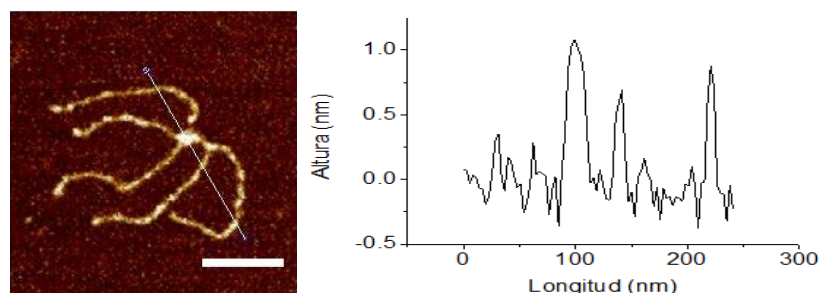


Figura 7.11. Corte en eje Z de una nanoestructura ramificada obtenida mediante hibridación del núcleo CLS y dsDNA de 722 pb. Barra de escala: 100 nm.

Por su parte, la figura 7.12 permite observar la formación de estructuras con 3 y 4 ramificaciones a partir de la interacción entre la molécula de estreptavidina y el dsDNA biotinilado. Cabe destacar que en las imágenes de microscopía se observa una elevación en el centro de la nanoestructura con una altura promedio de 3.38 ± 0.11 nm, que corresponde con la molécula de estreptavidina. Las ramificaciones de 201 pb presentaron una longitud experimental de 60.7 ± 3.6 nm, las de 368 pb midieron 119 ± 3.8 nm, aquellas de 555 pb tuvieron un valor de 185 ± 5.6 nm y las de 732 pb midieron 244.9 ± 4.7 nm, acercándose a los valores teóricos de 68.3 nm, 125 nm, 189 y 249 nm, respectivamente. La figura 7.13 muestra una imagen representativa del perfil de altura en el eje Z.

Pueden consultarse imágenes de $5 \times 5 \mu\text{m}$ para ambas estrategias en el Anexo C. En la figura 7.14 se observan acercamientos (400×400 nm) para las estructuras obtenidas con ambas estrategias.

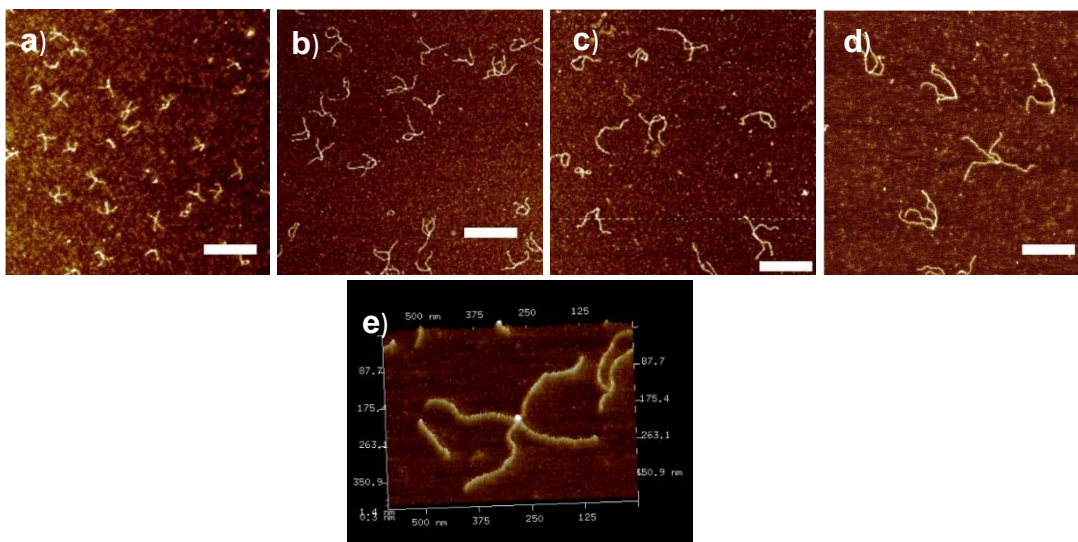


Figura 7.12. AFM de las nanoestructuras obtenidas mediante interacción entre estreptavidina y dsDNA biotinilado. a) Ramificaciones de 201 pb, b) ramificaciones de 368 pb, c) ramificaciones de 555 pb, d) ramificaciones de 732 pb, e) vista tridimensional de una estructura con ramificaciones de 732 pb. Barra de escala: 300 nm (área: 1.5 x 1.5 μm).

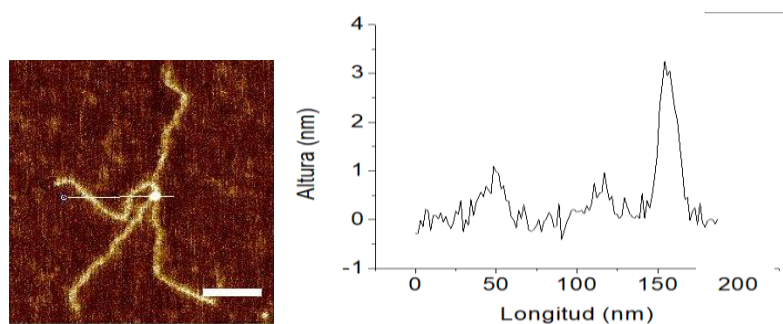


Figura 7.13. Corte en eje Z de una nanoestructura ramificada obtenida mediante interacción con estreptavidina. Barra de escala: 100 nm.

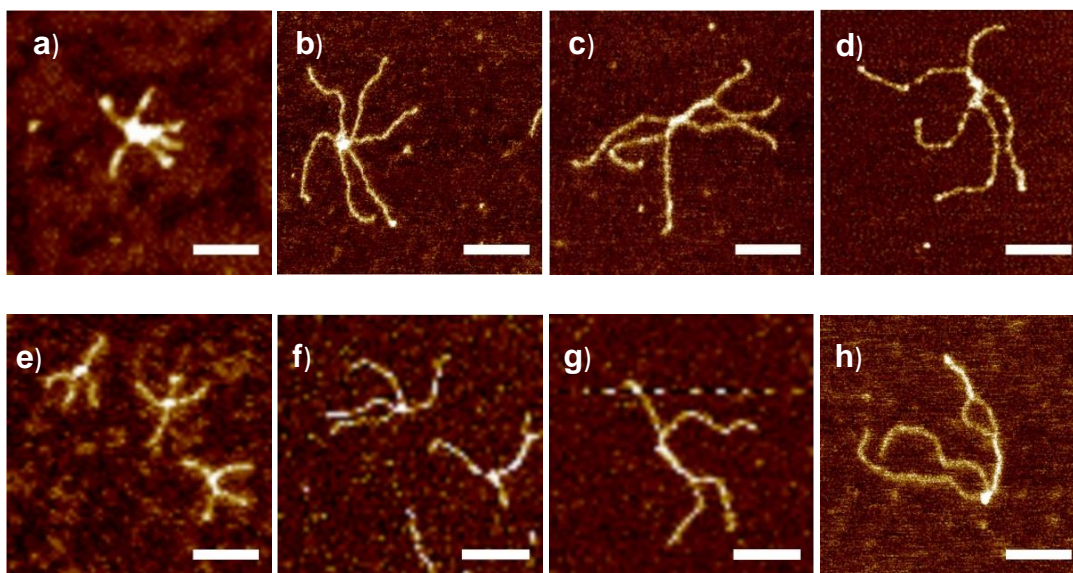


Figura 7.14. Acercamientos de las micrografías de AFM para las nanoestructuras obtenidas por ambas estrategias. Nanoestructuras ramificadas CLS con: a) dsDNA de 211 pb, b) dsDNA de 367 pb, c) dsDNA de 539 pb y d) dsDNA de 722 pb. Nanoestructuras ramificadas mediante interacción de estreptavidina con: e) dsDNA de 201 pb, f) dsDNA de 368 pb, g) dsDNA de 555 pb y h) dsDNA de 732 pb. Barra de escala: 100 nm (área: 400 x 400 nm).

7.7. Efecto de técnicas de purificación sobre la estabilidad de las nanoestructuras ramificadas

La elección de la técnica adecuada para purificar nanoestructuras de DNA es problemática pues depende de ciertos factores, como la estrategia empleada para su construcción, su forma y su composición (Shaw *et al.*, 2015; Bellot *et al.*, 2011)

Tradicionalmente, este tipo de construcciones han sido purificadas cortando el fragmento de agarosa con la banda de interés y aplicando un campo eléctrico para eluir al DNA. Además, recientemente se ha extendido el uso de sistemas de purificación como el Kit “Freeze n’ Squeeze” que hace uso de fuerzas mecánicas (Meyer, 2017). Después de haber realizado las purificaciones mediante los tres procedimientos descritos en la metodología, se realizaron electroforesis en agarosa al 1 % para evaluar la integridad de los constructos.

Se observó que las construcciones perdieron la conformación ramificada con cualquiera de los tres métodos. Como ejemplo se tiene la figura 7.15, donde se puede observar que en todos los casos ocurrió una disociación de las ramificaciones.

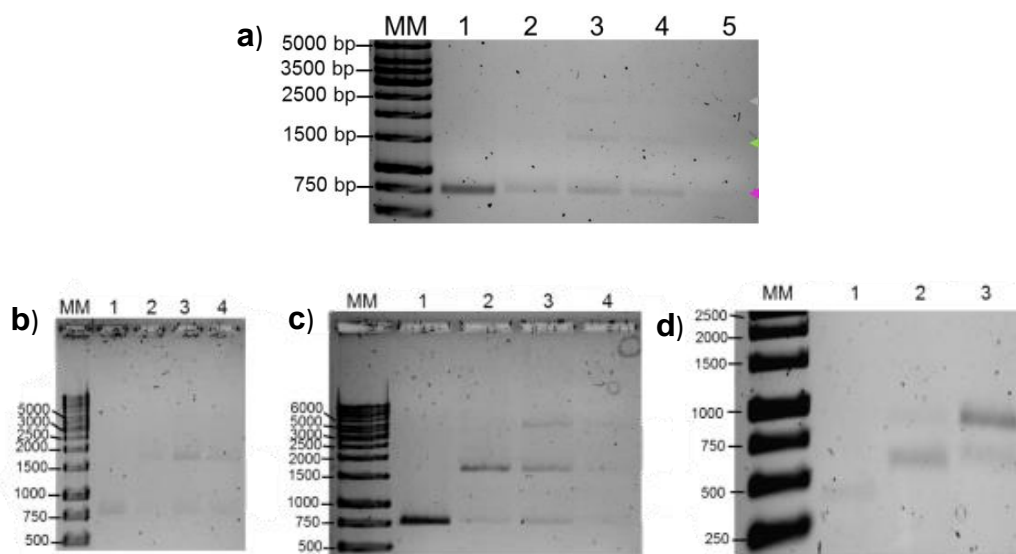


Figura 7.15. Efecto de la purificación por métodos electroforéticos. a) Estructuras CLS con ramificaciones de 722 pb después de haber sido purificadas por electroelución en membrana. b) Estructuras con estreptavidina y dsDNA biotinilado de 732 pb purificadas por electroelución en membrana. c) Estructuras con estreptavidina y dsDNA de 732 pb purificadas por electroelución en solución de sacarosa. d) Estructuras biotina-estreptavidina de 368 pb después de su purificación con el kit Freeze N' Squeeze. En las etiquetas superiores se indica el número de ramificaciones que la estructura tenía antes de la purificación.

Es importante recordar que el proceso de autoensamblaje es espontáneo y reversible. La purificación mediante electroelución en membrana de diálisis es muy usada con dsDNA lineal, pero lo observado en este experimento parece indicar que el campo eléctrico aunado a otros parámetros como variaciones en la concentración de sales, es capaz de desestabilizar conformaciones más complejas. A esto también se suman las fuerzas mecánicas asociadas a la migración de las construcciones a través de los poros de la agarosa, así como el incremento en la temperatura del tampón de corrida (Meyer, 2017; Shaw *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2013), sin olvidar que, en la región central de las nanoestructuras existe una alta densidad de DNA que

contribuirían a la desestabilización por efecto del impedimento estérico y la repulsión de cargas.

Los métodos de electroelución en sacarosa y el de Freeze n´ Squeeze han demostrado ser altamente efectivos para estructuras de origami, pues se han reportado rendimientos de purificación superiores al 70 % (Bellot *et al.*, 2011). Sin embargo, hay que considerar que la formación de estas construcciones requiere de la hibridación de cientos de oligonucleótidos que estabilizan la estructura. En el caso de las estructuras ramificadas de este proyecto, la unión de cada una de las moléculas de dsDNA depende de solo 10 nt, por lo que termodinámicamente son más vulnerables al desensamblaje (Vologodskii, 2015). En el caso de las estructuras con estreptavidina, es sabido que la interacción biotina-estreptavidina, sin DNA de por medio, es estable en un amplio rango de condiciones de temperatura y pH (González *et al.*, 1999; Chivers *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2011; Waner *et al.*, 2019), además se ha demostrado su resistencia ante condiciones electroforéticas (Humbert *et al.*, 2005; Brüning *et al.*, 2016). Lo anterior permite sugerir que el desensamblaje surge por efecto de las moléculas dsDNA, que afectan directamente la unión de la biotina, sobre todo como consecuencia de las fuerzas mecánicas de migración que actúan sobre la doble hélice. No se encontraron reportes previos para sustentar esta hipótesis, por lo que experimentos adicionales serían necesarios para comprender con mayor detalle el mecanismo de desensamblaje de este tipo de nanoestructuras.

Si bien, el objetivo de esta tesis es demostrar la formación de estructuras ramificadas y evaluar su recubrimiento proteico, en futuras aplicaciones será necesario purificar a las nanoestructuras según el número de ramificaciones, y para esto podría ser necesario formar enlaces covalentes, ya sea entre los nucleótidos, mediante el uso de ligasas u otras modificaciones, o entre DNA y proteína, mediante entrecruzamientos covalentes. La técnica a evaluar dependerá de la aplicación que se quiera llevar a cabo, y también de las moléculas con las que se desee funcionalizar a las nanoestructuras (Jones, Seeman y Mirkin, 2015).

7.8. Evaluación de la interacción de las proteínas C₄-B^{K12}, C₄-S₁₀-B^{K12} y C₈-B^{Sso7d} con las nanoestructuras de DNA

Los resultados de los ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA) permiten afirmar que las proteínas de diseño sí son capaces de interactuar con las nanoestructuras de DNA mediante interacciones no covalentes. En la figura 7.16 se observa el comportamiento de las proteínas al interactuar con las estructuras obtenidas por hibridación del núcleo CLS con dsDNA de 367 y 722 pb. En el caso del dibloque C₄-B^{K12}, el primer cambio de la movilidad ocurre a una relación N/P (amino de proteína/fosfato del DNA) de 0.5, pero el punto de neutralización, manifestado por un mínimo desplazamiento de la banda, se encuentra por encima de 2. En el caso de la proteína C₄-S₁₀-B^{K12}, ocurre un fenómeno similar, aunque la saturación en ambas estructuras se observa a una N/P de 4 para las estructuras con ramificaciones de 367 pb y de 8 para las de 722 pb. Un valor más alto de esta proteína, respecto al dibloque, podría deberse a la competencia existente entre el dominio de autoensamblaje (S₁₀) y el de unión al DNA; el primero por sí solo podría favorecer la interacción entre las proteínas en estado libre, y de esta forma reducir la cantidad de proteína disponible para su unión con el DNA (Cazares-Vargas *et al.*, 2019). Para la proteína C₈-B^{Sso7d}, se observa que la neutralización se alcanza a una relación proteína/pb igual o mayor a 0.25. Cabe recordar que, como se describió en la metodología, para la proteína C₈-B^{Sso7d} no se reportan las proporciones N/P, pues se desconoce la manera en que las cargas positivas del dominio de unión interactúan con las cargas negativas del DNA. En el caso de las estructuras de DNA biotinilado de 368 y 732 pb, el comportamiento para las tres proteínas es muy similar, como se observa en figura 7.17. A partir de estos resultados, para las siguientes caracterizaciones se decidió trabajar con una N/P de 4 para C₄-B^{K12}, N/P de 8 para C₄-S₁₀-B^{K12} y una proporción proteína/pb de 0.5 para C₈-B^{Sso7d}. Estos excesos son para garantizar el recubrimiento.

En experimentos previos se había reportado la neutralización de dsDNA lineal con valores de N/P de 1 para C₄-B^{K12} y C₄-S₁₀-B^{K12} (Hernández García *et al.*, 2012; Hernández García *et al.*, 2014). Sin embargo, para las estructuras ramificadas se

requirieron cantidades mucho mayores. Uno de los motivos podría ser la presencia de las sales de magnesio, requeridas para la formación de las nanoestructuras, las cuales podrían entrar en competencia con las lisinas del bloque de unión. Esta hipótesis se refuerza por el hecho de que con la proteína C₈-B^{Sso7d}, cuya unión es específica al DNA y no depende únicamente de interacciones electrostáticas, se obtuvo el mismo valor de proteína/pb (0.25) reportado anteriormente para dsDNA lineal (Hernández García *et al.*, 2017). Es de destacar que con la proteína C₄-S₁₀-B^{K12} se observó que las nanoestructuras con mayor tamaño de ramificaciones requirieron una mayor cantidad de proteína, esto podría ser efecto del impedimento estérico; es decir, si visualizamos las ramificaciones como una esfera (Aloorkar *et al.*, 2012), a mayor longitud de las cadenas, estas ocupan un volumen mayor que podría ralentizar la interacción con la proteína.

Por otra parte, para fines comparativos entre las tres proteínas, se realizó una conversión de los valores de N/P de C₄-B^{K12} y C₄-S₁₀-B^{K12} a valores de proteína/pb, lo cual se muestra en la tabla 7.1. Esto permite observar que con C₈-B^{Sso7d} se requiere una menor proporción proteína/pb para lograr un efecto neutralizante que se asemeje al de C₄-B^{K12} y C₄-S₁₀-B^{K12}.

Es importante notar que, para ambos tipos de estructuras, y con las dos longitudes evaluadas, el cambio de movilidad con las proteínas C₄-B^{K12} y C₄-S₁₀-B^{K12} ocurre en todas las nanoestructuras al mismo tiempo, es decir las 4 o 5 bandas se desplazan simultáneamente; mientras que con la proteína C₈-B^{Sso7d}, las bandas superiores se desplazan antes que las inferiores. Con esta observación se puede inferir que la unión de las proteínas que poseen el dominio de lisinas es independiente del número de ramificaciones, lo cual se explica porque el ensamblaje únicamente se rige por interacciones electrostáticas con el DNA. Por el contrario, la interacción entre C₈-B^{Sso7d} y las nanoestructuras sí podría depender del número de ramificaciones, pero será necesario realizar experimentos más detallados para confirmar esta hipótesis.

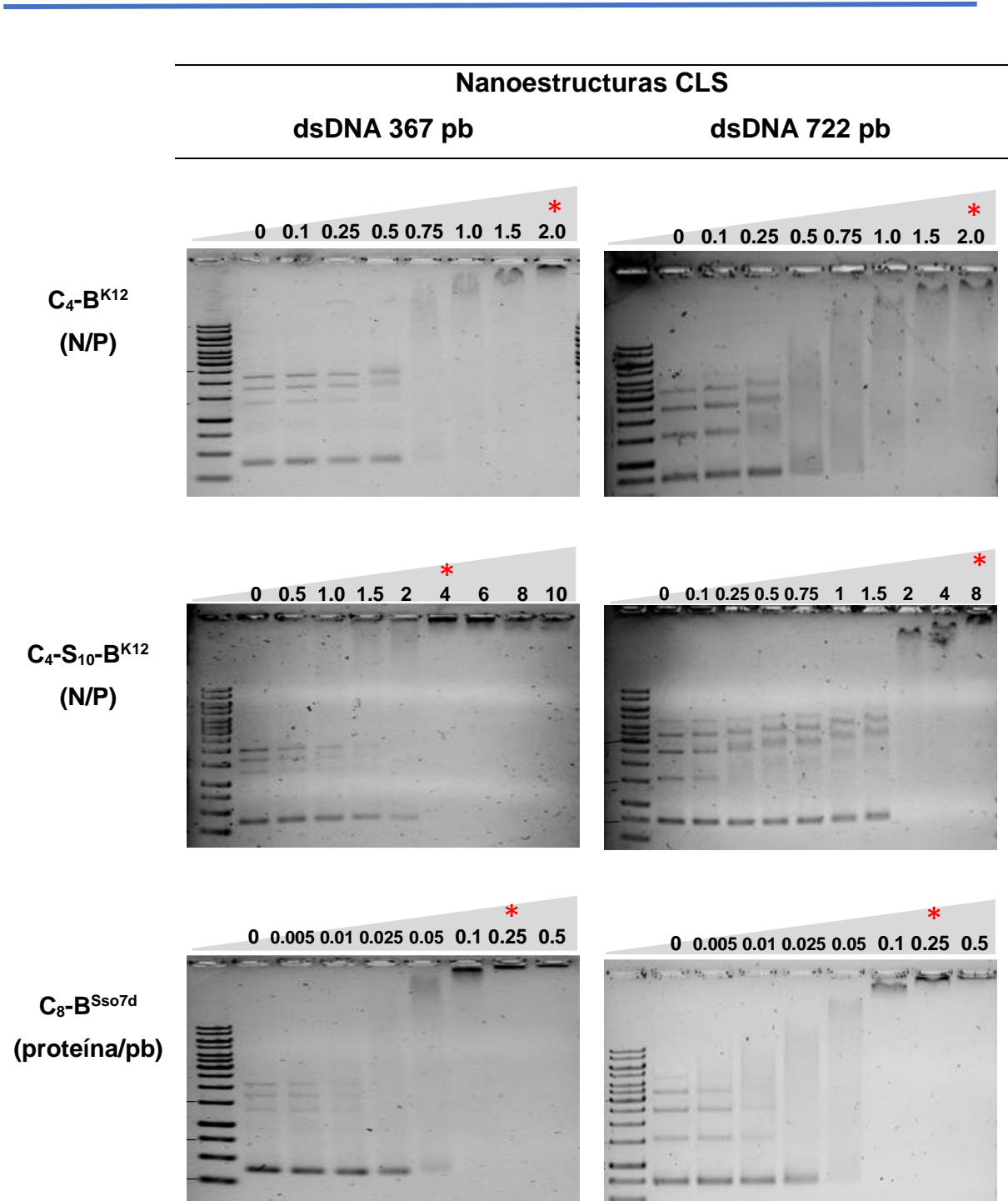


Figura 7.16. EMSA de estructuras obtenidas por hibridación con CLS. El símbolo rojo indica las proporciones en las que se observa la neutralización del DNA, manifestada por un mínimo desplazamiento de la banda.

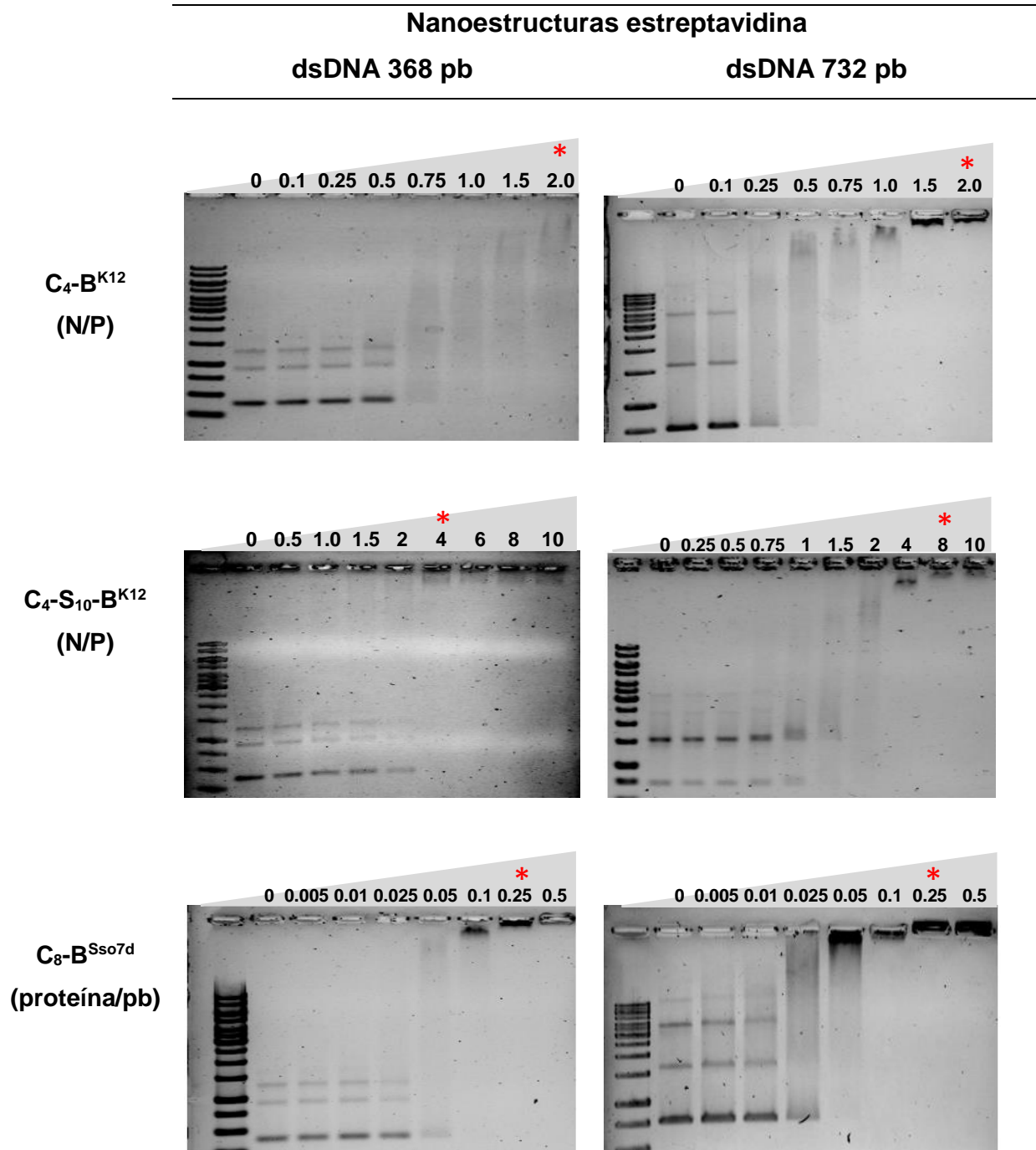


Figura 7.17. EMSA de estructuras obtenidas por interacción biotina-estreptavidina. El símbolo rojo indica las proporciones en las que se observa la neutralización del DNA, manifestada por un mínimo desplazamiento de la banda.

Tabla 7.1. Valores de neutralización en relación proteína/pb*.

Proteína	Nanoestructuras CLS		Nanoestructuras Biotina-Estreptavidina	
	367 pb	722 pb	368 pb	732 pb
C ₈ -B ^{Sso7d}	0.25	0.25	0.25	0.25
C ₄ -B ^{K12}	0.33 (2)	>0.33 (>2)	>0.33 (>2)	0.33 (2)
C ₄ -S ₁₀ -B ^{K12}	0.67 (4)	1.33 (8)	0.67 (4)	1.33 (8)

*Entre paréntesis se indica el valor N/P

7.9. Caracterización de las nanoestructuras recubiertas con proteínas mediante microscopía de fuerza atómica

El estudio del recubrimiento de las nanoestructuras de DNA con las tres proteínas de diseño se resume en las figuras 7.18 y 7.19, en escaneos de áreas de 1.5 x 1.5 μm (escaneos de 5 μm x 5 μm pueden encontrarse en el Anexo D). El recubrimiento con C₄-B^{K12} altera la conformación de las estructuras, de tal forma que las ramificaciones no se observan claramente definidas, mientras que C₄-S₁₀-B^{K12} propicia la formación de estructuras fibrilares, con lo que se pierde por completo la arquitectura ramificada. Las estructuras fibrilares habían sido reportadas previamente (Hernández *et al.*, 2014), pero únicamente con moléculas lineales de dsDNA, siendo este el primer ensayo con estructuras no lineales. Este comportamiento se debe a la inespecificidad del bloque de lisinas, pues sus cargas negativas pueden unir a todas las ramificaciones entre sí y así formar una especie de cilindro con el DNA aglomerado. Cabe mencionar que hasta el momento no se ha evaluado la interacción de C₄-S₁₀-B^{K12} con DNA origami, pero este resultado es un primer indicio de que no sería factible su recubrimiento con esta proteína.

La única proteína que recubre las estructuras sin afectar su arquitectura ramificada es la C₈-B^{Sso7d}. En este caso no ocurre aglomeración de DNA, debido a que el bloque de unión es específico a una molécula dsDNA y no puede unir a más simultáneamente. Además, es posible que el tamaño del bloque de estabilidad coloidal, C₈, sea responsable de la formación de una corona que favorece la dispersión de las nanoestructuras a comparación del bloque presente en C₄-B^{K12}.

Visualmente, las estructuras CLS parecen tener una organización mejor definida que aquellas de biotina-estreptavidina, lo que podría indicar que el recubrimiento

con C_8-B^{Sso7d} es capaz de afectar la interacción entre el dsDNA biotinilado y el tetrámero del centro.

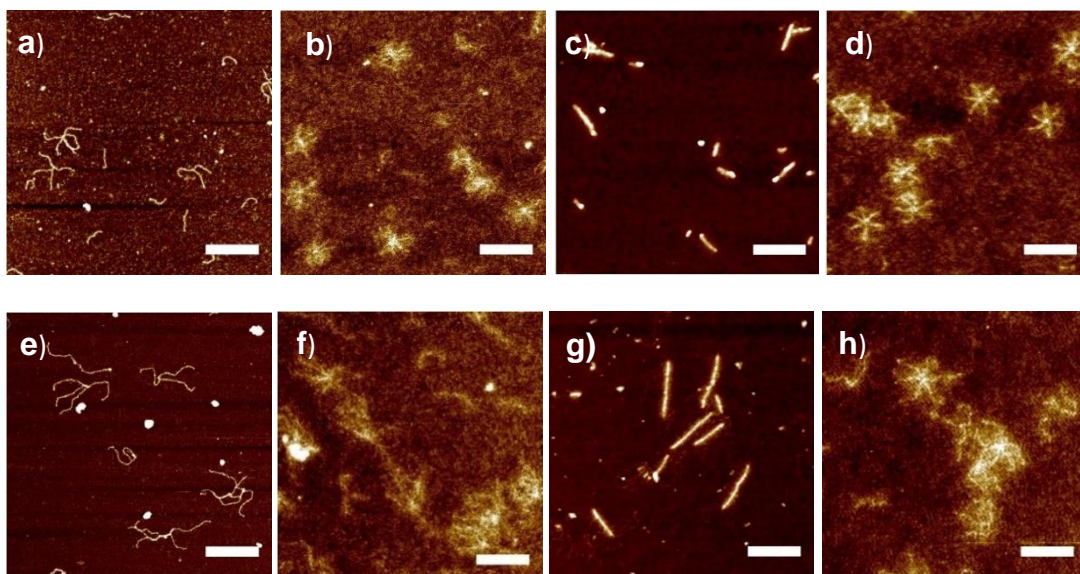


Figura 7.18. Comparación mediante AFM de las nanoestructuras obtenidas por hibridación con CLS y recubiertas con las proteínas de diseño. Estructuras con ramificaciones de 367 pb: a) sin recubrir, b) recubiertas con C_4-B^{K12} (N/P=4), c) $C_4-S_{10}-B^{K12}$ (N/P=8), y d) C_8-B^{Sso7d} (proteína/pb=0.5). Estructuras con ramificaciones de 722 pb: e) sin recubrir, f) recubiertas con C_4-B^{K12} (N/P=4), g) $C_4-S_{10}-B^{K12}$ (N/P=8), y h) C_8-B^{Sso7d} (proteína/pb=0.5). Barra de escala: 300 nm (área: $1.5 \times 1.5 \mu m$).

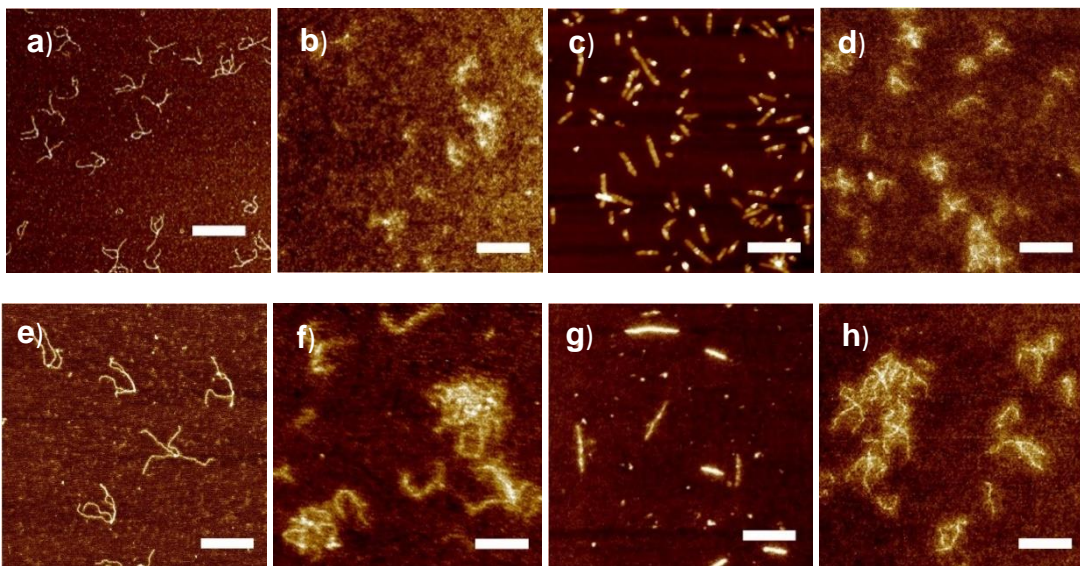


Figura 7.19. Comparación mediante AFM de las nanoestructuras obtenidas por interacción con estreptavidina y recubiertas con las proteínas de diseño. Estructuras con ramificaciones de 368 pb: a) sin recubrir, b) recubiertas con C_4-B^{K12} (N/P=4), c) $C_4-S_{10}-B^{K12}$ (N/P=8), y d) C_8-B^{Sso7d} (proteína/pb=0.5). Estructuras con ramificaciones de 732 pb: e) sin recubrir, f) recubiertas con C_4-B^{K12} (N/P=4), g) $C_4-S_{10}-B^{K12}$ (N/P=8), y h) C_8-B^{Sso7d} (proteína/pb=0.5). Barra de escala 300 nm (área: $1.5 \times 1.5 \mu m$).

El recubrimiento con las proteínas también fue verificado mediante mediciones del eje Z (altura). El promedio de las mediciones se observa en la tabla 7.2, donde se puede apreciar un incremento del 36 % entre la altura (z) de las ramificaciones de dsDNA sin recubrir y las recubiertas con C₈-B^{Sso7d} o C₄-B^{K12}. Por su parte, las estructuras fibrilares formadas con C₄-S₁₀-B^{K12} tuvieron un incremento del 194 %. Este comportamiento se debe a que todas las ramificaciones se aglomeran para formar fibras.

Tabla 7.2. Altura promedio (eje Z) de las moléculas de dsDNA.

Nanoestructura ramificada	Altura de las ramificaciones Longitud \pm EEM (nm) (n=20)
dsDNA	0.85 ± 0.04 nm (s = 0.13)
dsDNA + C ₈ -B ^{Sso7d}	1.16 ± 0.06 nm (s= 0.21)
dsDNA + C ₄ -B ^{K12}	1.15 ± 0.08 nm (s = 0.29),
dsDNA + C ₄ -S ₁₀ -B ^{K12}	2.5 ± 0.05 nm (s = 0.18).

*EEM: error estándar de la media, s: desviación estándar muestral

Por otra parte, en la figura 7.20 se muestran cortes seccionales representativos (eje Z) para cada una de las variantes de las estructuras CLS.

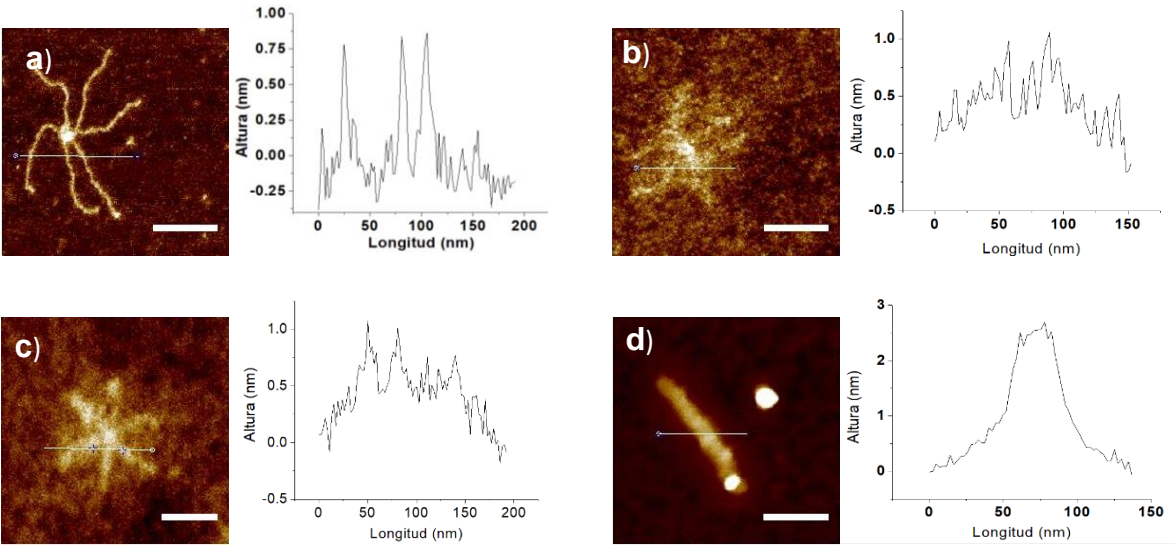


Figura 7.20. Corte en el eje Z de las nanoestructuras obtenidas por hibridación entre CLS y dsDNA de 367 pb. a) Sin recubrir, b) recubiertas con C₄-B^{K12} (N/P=4), c) C₈-B^{Sso7d} (proteína/pb=0.5), d) C₄-S₁₀-B^{K12} (N/P=8). Barra de escala: 100 nm.

Un análisis más detallado de las nanoestructuras recubiertas con C₈-B^{Sso7d} permitió verificar la rigidización. Este fenómeno es comprobado por la disminución en la longitud de las ramificaciones, así como por una menor presencia de flexiones y entrelazamientos. Para las nanoestructuras recubiertas, obtenidas por hibridación con el núcleo CLS, las ramificaciones de 211 pb, 367 pb, 539 pb y 722 pb presentaron longitudes experimentales de 49.9 ± 3.8 nm, 99.5 ± 3.6 nm, 148.6 ± 6.7 nm y 198.1 ± 6.5 nm, lo cual se traduce en disminuciones porcentuales, respecto a las nanoestructuras no recubiertas, del 26.4 %, 19.1 %, 13.0 % y 17.1 %. Por su parte, las nanoestructuras recubiertas, preparadas con DNA biotinilado de 201 pb, 368 pb, 555 pb y 732 pb, presentaron ramificaciones con longitudes de 47.0 ± 2.5 nm, 77.27 ± 4.9 nm, 135.7 ± 5.8 nm y 202.7 ± 4.2 nm, correspondiendo a disminuciones porcentuales del 22.6 %, 35.05 %, 26.7 % y 17.2 %. En las figuras 7.21 y 7.22 se puede observar con mayor detalle a las estructuras recubiertas con C₈-B^{Sso7d}. Los resultados de estas mediciones, sumados a la evaluación cualitativa de su apariencia en AFM, permiten afirmar que, de las tres proteínas evaluadas, C₈-B^{Sso7d} es la mejor opción para obtener estructuras con una arquitectura ramificada uniforme, así como programar el número de ramificaciones y su longitud.

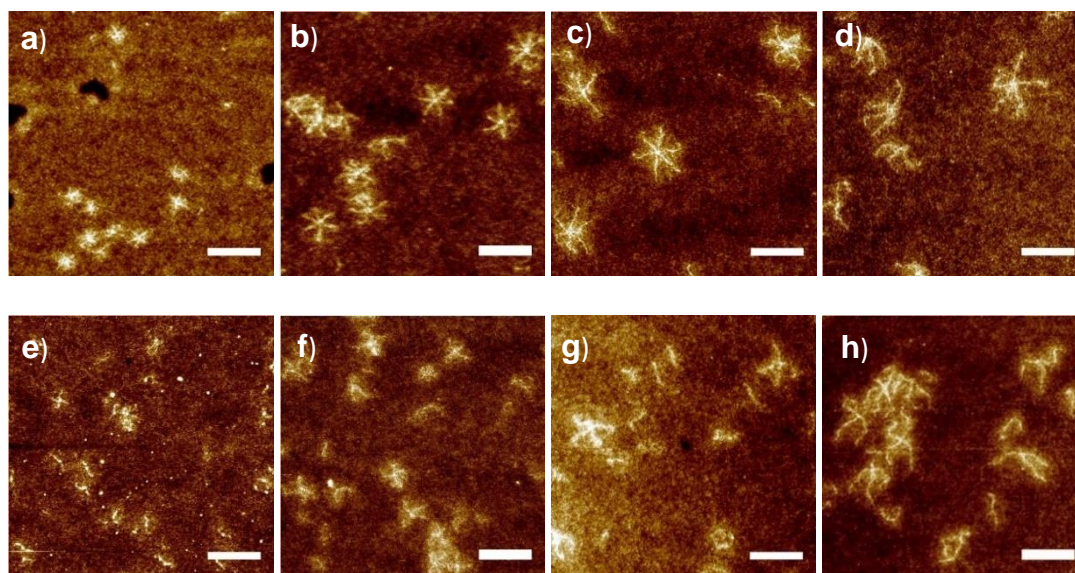


Figura 7.21. AFM de las nanoestructuras recubiertas con C₈-B^{Sso7d}. Estructuras obtenidas mediante hibridación entre CLS y, a) ramificaciones de 211 pb, b) ramificaciones de 367 pb, c) ramificaciones de 539 pb, d) ramificaciones de 722 pb. Estructuras obtenidas mediante interacción con estreptavidina y, e) ramificaciones de 201 pb, f) ramificaciones de 368 pb, g) ramificaciones de 555 pb, h) ramificaciones de 732 pb. Barra de escala 300 nm (área: 1.5 x 1.5 μ m).

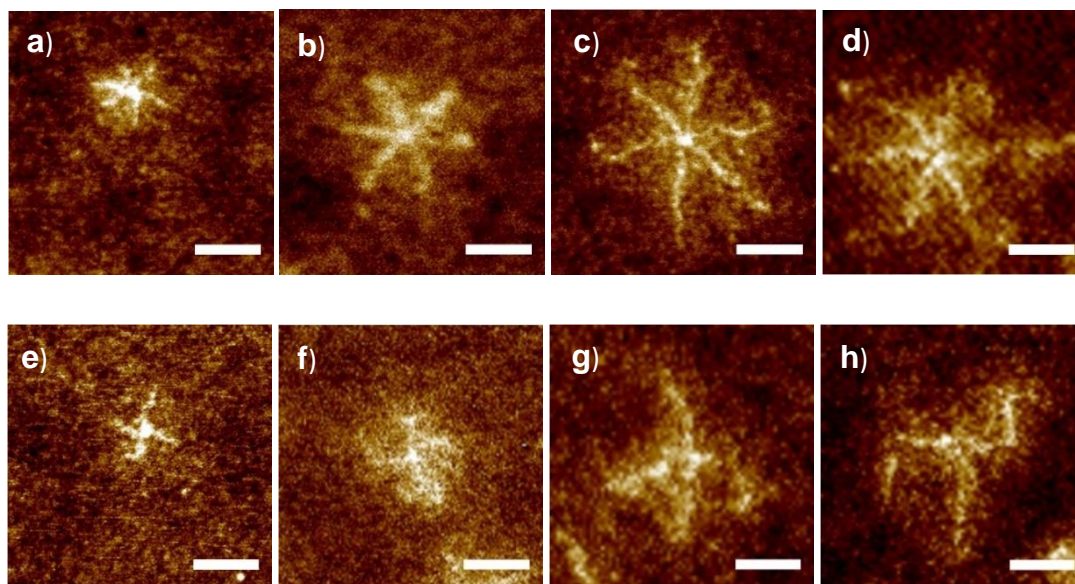


Figura 7.22. Acercamientos de las micrografías de las nanoestructuras recubiertas con C_8-B^{Sso7d} . Obtenidas mediante hibridación entre CLS y, a) ramificaciones de 211 pb, b) ramificaciones de 367 pb, c) ramificaciones de 539 pb, d) ramificaciones de 722 pb. Obtenidas mediante interacción con estreptavidina y, e) ramificaciones de 201 pb, f) ramificaciones de 368 pb, g) ramificaciones de 555 pb, h) ramificaciones de 732 pb. Barra de escala: 100 nm (área: 400 x 400 nm).

Finalmente, se obtuvieron distribuciones en masa de las partículas observadas en AFM para evaluar la eficiencia en la formación de nanoestructuras ramificadas. En la figura 7.23 se observan tales distribuciones según las ramificaciones que presentaron, antes y después de ser recubiertas con la proteína C_8-B^{Sso7d} . Cabe mencionar que para obtener las distribuciones en masa primero fue necesario realizar un conteo del número de nanoestructuras, igualmente según las ramificaciones, para posteriormente convertir las distribuciones en número a distribuciones en masa. Las distribuciones en número pueden encontrarse en el Anexo E.

En el caso de las estructuras obtenidas por hibridación con los oligos CLS se puede notar que el recubrimiento ayudó a estabilizar la formación de estructuras con más ramificaciones, sobre todo en las que fueron obtenidas con dsDNA de 367 pb. En las que tenían una longitud de 722 pb se notó una disminución en las nanoestructuras de 5 ramificaciones al ser recubiertas con la proteína C_8-B^{Sso7d} (Figuras 7.23, a y b). Esto podría indicar que el recubrimiento proteico podría afectar

el ensamblaje de nanoestructuras de mayor tamaño, pero será necesario realizar evaluaciones más detalladas para comprender este comportamiento.

Por otra parte, en las estructuras de dsDNA biotinilado y estreptavidina el recubrimiento proteico no favoreció la obtención de una mayor cantidad de estructuras ramificadas. Con esto se refuerza el planteamiento de Kennedy (2017), mencionado en la sección 7.5, quien propuso que el dsDNA, al ser menos flexible que el ssDNA, desestabiliza la interacción entre la biotina y la estreptavidina, debido a que la presencia de una molécula rígida genera un mayor impedimento estérico en el centro de la nanoestructura. Es posible que el recubrimiento proteico incremente aún más este efecto, al otorgarle mayor rigidez al dsDNA.

En las cuantificaciones mediante AFM también hay que considerar el efecto de ciertos artefactos en la preparación de las muestras, como los procesos de fijación y secado, así como el lavado. Además, el comportamiento de estas estructuras en fluidos aún debe ser evaluado mediante AFM, y con el uso de otras técnicas no invasivas, como DLS, FRET o DNA-PAINT. Empero, la caracterización de nanoestructuras de DNA con AFM se ha posicionado como el estándar para obtener excelente información cualitativa y cuantitativa, con datos cuya reproducibilidad ha sido ampliamente demostrada (Musset, 2010; Bila *et al.*, 2019).

También resulta interesante comparar las cuantificaciones de AFM con los análisis densitométricos de las figuras 7.7 y 7.9. Los porcentajes obtenidos con ambas técnicas no son similares. Esta diferencia se debe al efecto de la electroforesis sobre la estabilidad de las nanoestructuras, tal como se explicó en la sección 7.7, y también es debida a los artefactos y sesgos relacionados con la microscopía de fuerza atómica, sobre todo si se considera que esta técnica permite hacer caracterizaciones de molécula única, y no de carácter masivo o de la totalidad de una muestra, como la electroforesis. Es por esta razón que prácticamente todas las publicaciones involucradas en la nanotecnología del ADN hacen uso de ambas estrategias para complementar sus conclusiones (Bila *et al.*, 2019).

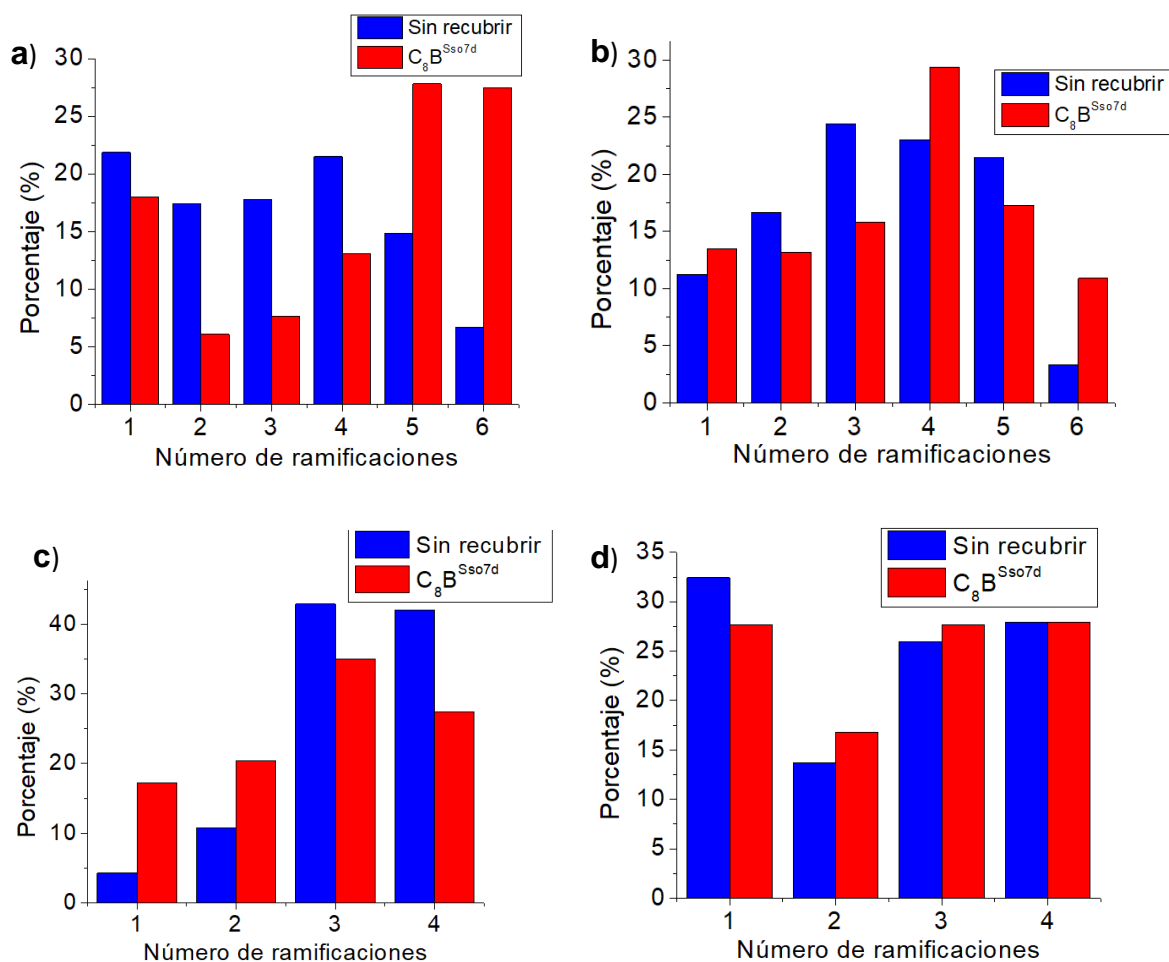


Figura 7.23. Distribuciones en masa de las nanoestructuras. a) Nanoestructuras CLS con ramificaciones de 367 pb, b) Nanoestructuras CLS con ramificaciones de 722 pb, c) Nanoestructuras de estreptavidina y DNA biotilado de 368 pb, d) Nanoestructuras de estreptavidina y DNA biotilado de 732 pb.

7.10. Evaluación de la estabilidad térmica de las nanoestructuras

Las nanoestructuras con y sin proteína (C_8-B^{Sso7d}) fueron incubadas a temperaturas de 37 °C y 50 °C durante distintos periodos de tiempo, evaluando su apariencia mediante microscopía de fuerza atómica. En el caso de las nanoestructuras obtenidas mediante hibridación CLS (figuras 7.24 y 7.25), se demostró su estabilidad a 37 °C durante 3.5 h. Las estructuras recubiertas con C_8-B^{Sso7d} (prtn/pb=0.5) conservaron su conformación ramificada por un tiempo máximo de 9

horas. Sin embargo, al incubar a 50 °C, las estructuras sin proteína únicamente conservaron sus ramificaciones por un tiempo aproximado de 8 min. A esta temperatura resulta más notorio el incremento en la termoestabilidad al recubrir con la proteína C₈-B^{Sso7d}, pues las ramificaciones estuvieron presentes hasta después de 1 hora de incubación, todavía notándose algunas estructuras con tres ramificaciones habiendo transcurrido 3 horas.

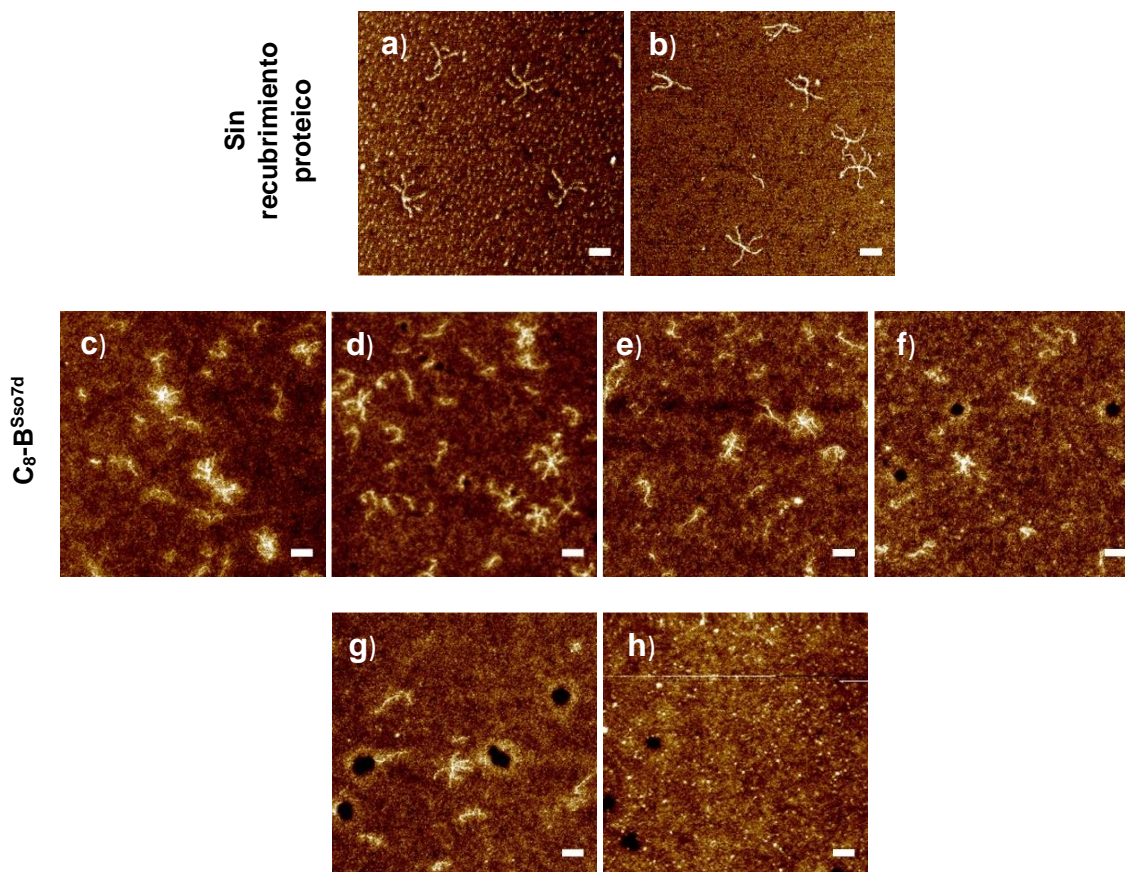


Figura. 7.24. AFM de las nanoestructuras CLS con ramificaciones de 367 pb incubadas a 37 °C durante distintos periodos de tiempo. Primero se muestran aquellas sin recubrimiento proteico, incubadas durante a) 1 h 30 min, y b) 3 h 30 min. Después se presentan las recubiertas con C₈-B^{Sso7d}, incubadas durante c) 0 min (TA), d) 8 min, e) 1 h, f) 5 h, g) 9 h y, h) 12 h. Barra de escala 125 nm (área: 1.5 x 1.5 µm). TA: Temperatura ambiente.

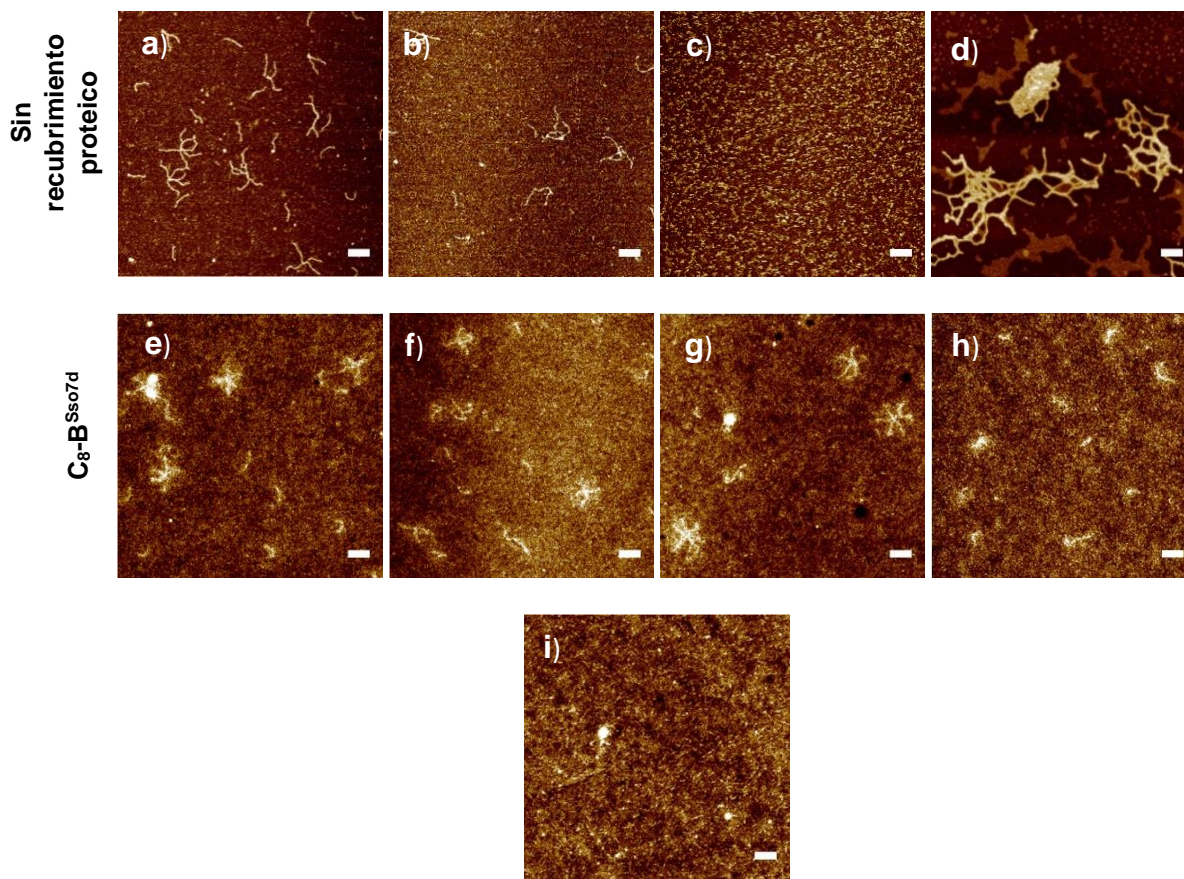


Figura. 7.25. AFM de las nanoestructuras CLS con ramificaciones de 367 pb incubadas a 50 °C durante distintos periodos de tiempo. Primero se muestran aquéllas sin recubrimiento proteico, incubadas durante a) 0 min (TA), b) 8 min, c) 30 min, y d) 1h. Después se presentan las recubiertas con C_8-B^{Sso7d} , incubadas durante e) 0 min (TA), f) 8 min, g) 1 h, h) 3 h, i) 5 h. Barra de escala 125 nm (área $1.5 \times 1.5 \mu m$). TA: Temperatura ambiente.

En el caso de las estructuras obtenidas mediante la interacción biotina-estreptavidina (figuras 7.26 y 7.27), también demostraron estabilidad a 37 °C durante 3.5 h. Empero, al ser recubiertas con C_8-B^{Sso7d} (prtn/pb=0.5) resultó más notorio el proceso de desensamblaje, pues a las 3 horas el número de estructuras ramificadas había disminuido considerablemente. Esto puede deberse al efecto discutido en la sección anterior, concerniente al impedimento estérico causado por la rigidez del dsDNA en la zona central de la nanoestructura. Al incubarlas a 50 °C, se observó un gran número de moléculas de dsDNA desensambladas después de tan solo 30 minutos, y al incubar las recubiertas con C_8-B^{Sso7d} , únicamente se observaron ramificaciones hasta el mismo periodo de tiempo de 30 min.

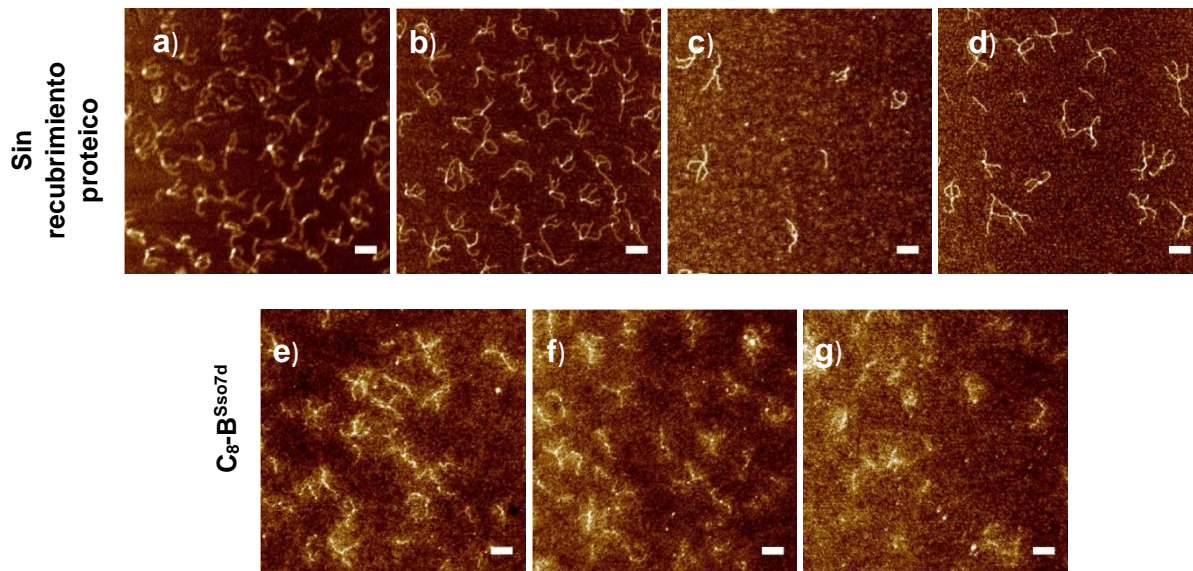


Figura. 7.26. AFM de las nanoestructuras de estreptavidina con dsDNA biotinilado de 368 pb incubadas a 37 °C durante distintos periodos de tiempo. Primero se presentan aquéllas sin recubrimiento proteico, incubadas durante a) 0 min (TA), b) 8 min, c) 1 h, y d) 3.5 h. Después se muestran las recubiertas con C_8-B^{Sso7d} , incubadas durante e) 0 min (TA), f) 8 min, y g) 3 h. Barra de escala 125 nm (área 1.5 x 1.5 μ m). TA: Temperatura ambiente.

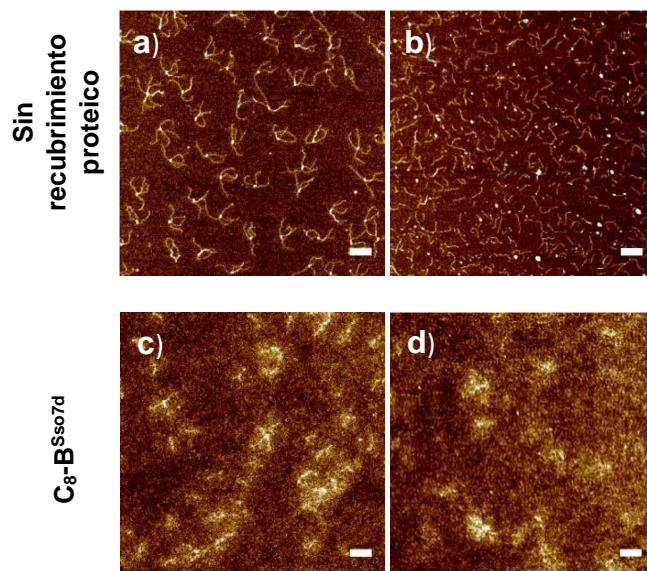
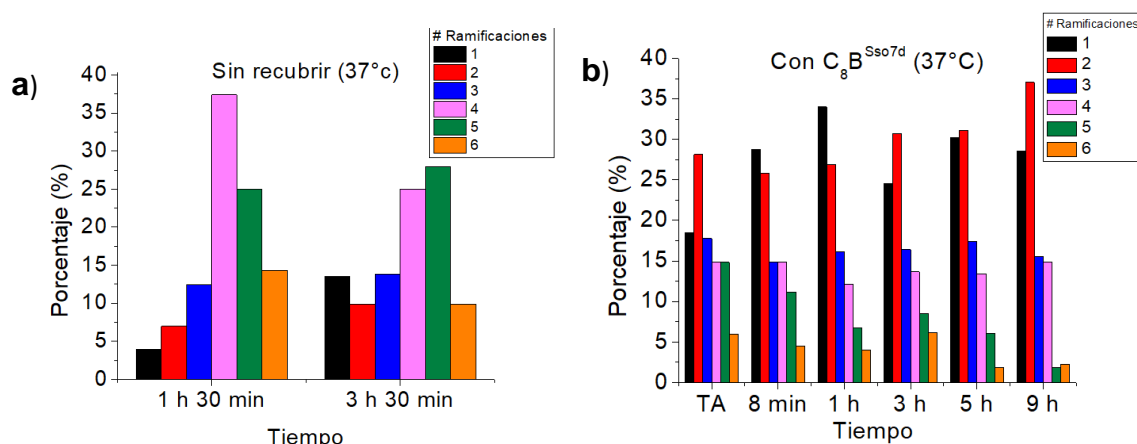


Figura. 7.27. AFM de las nanoestructuras de estreptavidina con dsDNA biotinilado de 368 pb incubadas a 50 °C durante distintos periodos de tiempo. Primero se muestran aquéllas sin recubrimiento proteico, incubadas durante a) 0 min (TA) y b) 30 min. Después se presentan las recubiertas con C_8-B^{Sso7d} , incubadas durante c) 0 min (TA) y d) 30 min. Barra de escala: 125 nm (área 1.5 x 1.5 μ m). TA: Temperatura ambiente.

Los resultados anteriores indican que las nanoestructuras obtenidas mediante hibridación con CLS poseen una mayor estabilidad térmica al ser recubiertas con la proteína C_8-B^{Sso7d} , en comparación con las que se obtuvieron con la estrategia de estreptavidina. De hecho, en estas últimas el desensamblaje parece ser resultado de la suma del impedimento estérico y el efecto térmico.

Otra observación de interés para las nanoestructuras obtenidas por hibridación con CLS se encontró al incubar a 50 °C por 1 h (figura 7.25d). En la micrografía de AFM se observa la formación de redes de DNA, posiblemente producto de interacciones inespecíficas entre distintos nucleótidos. Este fenómeno no es observado cuando las nanoestructuras son recubiertas con la proteína; por lo cual también se pone de manifiesto que el recubrimiento proteico ayuda conservar y controlar la uniformidad en la nanoestructura ramificada.

Adicionalmente, se realizaron distribuciones en masa (figura 7.28) y en número (Anexo F) para las nanoestructuras CLS, pues con estas es más notorio el efecto de la temperatura sobre el número de ramificaciones. En los gráficos se puede apreciar una tendencia en la disminución de las ramificaciones conforme se incrementa el tiempo de incubación.



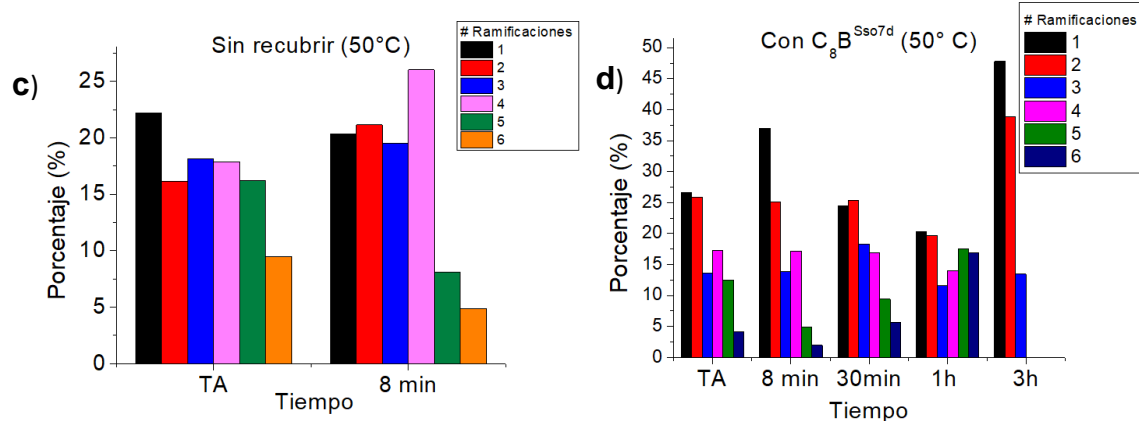


Figura 7.28. Distribuciones en masa de las nanoestructuras CLS con dsDNA de 367 pb incubadas durante distintos periodos de tiempo. a) sin recubrir, a 37 °C, b) con C₈-B^{Sso7d} a 37 °C, c) sin recubrir, a 50 °C, y d) con C₈-B^{Sso7d} a 50 °C.

7.11. Evaluación de la resistencia a DNAsa I

Con la finalidad de establecer las bases para futuras aplicaciones biológicas, se evaluó la resistencia de las nanoestructuras en presencia de DNAsa I a 0.4 U/μg DNA. Inicialmente se comparó dsDNA lineal y ramificado sin recubrimiento proteico. Las moléculas lineales presentaron degradación desde el primer minuto, mientras que aquellas que formaron parte de las ramificaciones resistieron entre 2 y 5 minutos. No constituye una diferencia significativa respecto al tiempo, sin embargo, este primer resultado podría ser un indicio de que la alta densidad de DNA en la estructura ramificada es capaz de afectar la actividad de la enzima, ralentizando su mecanismo.

Al evaluar dsDNA lineal y en ramificaciones, ambos recubiertos con C₈-B^{Sso7d} (prtn/pb=0.5), sí se observó una resistencia significativa. Incluso después de 60 minutos la intensidad de las bandas se mantuvo constante, lo cual permite afirmar que el recubrimiento proteico disminuye la accesibilidad de la enzima hacia las moléculas de dsDNA. Incluso, al incubar por un periodo de hasta 10 horas, se observó que los ácidos nucleicos seguían presentes. La figura 7.29 presenta las caracterizaciones realizadas mediante electroforesis.

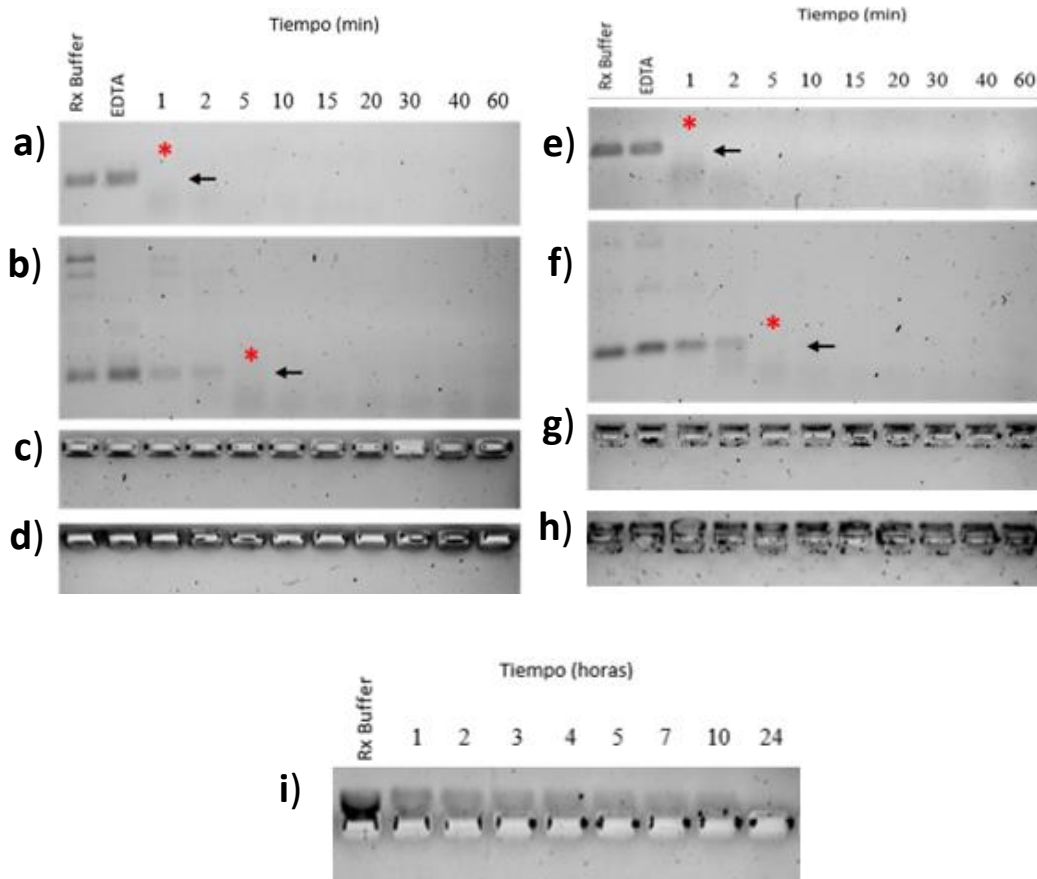


Figura 7.29. Evaluación de la resistencia de las nanoestructuras ante DNAsa I. a) DNA lineal de 367 pb, b) estructura con ramificaciones de 367 pb, c) DNA lineal de 367 pb recubierto con C_8-B^{Sso7d} , d) estructuras con ramificaciones de 367 pb recubiertas con C_8-B^{Sso7d} , e) DNA biotinilado de 368 pb, f) estructura con ramificaciones biotiniladas de 368, g) DNA lineal biotinilado de 368 pb recubierto con C_8-B^{Sso7d} , h) estructura con ramificaciones biotiniladas de 368 pb recubiertas con C_8-B^{Sso7d} . i) Incubación de estructuras con DNA biotinilado recubiertas con C_8-B^{Sso7d} durante un lapso máximo de 24 horas. En los carriles se observa un control en el que las muestras se prepararon en el buffer de reacción de la DNAsa (Rx Buffer), sin añadir la enzima, y otro con el buffer de reacción y EDTA a la concentración usada para detener la actividad de la DNAsa.

Cabe mencionar que anteriormente se había estudiado la protección conferida por el recubrimiento con C_8-B^{Sso7d} usando nanoestructuras de DNA origami, pero únicamente se evaluó hasta un tiempo máximo de 1 hora (Estrich *et al.*, 2017). En ese caso solo se hicieron evaluaciones electroforéticas, por lo que se desconoce si hubo efectos sobre la arquitectura de la nanoestructura.

Tomando en cuenta esto, se decidió emplear AFM para evaluar la integridad de las nanoestructuras tras la incubación con DNAsa I (Figura 7.30). En el caso de aquellas que no fueron recubiertas se observó su degradación a partir de los 10 minutos, mientras que aquellas recubiertas manifestaron una agregación a partir de las 3 h, de tal forma que después de 5 h solo se observaban agregados sin ramificaciones. Si bien, mediante esta técnica se observó una tendencia similar a la apreciada en los geles de electroforesis, parece ser que la detección de bandas mediante geles no se debe tomar como un indicio de que la arquitectura de una nanoestructura se encuentra completamente íntegra.

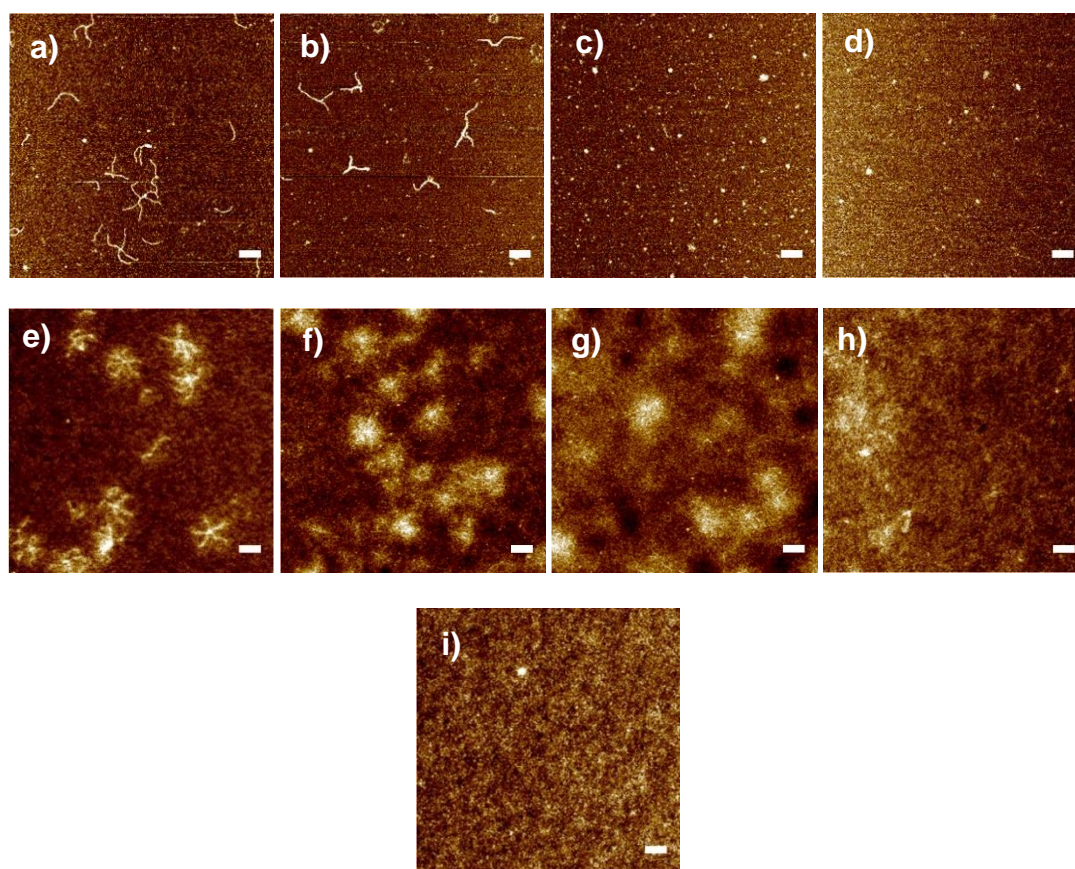


Figura. 7.30. AFM de las nanoestructuras CLS con ramificaciones de 367 pb incubadas con DNAsa I durante distintos periodos de tiempo. Primero se muestran aquéllas sin recubrimiento proteico, incubadas durante a) 0 min, b) 5 min, c) 10 min, y d) 1h. Posteriormente se presentan las recubiertas con C₈-B^{Sso7d}, incubadas durante e) 0 min, f) 1 h, g) 3 h, h) 5 h, i) 12 h. Barra de escala: 125 nm (área 1.5 x 1.5 μ m).

Estos resultados son el primer paso hacia una posible aplicación biológica de las construcciones, especialmente para el transporte de moléculas con actividad biológica. Sin embargo, aún es necesario caracterizar su integridad en medios de cultivo y lisados celulares, ya que estos poseen distintos componentes que aún podrían alterar su arquitectura, sobre todo por perturbaciones electrostáticas o concentraciones de nucleasas más elevadas.

7.12. Planteamiento de futuras construcciones

Con el objetivo de establecer las bases para futuras construcciones se planteó el uso de las estructuras ramificadas para obtener estructuras más complejas. En cada ramificación podría incorporarse un extremo cohesivo complementario a secuencias presentes en el DNA circular M13mp18, ampliamente usado en el DNA origami, con lo que podría obtenerse una estructura tetraédrica (Figura 7.31a). Este diseño es muy sencillo; sin embargo, la hibridación dependería de pocas bases nitrogenadas, lo que podría resultar en una conformación muy inestable.

Para verificar la viabilidad de esta estrategia inicialmente se diseñó una prueba de concepto para estudiar la hibridación de dos oligonucleótidos programados para hibridar entre ellos a través de 32 nt, y al mismo tiempo interactuar con dos moléculas del ssDNA circular M13mp18 en regiones de 42 nt (Figura 7.31b).

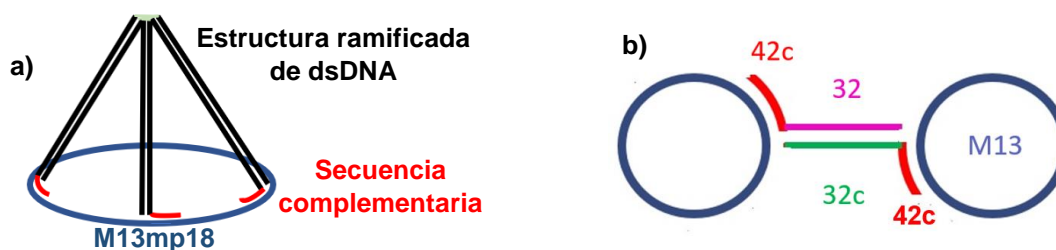


Figura 7.31. Estrategia para diseñar futuras construcciones. a) Hibridación entre estructuras ramificadas y ssDNA M13mp18. b) Interacción esperada para la prueba de concepto entre los oligos y las moléculas de M13mp18.

Como se observa en la figura 7.32a, los oligos 42C32 y 42C32C interactúan para formar una banda de tamaño superior. Una vez verificado este comportamiento, se procedió a evaluar la interacción de este par de secuencias con el ssDNA M13mp18, colocando los oligonucleótidos a diferentes excesos molares 5, 10 y 20 veces mayores (Figura 7.32b). Sin embargo, en ningún caso se observó algún tipo de unión con M13mp18, la cual estaría indicada por la aparición de una banda de tamaño superior a la correspondiente a la de M13mp18 solo.

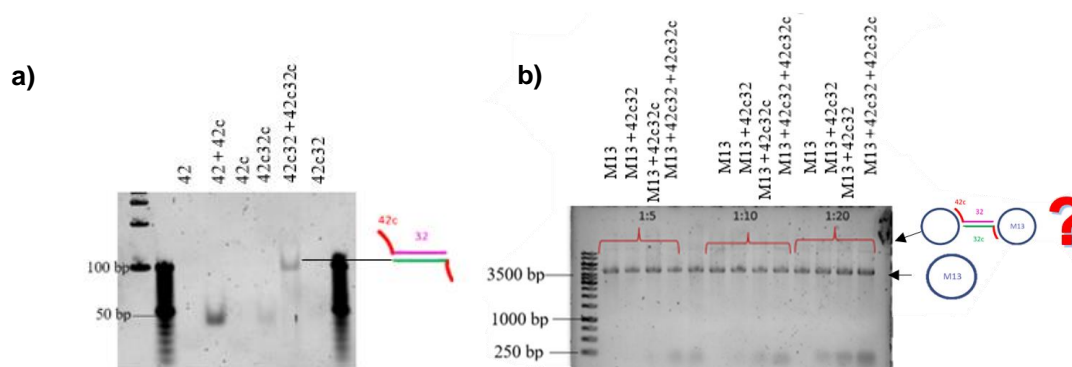


Figura 7.32. Evaluación electroforética de: a) hibridación entre los oligonucleótidos y b) hibridación de los oligos con el ssDNA circular M13mp18. En b) se evaluaron excesos molares de oligos, respecto a M13mp18, 5, 10 y 20 veces mayores. No se observa una banda superior a la de M13mp18.

Generalmente, al emplear M13mp18 para la construcción de estructuras se usan concentraciones elevadas de sales y iones, además de cientos o miles de oligonucleótidos para hibridar igual número de regiones. Es racional considerar que dos secuencias de oligonucleótidos, que son complementarias por 42 nt, no son suficientes para formar una estructura estable, debido a la alta repulsión de cargas negativas de M13mp18 y la fuerza mecánica que una molécula tan grande ejerce sobre las pequeñas cadenas de ssDNA. Lo anterior se justifica en algunos modelos que estudian al DNA como un polímero o cuerda (Vologodskii, 2015).

Para complementar este estudio, una preparación de M13mp18, con un exceso molar de oligonucleótidos 20 veces mayor, fue observada en AFM (Figura 7.33). El DNA M13mp18 posee una longitud teórica aproximada de 2465 nm y experimentalmente resultó ser de 2401 nm. Mediante este análisis fue posible

observar una conformación en la que dos moléculas circulares estaban unidas en una región, teniendo un contorno total de 4276 nm. Lo anterior demuestra que el concepto sí funciona, pero posee una eficiencia muy baja.

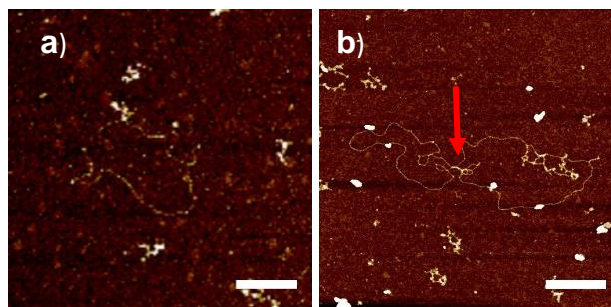


Figura 7.33. AFM de a) DNA circular M13mp18, y b) estructura formada por la unión de dos moléculas de M13mp18. La flecha roja indica la zona de posible hibridación con los oligonucleótidos. Barra de escala: 300 nm (área: 1.5 x 1.5 μm).

Este resultado tiene importantes implicaciones para el proyecto de investigación, pues al parecer las estructuras ramificadas no podrían hibridar con el ssDNA M13mp18 de la manera planteada. Se espera que futuras investigaciones encuentren soluciones a esta problemática mediante un rediseño de las secuencias a hibridar y, sobre todo, de las condiciones de ensamblaje, o bien, mediante métodos de modificación química para la formación de enlaces covalentes. También cabe la posibilidad de que el recubrimiento proteico estabilice las estructuras a pesar de que su ensamblaje dependa de pocos nucleótidos.

VIII. CONCLUSIONES

Se demostró el funcionamiento de una nueva estrategia para construir nanoestructuras ramificadas mediante el autoensamblaje de dsDNA y proteínas de diseño, y que destaca por la facilidad para programar y controlar la morfología, el tamaño y el número de ramificaciones.

Con las dos variantes de ensamblaje evaluadas (la de hibridación con dsDNA y la que aprovecha la afinidad con estreptavidina) se obtuvo evidencia experimental que permite sugerir que el proceso de formación de estas nanoestructuras se encuentra influenciado por la alta densidad de moléculas en su región central, donde fenómenos como el impedimento estérico y la repulsión de cargas podrían causar su desestabilización.

Los resultados también evidenciaron que la proteína C₈-B^{Sso7d} es la mejor candidata para rigidizar y conservar una arquitectura uniforme de las ramificaciones, sobre todo en las nanoestructuras formadas mediante hibridación.

Finalmente, se demostró que C₈-B^{Sso7d} es capaz de estabilizar y proteger a las nanoestructuras ramificadas contra el ataque de nucleasas a 37 °C. Estos resultados sugieren que estas construcciones podrían ser utilizadas para el transporte de moléculas con actividad biológica, como péptidos, antígenos, aptámeros o fármacos intercalantes, buscando aprovechar la multivalencia inherente a la arquitectura ramificada.

IX. PERSPECTIVAS

- Será de utilidad realizar modificaciones covalentes en las nanoestructuras obtenidas, para así eliminar la reversibilidad del proceso de autoensamblaje. De esta manera también se facilitaría la estandarización de los procesos de purificación.
- En el área de la nanotecnología estructural, los constructos ramificados serán útiles como unidades de construcción de conformaciones con arquitecturas más variadas y avanzadas, que podrían ir desde mallas, mediante la repetición del patrón ramificado, hasta conformaciones tridimensionales tetraédricas.
- Es necesario realizar estudios más detallados de la interacción entre la proteína C₈-B^{Sso7d} y el dsDNA. Sobre todo para conocer si la uniformidad de las ramificaciones es debida al bloque C₈ o al bloque B^{Sso7d}. Para esto se podría modificar alguno de los bloques para realizar estudios comparativos mediante microscopía de fuerza atómica. Por otra parte, el dicróismo circular permitiría identificar algunos cambios conformacionales en la proteína o en el DNA.
- Para evaluar la posibilidad de futuras aplicaciones biológicas será necesario estudiar la estabilidad de las nanoestructuras en medios de cultivo y lisados celulares.
- De manera directa se puede evaluar el uso de las estructuras ramificadas para el transporte de fármacos intercalantes en dsDNA, como la doxorubicina, o bien funcionalizar los extremos con moléculas de conocida actividad biológica.
- Las nanoestructuras también conservaron la topología ramificada a 50 °C, lo cual podría resultar de utilidad en la construcción de nanocircuitos, pues suelen estar expuestos a procesos de calentamiento. Lo anterior se

podría lograr recubriendo las nanoestructuras con nanopartículas metálicas u otro material conductor.

- Será interesante averiguar si la arquitectura rigidizada de las ramificaciones es capaz de incrementar la multivalencia de moléculas con actividad biológica. Hasta el momento se han hecho estudios con ramificaciones flexibles que podrían entrelazarse y generar interacciones no deseadas. Con una arquitectura más organizada en la que cada extremo de las extensiones es independiente y se encuentra a una distancia controlada, se abre la posibilidad de entender con mayor detalle el mecanismo de acción de las moléculas multivalentes.

X. BIBLIOGRAFÍA

Agback, P., Baumann, H., Knapp, S., Ladenstein, R. & Härd, T. (1998). Architecture of Nonspecific Protein-DNA Interactions in the Sso7d-DNA Complex. *Nat. Struct. Biol.*, 5(7), 579-84.

Ahmadi, Y., Llano, E.D. & Barišić, I. (2018). (Poly)cation-Induced Protection of Conventional and Wireframe DNA Origami Nanostructures. *Nanoscale*, 10(16), 7494–7504.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D. & Raff, M. (2014). *Molecular Biology of the Cell* (sexta ed.). Estados Unidos de América: Garland Science.

Aloorkar N.H., Kulkarni, A.S., Patil, R.A., & Ingale, D.J. (2012). Star Polymers: An Overview. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotech.*, 5(2), 1675-1684.

Becerril, H. & Woolley, A. (2008). DNA-Templated Nanofabrication. *Chem. Soc. Rev.*, 38(2), 329-337.

Bellini, T, Cerbino, R. & Zanchetta, G. (2011). DNA-Based Soft Phases. *Top. Curr. Chem.*, 318(1), 225-79.

Bellot, G., McClintock, M. & Shih, W. (2011) Recovery of Intact DNA Nanostructures After Agarose Gel–Based Separation. *Nat. Methods*, 8(3), 192–194.

Bila, H., Kurisinkal, E. & Bastings, M. (2019). Engineering a Stable Future for DNA-Origami as a Biomaterial. *Biomater. Sci.*, 7(2), 532-541

Biomers (2019). *Phosphorylation*. Biomers, the biopolymer factory. Recuperado de <https://m.biomers.net/en/products/dna/phosphorylation.html> [20 noviembre 2019].

Brüning, J.G., Howard J. & McGlynn, P. (2016). Use of Streptavidin Bound to Biotinylated DNA Structures as Model Substrates for Analysis of Nucleoprotein Complex Disruption by Helicases. *Methods*, 108(1), 48-55.

Bujold, K.E., Fakhoury, J., Edwardson, T. G. W., Carneiro, K.M.M. Briard, J.N., Godin, A.G. & Sleiman H.F. (2014). Sequence-Responsive Unzipping DNA Cubes with Tunable Cellular Uptake Profiles. *Chem. Sci.*, 5(1), 2449–2455.

Campbell, I. (2012). *Biophysical Techniques*. United States: Oxford University Press, p. 114.

Cazares-Vargas, E., Stuart, M., deVries, R. & Hernandez-Garcia, A. (2019). Template-Free Self-Assembly of Artificial De Novo Viral Coat Proteins into Nanorods: Effects of Sequence, Concentration, and Temperature. *Chem.-Eur. J.*, 25 (47), 11058-11065.

Chivers, C.E., Koner, A.L., Lowe, E.D. & Howarth, M. (2011). How the Biotin-Streptavidin Interaction Was Made Even Stronger: Investigation Via Crystallography and a Chimaeric Tetramer. *Biochem. J.*, 435(1), 55-63.

Conway, J.W., McLaughlin, C.K., Castor K.J. & Sleiman, H. (2013). DNA Nanostructure Serum Stability: Greater Than the Sum of Its Parts. *Chem. Commun.*, 49(1), 1172–1174.

Cooper V. R., Thonhauser, T., Puzder, A., Schröder, E., Lundqvist, B. I., & Langreth, D. C. (2008). Stacking Interactions and the Twist of DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(4), 1304–1308.

Costa, J.M. (2005). *Diccionario de Química-Física*. Madrid, España: Díaz de Santos Ediciones, p. 385.

Dietz, H. (2015). DNA Nanotechnology: Nanoscale Cable Tacking. *Nat. Nanotechnol.*, 10(10), 829-830.

Dimitrova, D.G., Teyssset, L. & Carré, C. (2019). RNA 2'-O-Methylation (Nm) Modification in Human Diseases. *Genes*, 10(2): 117-140

Douglas, S.M. Bachelet, I. & Church, G.M. (2012). A Logic-Gated Nanorobot for Targeted Transport of Molecular Payloads. *Science*, 335(6070), 831-834.

Eder, P.S., DeVine, R.J., Dagle, J.M. & Walder, J.A. (1991). Substrate Specificity and Kinetics of Degradation of Antisense Oligonucleotides by a 3' Exonuclease in Plasma. *Nucl. Acid Ther.*,1(2), 141–151.

Edmondson, S.P. & Shriver, J.W. (2001). DNA Binding Proteins Sac7d and Sso7d from *Sulfolobus*. *Methods Enzymol.*, 334(1), 129-145.

Endo, M., Hidaka, K., Kato, T., Namba, K. & Sugiyama, H. (2009). DNA Prism Structures Constructed by Folding of Multiple Rectangular Arms. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(43),15570-15571.

Estrich, N., Hernandez-Garcia, A., de Vries. R & LaBean T. (2017). Engineered Diblock Polypeptides Improve DNA and Gold Solubility during Molecular Assembly. *ACS Nano*. 11(1), 831-842.

Fisher, T.L., Terhorst, T., Cao, X. & Wagner, R.W. (1993). Intracellular Disposition and Metabolism of Fluorescently Labeled Unmodified and Modified Oligonucleotides Microinjected into Mammalian Cells. *Nucleic Acids Res.*, 21(16), 3857–3865.

Fu, T. & Seeman, N. C. (1993). DNA Double-Crossover Molecules. *Biochemistry*, 32(13), 3211-3220.

García, M.C. & Quiroz, F. (2017). *Nanobiomaterials*. Chapter 13: Nanostructured Polymers. Reino Unido: Woodhead Publishing. P. 339-356.

Gerling, T., Kube, M., Kick, B.& Dietz H. (2018). Sequence-Programmable Covalent Bonding of Designed DNA Assemblies. *Sci. Adv.*, 4(8), 1-11.

González, M., Argaraña, C. & Fidelio G. (1999). Extremely High Thermal Stability of Streptavidin and Avidin upon Biotin Binding. *Biomol. Eng.*, 16(1-4), 67-72

Goodman, R., Schaap, I., Tardin, C., Erben, C., Berry, R., Schmidt, C., & Tuberfield, A. (2005). Rapid Chiral Assembly of Rigid DNA Building Block for Molecular Nanofabrication. *Science*, 310(5754), 1661-1665.

Gutiérrez-Wing, C. (2005). Las Nanopartículas: Pequeñas Estructuras con Gran Potencial, ¿Por Qué el Interés en estos Materiales?, ¿Qué Aplicaciones Tienen? *Contacto Nuclear*, 39 (1), 24-29

Han, D., Pal, S., Nangreave, J., Deng, Z., Liu, Y. & Yan, H. (2011). DNA Origami with Complex Curvatures in Three-Dimensional Space. *Science*, 332(6027), 342-346.

Haydukivska, K. & Blavatska, V. (2017). Probability of Loops Formation in Star Polymers in Long Range Correlated Disorder. *J. Chem. Phys.*, 146(1), 184904.

He, Y. & Mao, C. (2006). Balancing Flexibility and Stress in DNA Nanostructures. *Chem. Commun.*, 7(9), 968-969.

Hernández-García, A. (2014). *Protein-Based Polymers that Bind to DNA. Design of Virus Like Particles and Supramolecular Nanostructures*. (PhD Thesis). Wageningen University.

Hernandez-Garcia, A., Estrich, N., Werten, M., Van Der Maarel, J., LaBean, T., de Wolf, C.M. & de Vries, R. (2017). Precise Coating of a Wide Range of DNA Templates by a Protein Polymer with a DNA Binding Domain. *ACS Nano*, 11(1), 144-152.

Hernandez-Garcia, A., Kraft, D., Janssen, A., Bomans, P., Sommerdijk, N., Schoot, P., Stuart M.C. & de Vries, R. (2014). Design and Self-Assembly of Simple Coat Proteins for Artificial Viruses. *Nat. Nanotechnol.*, 9(9), 698–702.

Hernández-García, A., Werten, M., Cohen, M., de Wolf, F. & de Vries, R (2012). Coating of Single DNA Molecules by Genetically Engineered Protein Diblock Copolymers. *Small*, 8(22), 3491-501.

Holliday, R. (1964). A Mechanism for Gene Conversion in Fungi. *Genet. Res.*, 5(2), 282-304.

Humbert, N., Zocchi, A. & Ward, T.R. (2005). Electrophoretic Behavior of Streptavidin Complexed to a Biotinylated Probe: A Functional Screening Assay for Biotin-Binding Proteins. *Electrophoresis*, 26(1), 47-52.

Integrated DNA Technologies (s.f.). 5' C3 Spacer. Recuperado de <https://www.idtdna.com/site/Catalog/Modifications/Product/1087> [20 noviembre 2019].

J. Marek, J., Demjénová, E., Tomori, Z., Janáček, J., Zolotová, I., Valle, F., Favre, M. & G. Dietler (2005) Interactive Measurement and Characterization of DNA Molecules by Analysis of AFM Images. *Cytom. Part A*, 63(2), 87-93.

Jahnen-Dechent, W. & Ketteler, M. (2012). Magnesium Basics. *Clin. Kidney J.*, 5(1), 3–14.

Jeong, E.; Jeong, H., Jang, B., Kim, B., Kim, M., Kwon, H., Lee, K. & Lee H. (2017). Aptamer-Incorporated DNA Holliday Junction for the Targeted Delivery of siRNA. *J. Ind. Eng. Chem.*, 56(1), 55-61.

Jin, R, Wu G., Li Z., Mirkin, C.A & Schatz, G.C. (2003). What Controls the Melting Properties of DNA-Linked Gold Nanoparticle Assemblies? *J. Am. Chem. Soc.*, 125(6), 1643–1654.

Jones, M. Seeman, N. & Mirkin, C. (2015). Programmable Materials and the Nature of the DNA Bond. *Science*, 347(6224), 840-851.

Kallenbach, N. & Seeman, N. (1983). An Immobile Nucleic Acid Junction Constructed from Oligonucleotides. *Nature*, 305(1), 829-831.

Ke, Y., Sharma, J., Liu, M., Jahn, K. & Yan, H. (2009). Scaffolded DNA Origami of a DNA Tetrahedron Molecular Container. *Nano Lett.*, 9(6), 2445-7.

Kennedy, M. (2017). *Spontaneous Dissociation of Streptavidin from Biotinylated Double Stranded DNA* (Thesis). University of Colorado.

Khan, I., Saeed, K. & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, Applications and Toxicities. *Arab. J. Chem.*, 12(7), 908-931.

Khanna, K., Varshney, S. & Kakkar, A. (2010). Miktoarm Star Polymers: Advances in Synthesis, Self-Assembly, and Applications. *Polym. Chem.*, 1(1), 1171-1185.

Krebs, J., Goldstein, E. & Kilpatrick, S. (2017). *Genes XII* (12^o ed). Estados Unidos de América: Editorial Jones & Bartlett.

Lee, J. & Kim, H. (2013). Control of Nanoparticles on Branched DNA Nanostructures. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 9(7), 1245-1249.

Lim, K.H., Huang, H., Pralle, A. & Park, S. (2011). Engineered Streptavidin Monomer and Dimer with Improved Stability and Function. *Biochemistry*, 50(40), 8682-8691.

Lin, C.; Perrault, S., Kwak, M., Graf, M. & Shih, W. (2013). Purification of DNA-Origami Nanostructures by Rate-Zonal Centrifugation. *Nucleic Acids Res.*, 41(2), e40-5.

Liu, Q., Liu, G., Wang, T., Fu, J., Li, R., & Song, L. (2017). Enhanced Stability of DNA Nanostructures by Incorporation of Unnatural Base Pairs. *ChemPhysChem*, 18(21), 2977–2980.

Lourdou, X. & Chandrasekaran, A.R. (2018). DNA-based Construction at the Nanoscale: Emerging Trends and Applications. *Nanotechnology*, 29(6), 062001.

Mashaghi, S., Jadidi, T. Koenderik, G. & Mashaghi, A. (2013). Lipid Nanotechnology. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(2), 4242–4282.

McKee, T. J. & Komarova S. V. (2017). Is It Time to Reinvent Basic Cell Culture Medium? *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, 312(5), 624–626.

Meyer T.A. (2017). Purification Techniques for Three-Dimensional DNA Nanostructures. *Methods Mol. Biol.*, 1500, 109-119.

Musser, A. (2010). *Precision Control of DNA Nanostructures and the Utility of AFM for Their Characterization* (Master Thesis). University of Groningen.

Nagamune, T. (2017). Biomolecular Engineering for Nanobio/Bionanotechnology. *Nano Converg.*, 4(1), 1-56.

National Institute of Health (2010). *Nanotechnology at the National Institutes of Health*. Recuperado de <https://www.nih.gov/sites/default/files/research-training/nanotechnology-brochure.pdf> [12 febrero 2018].

Niemeyer, C.M., Adler, M., Pignataro, M., Lenhert, S., Gao, S., Chi, L., Fuchs, H. & Blohm, D. (1999). Self-Assembly of DNA-Streptavidin Nanostructures and their Use as Reagents in Immuno-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 27(23), 4553-61.

O'Neill, P., Rothmund, P. W. K, Kumar, A. & Fygenson, D.K. (2006). Sturdier DNA Nanotubes via Ligation. *Nano Lett.*, 6(7), 1379–1383.

Oropesa R. & Jáuregui, U. (2012). Las Nanopartículas como Portadores de Fármacos: Características y Perspectivas. *CENIC*. 43(3), 1-20.

Ortigão, J.F., Rösch, H., Selter, H., Fröhlich, A. , Lorenz, A. & Montenarh, M. (1992). Antisense Effect of Oligodeoxynucleotides with Inverted Terminal Internucleotidic Linkages: A Minimal Modification Protecting Against Nucleolytic Degradation. *Nucl. Acid Ther.*, 2(2), 129–146.

Pang, D., Thierry, A. R., & Dritschilo, A. (2015). DNA Studies Using Atomic Force Microscopy: Capabilities for Measurement of Short DNA Fragments. *Front. Mol. Biosci.*, 2(1), 1-7.

Perrault, S.D. & Shih, W.M. (2014). Virus-Inspired Membrane Encapsulation of DNA Nanostructures to Achieve In Vivo Stability. *ACS Nano*, 8(5), 5132–5140.

Ponnuswamy, N., Bastings, M., Nathwani, B., Ryu, J.H. Chou, L. & Vinther, M. (2017). Oligolysine-Based Coating Protects DNA Nanostructures from Low-Salt Denaturation and Nuclease Degradation. *Nat. Commun.*, 8(1), 15654.

Praetorius, F. & Dietz, H. (2017). Self-Assembly of Genetically Encoded DNA-Protein Hybrid Nanoscale Shapes. *Science*, 355(6331), 1283.

Pyne, A.L. & Hoogenboom, B.W. (2016). Imaging DNA Structure by Atomic Force Microscopy. *Methods Mol. Biol.*, 1431(1), 47-60.

Rajendran, A., Endo, M., Katsuda, Y., Hidaka, K. & Sugiyama, H. (2011). Photo-Cross-Linking-Assisted Thermal Stability of DNA Origami Structures and Its Application for Higher-Temperature Self-Assembly. *J. Am. Chem. Soc.*, 133(37), 14488–14491.

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. & Flower, R.J. (2008). *Farmacología* (6° ed.). Barcelona, España: Elsevier. P. 50.

Rivetti, C. & Codeluppi, S. (2001). Accurate Length Determination of DNA Molecules Visualized by Atomic Force Microscopy: Evidence for a Partial B- to A-Form Transition on Mica. *Ultramicroscopy*, 87(1–2), 55-66.

Rothemund, P. W. (2006). Folding DNA to Create Nanoscale Shapes and Patterns. *Nature*, 440(7082), 297-302.

Rudiuk, S., Venancio-Marquez, A., Hallais, G. & Baigl, D. (2013). Preparation of One- to Four-Branch Silver Nanostructures of Various Sizes by Metallization of Hybrid DNA–Protein Assemblies. *Soft Matter*, 9, 9146-9152.

Seeman, N. & Sleiman, H. (2017). DNA Nanotechnology. *Nat. Rev. Mater.*, 3, 1-23.

Seeman, N.C. Nanomaterials Based on DNA. (2010). *Annu. Rev. Biochem.*, 79(1), 65–87.

Seeman, N.C. Nucleic Acid Junctions and Lattices. (1982). *J. Theor. Biol.*, 99(2), 237–247.

Sharon, M., Sharon, M., Pandey, S. & Oza, G. (2012). *Bio-Nanotechnology. Concepts and Applications*. Reino Unido: CRC Press.

Shaw, A., Benson, E. & Högberg, B. (2015). Purification of Functionalized DNA Origami Nanostructures. *ACS Nano*, 9(5), 4968-4975

Shaw, J.P., Kent, K, Bird, J. , Fishback J., & Froehler, B. (1991). Modified Deoxyoligonucleotides Stable to Exonuclease Degradation in Serum. *Nucleic Acids Res.*, 19(4), 747–750.

Sigma-Aldrich (s.f.). *Phosphorothioate Oligonucleotides*. Merck. Recuperado de <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/phosphorothioates.html> [20 noviembre 2019].

Tian, Y., He, Y., Ribbe, A. & Mao, C. (2006). Preparation of Branched Structures with Long DNA Duplex Arms. *Org. Biomol. Chem.*, 4(18), 3404-3405.

Vologodskii, A. (2015). *Biophysics of DNA*. Reino Unido: Cambridge University Press.

Waner, M., Hiznay, J.M., Mustovich, A.T., Patton, W. & Mascotti, D.P. (2019). Streptavidin Cooperative Allostereism Upon Binding Biotin Observed by Differential Changes in Intrinsic Fluorescence. *Biochem. Biophys. Rep.*, 17(1),127-131.

Wang, D., Liu, Q., Wu, D., He, B., Li, J. & Mao, C. (2018). Isothermal Self-Assembly of Spermidine–DNA Nanostructure Complex as a Functional Platform for Cancer Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 10(18), 15504–15516.

Wang, X. & Seeman, N. C. (2007). Assembly and Characterization of 8-Arm and 12-Arm DNA Branched Junctions. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(26), 8169-8176.

Watson, J.D., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. & Losick, R. (2014). *Molecular Biology of the Gene* (7° Ed.). Estados Unidos de América: Pearson.

Wu, W., Wang, W. & Li, J. (2015). Star Polymers: Advances in Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.*, 46(1), 55-85.

Youtsey, S. (2015). *Inverted Bases*. Integrated DNA Technologies. Recuperado de <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/inverted-bases> [20 noviembre 2019].

Zhou, Q., Zhang, L. & Wu, H. (2017). Nanomaterials for Cancer Therapies. *Nanotechnol. Rev.*, 6(5), 473-496.

Secuencias de las proteínas empleadas

C ₄ -B ^{K12}
GPP(GEPGNPGSPGNQGQPGNKGSPGNPGQPGNEGQPGQPGQNGQPGE GSNGPQGSQGNPGKNGQPGSPGSQGSPPGNQGSPPGNPGQPGEQGKPG NQGPA) ₄ GGKKKKKKKKKKKKG
C ₄ -S ₁₀ -B ^{K12}
GCGLGAGAP(GEPGNPGSPGNQGQPGNKGSPGNPGQPGNEGQPGQPGQ GQPGEPGSNGPQGSQGNPGKNGQPGSPGSQGSPPGNQGSPPGNPGQPG EQGKPGNQGPA) ₄ GAGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAG AGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAG KKKKKKKKKKKKGA
C ₈ -B ^{Sso7d}
GPP(GEPGNPGSPGNQGQPGNKGSPGNPGQPGNEGQPGQPGQNGQPGE GSNGPQGSQGNPGKNGQPGSPGSQGSPPGNQGSPPGNPGQPGEQGKPG NQGPA) ₈ GGATVKFKYKGEEKEVDISKIKVWRVGKMISFTYDEGGGKTGRGAV SEKDAPKELLQMLEKQKK

Secuencia del plásmido REDOX_switch_pMK-T

```

5'CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATT
TTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCCAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAG
GGTTGAGTGGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCATTAGGCTGCGCAACTGTTGGGAA
GGGCGTTTCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGC
AAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCC
AGTGAGCGCGACGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGAAGGAAGGCCGTCAAGGCCAC
GTGTCTTGTCAGAGCTCGGATCCGGTTGGTAGCCTGCAAGAACTGGCAGTTCAGAAAGGT
TGGCGTCTGCCGGAATATACCGTTGCACAAGAAAGCGGTCCGCCTCATAAACGTGAATTTA
CCATTACCTGTCGTGTTGAAGGTGGTAGCGGTGGTGGTTGTGGTGGTGAATTCGTGCACT
GAAATATGAAATTGCACGTCTGAAACAGGCAGCACAGGCCAAAAATCCGTGCCCTGGAACAG
AAAATTGCAGCACTGGAAGGTGGCTGTGGCGGTGGTTGAGGTGGCACCTTTGTTGAAACCG
GTAGCGGCACCAGCAAACAGGTTGCAAACGTGTTGCAGCAGAAAACTGCTGACCAAATT
CAAACCTAAGAATTCGGTACCTGGAGCACAAGACTGGCCTCATGGGCCTTCCTTTCACTGC
CCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAACATGGTCATAGCTGTTTCCTT
GCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGGTAA
AGCCTGGGGTGCCTAATGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCG
GTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCA
AGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCT
CCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCC
TTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTC
GTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCCGACCGCTGCGCCTTAT
CCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGC
CACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGG
TGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGT
TACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGT
GGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTT
GATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCA
TGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAAT
CTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTATTAGAAAAATTCATCCAGCAGACGATA
AAACGCAATACGCTGGCTATCCGGTGCCGCAATGCCATACAGCACCGAGAAAACGATCCGCC
CATTCGCCGCCAGTTCTTCCGCAATATCACGGGTGGCCAGCGCAATATCCTGATAACGAT
CCGCCACGCCCAGACGGCCGCAATCAATAAAGCCGCTAAAACGGCCATTTTCCACCATAAT
GTTGCGGCAGGCACGCATCACCATGGGTACCAACAGATCTTCGCCATCCGGCATGCTCGCT
TTCAGACGCGCAAACAGCTCTGCCGGTGCCAGGCCCTGATGTTCTTCATCCAGATCATCCT
GATCCACCAGGCCCGCTTCCATACGGGTACGCGCACGTTCAATACGATGTTTCGCTGATG
ATCAAACGGACAGGTGCGCGGGTCCAGGGTATGCAGACGACGCATGGCATCCGCCATAAT
GCTCACTTTTTCTGCCGGCGCCAGATGGCTAGACAGCAGATCCTGACCCGGCACTTCGCCC
AGCAGCAGCCAATCACGGCCCGCTTCGGTCACCACATCCAGCACCGCCGCACACGGAACA
CCGGTGGTGGCCAGCCAGCTCAGACGCGCCGCTTCATCCTGCAGCTCGTTCAGCGCACCG
CTCAGATCGGTTTTACAAACAGCACCGGACGACCCTGCGCGCTCAGACGAAACACCGCCG
CATCAGAGCAGCCAATGGTCTGCTGCGCCCAATCATAGCCAAACAGACGTTCCACCCACGC
TGCCGGGCTACCCGCATGCAGGCCATCCTGTTCAATCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTG
AAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAA
ACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC-3'

```

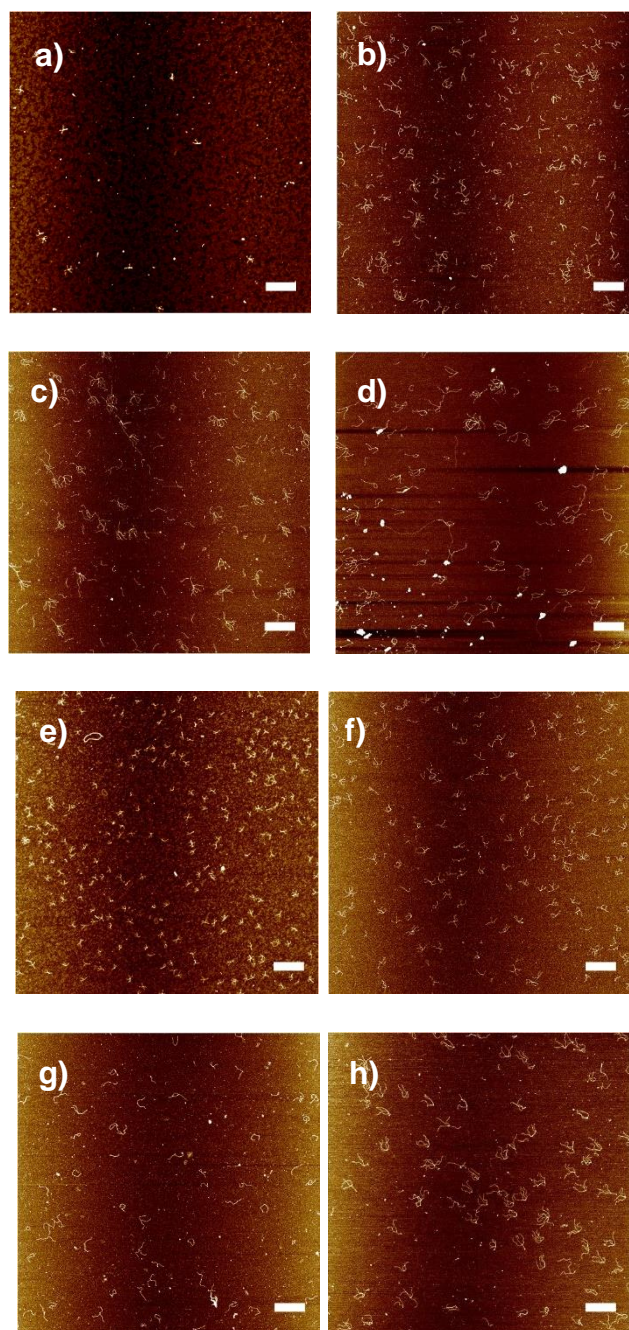
AFM de área 5 x 5 μm para nanoestructuras sin proteína

Figura C. AFM de nanoestructuras obtenidas por hibridación con CLS y dsDNA de a) 211 pb, b) 367 pb, c) 539 pb y d) 722 pb; y mediante interacción entre estreptavidina y DNA biotinilado de e) 201 pb, f) 368 pb, g) 555 pb y h) 732 pb. Barra de escala: 500 nm

AFM de área 5 x 5 μm para nanoestructuras recubiertas con proteínas

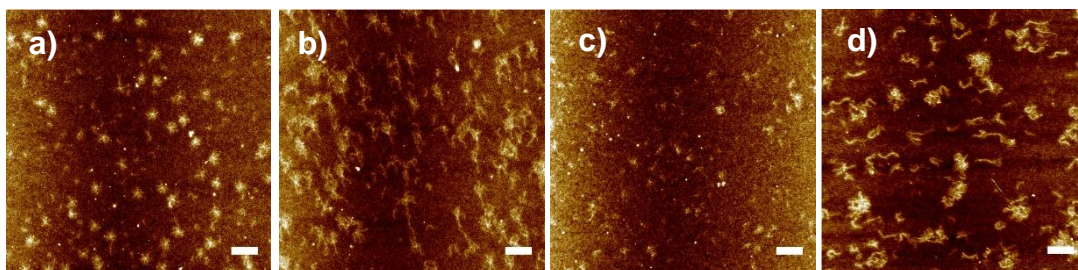


Figura D1. AFM de nanoestructuras recubiertas con $\text{C}_4\text{-B}^{\text{K12}}$. a) Nanoestructuras CLS 367 pb, b) Nanoestructuras CLS 722 pb c) Nanoestructuras estreptavidina-DNA biotinilado 368 pb y d) Nanoestructuras estreptavidina-DNA biotinilado 732 pb. Barra de escala: 500 nm

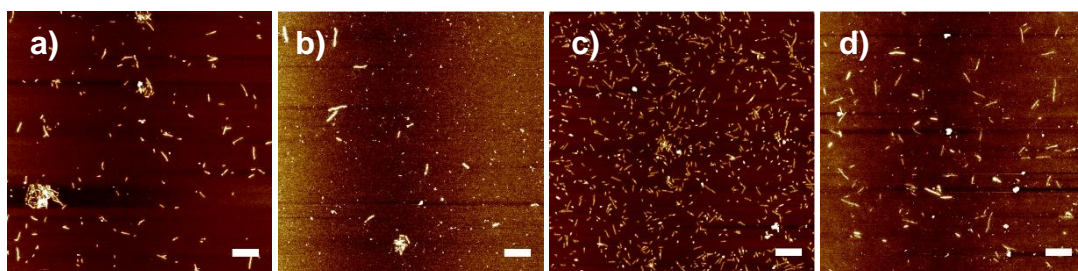


Figura D2. AFM de nanoestructuras recubiertas con $\text{C}_4\text{-S}_{10}\text{-B}^{\text{K12}}$. a) Nanoestructuras CLS 367 pb, b) Nanoestructuras CLS 722 pb c) Nanoestructuras estreptavidina-DNA biotinilado 368 pb y d) Nanoestructuras estreptavidina-DNA biotinilado 732 pb. Barra de escala: 500 nm

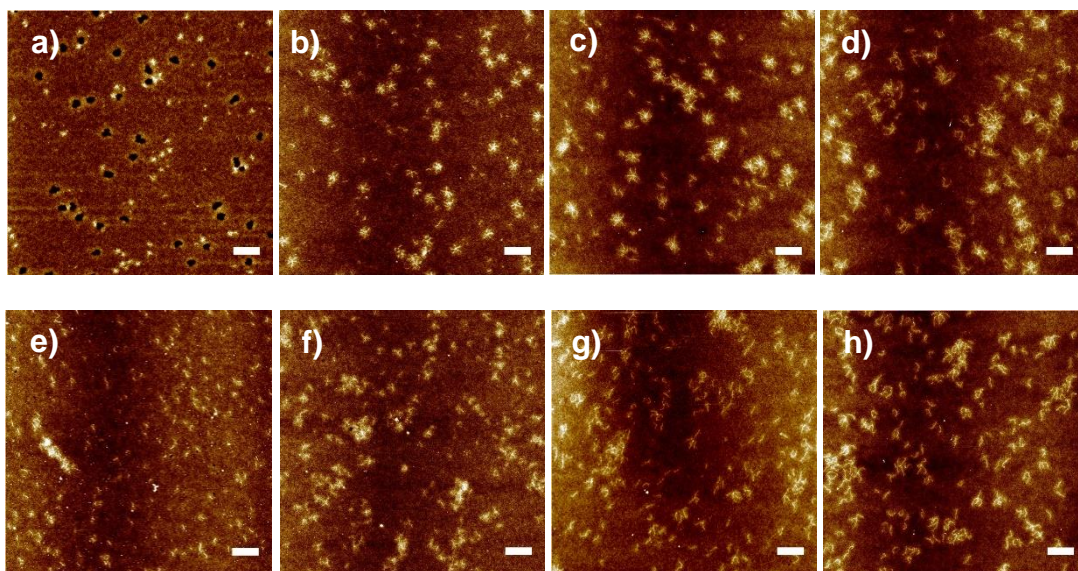


Figura D3. AFM de nanoestructuras recubiertas con $\text{C}_8\text{-B}^{\text{SSo7d}}$. Nanoestructuras obtenidas por hibridación con CLS y dsDNA de a) 211 pb, b) 367 pb, c) 539 pb y d) 722 pb; y mediante interacción entre estreptavidina y DNA biotinilado de e) 201 pb, f) 368 pb, g) 555 pb y h) 732 pb. Barra de escala: 500 nm

Distribuciones en número de nanoestructuras.

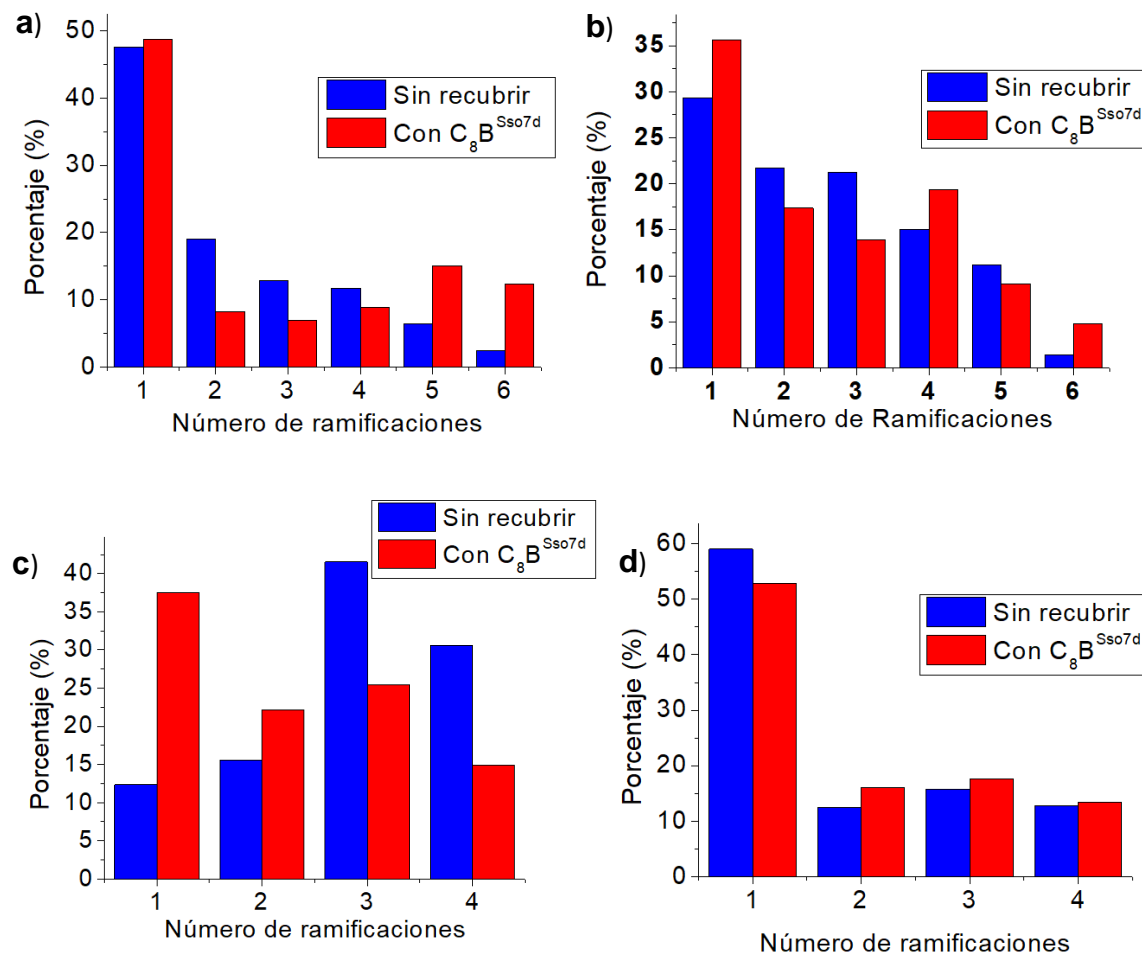


Figura E. Distribuciones en número para a) Nanoestructuras CLS con ramificaciones de 367 pb, b) Nanoestructuras CLS con ramificaciones de 722 pb, c) Nanoestructuras de estreptavidina y DNA biotilado de 368 pb, d) Nanoestructuras de estreptavidina y DNA biotilado de 732 pb.

Distribuciones en número de las nanoestructuras incubadas a 37 y 50 °C

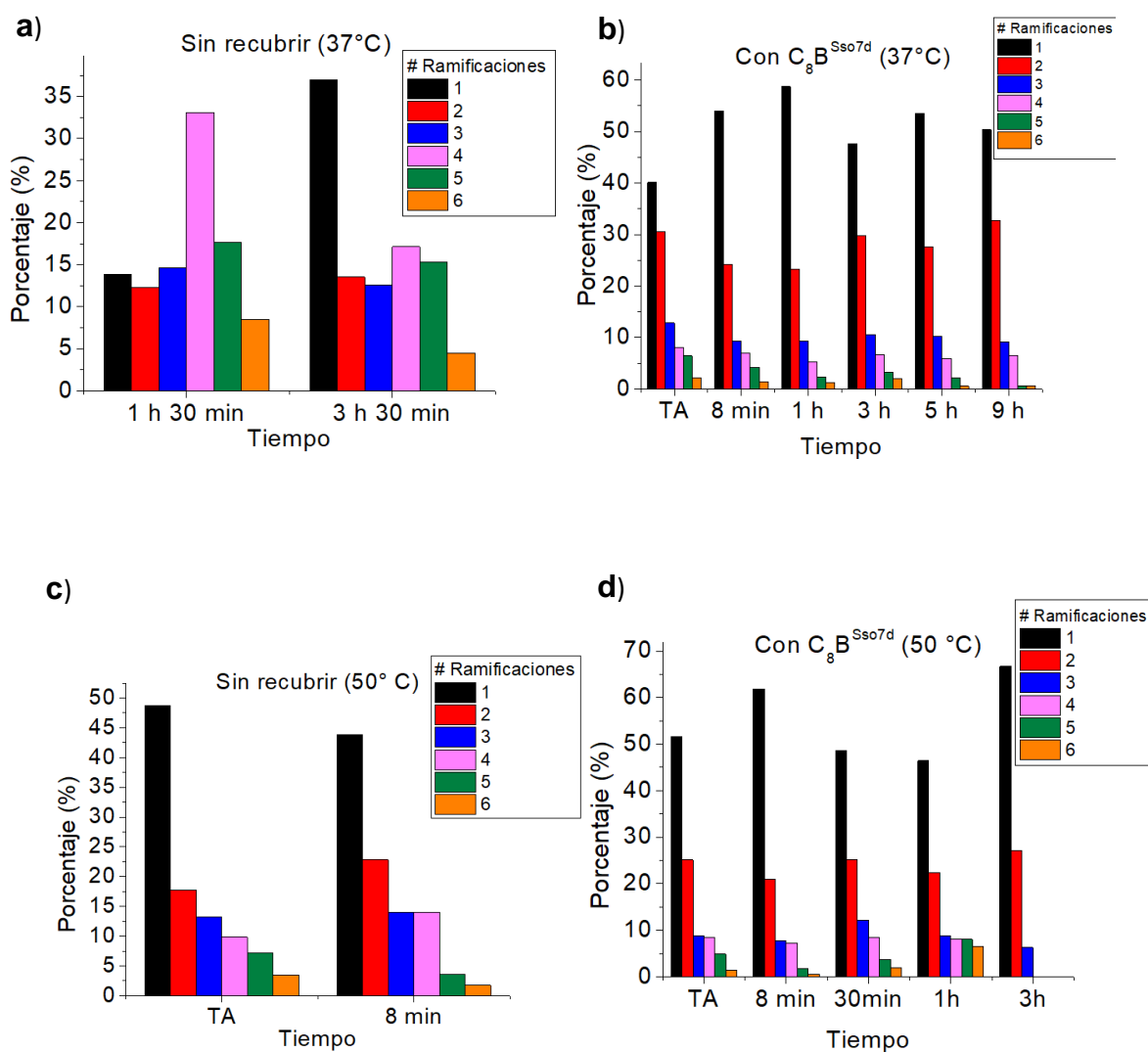


Figura F. Distribuciones en número de las nanoestructuras CLS con dsDNA de 367 pb incubadas durante distintos periodos de tiempo. a) sin recubrir, a 37 °C, b) recubiertas con C_8B^{Sso7d} , a 37 °C, c) sin recubrir, a 50 °C, y d) con C_8B^{Sso7d} a 50 °C.

Secuencias de oligonucleótidos complementarios a M13mp18.

42c32 (5'→3')
GCTGCTGTCACGTGCTCAGCATGTATGACTCG CATTAATGAATCGGCCAA CGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGT
42c32c (5'→3')
CGAGTCATACATGCTGAGCACGTGACAGCAGC CATTAATGAATCGGCCAA CGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGT

En rosa y verde se indican las secuencias de los oligos que son complementarias entre sí, mientras que el color rojo permite identificar la secuencia complementaria a M13mp18.

Publicación

Sanchez-Rueda, E.G., Rodriguez-Cristobal, E., Moctezuma-Gonzalez, C.L., & Hernandez-Garcia, A. (2019). Protein-coated dsDNA nanostars with high structural rigidity and high enzymatic and thermal stability. *Nanoscale*. 11, 18604-18611. DOI: 10.1039/c9nr05225a.



Nanoscale

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue



Cite this: *Nanoscale*, 2019, 11, 18604

Protein-coated dsDNA nanostars with high structural rigidity and high enzymatic and thermal stability†

Eddie G. Sanchez-Rueda,[†] Estefani Rodriguez-Cristobal,
Claudia L. Moctezuma González and Armando Hernandez-Garcia^{†*}

DNA nanotechnology creates precise shape-specific nanostructures through the self-assembly of short ssDNA oligonucleotides. One such shape, which has relevant biomedical applications due to its multi-valency, is the star. However, building star-like nanostructures with a large size (>100 nm) using ssDNA is complex and challenging. This study presents a novel strategy to prepare stiff and large dsDNA nanostars by assembling duplex DNA fragments into star-shapes that are subsequently coated with a virus-inspired protein. The protein binds dsDNA and overcomes the high structural flexibility of naked dsDNA. The nano-star-like dsDNA templates with up to six arms were prepared by self-assembly of PCR-produced dsDNA fragments (211 to 722 bp) with a central DNA junction. Through gel electrophoresis and Atomic Force Microscopy it is demonstrated that single dsDNA nanostars are self-assembled and coated with the protein, and this has a large stiffening effect on the nanostar. Furthermore, the coating significantly enhances stability at high temperatures and protects nanostars against nuclease degradation for at least 10 hours. This study shows that DNA-binding proteins can be harnessed as structural "rigidifiers" of flexible branched dsDNA templates. This strategy opens a way to prepare structurally defined hybrid protein–dsDNA nanostructures that could be exploited as building blocks for novel DNA nanomaterials.

Received 19th June 2019,
Accepted 23rd September 2019
DOI: 10.1039/c9nr05225a
rsc.li/nanoscale

Introduction

Shape-specific nanostructures are one of the most promising platforms for the development of next-generation nanomaterials with advanced functionalities.^{1–10} Star-shaped nanostructures with sizes up to a few tens of nanometers such as n-point-star DNA junctions,^{10–12} DNA dendrimers,^{2,13} and n-arm junctions^{14,15} have been developed through bottom-up molecular assembly. They have important biomedical applications as delivery systems and as scaffolds for displaying immunostimulatory and antibacterial chemical moieties.^{1,2,13} These branched DNA nanostructures are traditionally built *via* the self-assembly of many short single-strand DNA oligonucleotides (ssDNA), which are readily accessible through solid phase synthesis; however, building branched nanostructures of larger sizes (>100 nm) using only short oligonucleotides is more challenging¹⁶ and involves complex assembly pathways and protocols.^{17,18}

An alternative strategy to build large branched DNA nanostructures is through the use of long double strand DNA fragments (dsDNA) instead of ssDNA. The advantages of dsDNA include: (1) straightforward and economical synthesis in large amounts using standard PCR techniques; (2) its availability from a large number of biological sources; (3) the potential to tune its physical, chemical and biochemical properties on demand through a large arsenal of available DNA-binding proteins;^{19–32} and (4) the possibility of replicating it in cells, or cell-free extracts, which could, in turn, enable DNA nanostructure synthesis inside living organisms.³⁰ However, the use of dsDNA as a building block for self-assembled branched DNA nanostructures has not been sufficiently explored. To date, there are just a few reports of using dsDNA on a previously formed DNA origami, or that involve a thermal denaturation step to obtain ssDNA strands.^{31,33,34} A previously reported method of producing dsDNA nanostars uses streptavidin tetramer and biotinylated dsDNA, although effective and complementary, however, it is limited only to 4-arm nanostars.³⁵ In this study we developed an original method based on dsDNA and oligonucleotides to produce nanostars with a higher number of arms.

The key restriction to dsDNA being used to build complex nanostructures is its lack of high structural rigidity because of its low persistence length (~50 nm) at near physiological con-

Laboratory of Biomolecular Engineering and Bionanotechnology, Chemistry of Biomacromolecules Department, Institute of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, Ciudad Universitaria, Coyoacan, Mexico City, 04310, Mexico.
E-mail: armandohg@quimica.unam.mx

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c9nr05225a

ditions.³⁶ Also, because stable natural branched dsDNA fragments do not exist (they are naturally transient and unstable).³⁷ It has been shown that proteins that bind to linear dsDNA can have a stiffening effect.^{22,25,38,39} Recently, it has been demonstrated that single linear dsDNA molecules can be coated with virus-inspired DNA-binding proteins, thereby increasing the persistence length of the complexes by several folds.^{23,26–28,32} This result suggests that coating dsDNA with DNA-binding proteins could provide a way to reduce the inherent structural flexibility of dsDNA fragments. The combination of dsDNA fragments and DNA-binding proteins that increase nanoscale rigidity could compensate for the inherent high flexibility of dsDNA, and concomitantly protect it against enzymatic attack and elevated temperatures.^{19,20,26,27,29} A new class of building blocks could result from the combination of long dsDNA fragments and DNA-binding proteins, where the dsDNA affords programmability and the DNA-binding proteins function as nanoscale structural “rigidifiers”. Furthermore, hybrid protein–dsDNA complexes might provide a simpler alternative strategy than the design and synthesis of ssDNA oligonucleotides that cross over multiple DNA double helices in parallel to form stiff multihelical bundles or sheets^{40,41} or using a rigid nanoparticle as a scaffold for the immobilization and organization of DNA strands.⁴²

Based on extensive electrophoretic analysis and atomic force microscopy (AFM) characterization, here we show a self-assembly strategy to produce flexible branched dsDNA nanostructures (which we term “dsDNA nanostars”) programmed to bear different branch lengths. Then, we probed their coating with three different virus-inspired protein polymers^{26–28} in order to achieve hybrid DNA–protein nanostars with stiffened and more structurally defined branches. Finally, for possible future applications in biological environments, we investigated if branched shape-specific dsDNA nanostars, both bare and protein-coated, could provide enhanced thermal stability in physiologically relevant temperatures and stability against enzymatic attack. Given that research in structural DNA nanotechnology has progressed to building crossover DNA tiles with greater rigidity from relatively flexible branched junction structures and topological structures, protein–dsDNA hybrid nanostructures might be a novel strategy to develop larger nanostructures. The development of strategies to create new types of building blocks and nanostructures, like the stiff hybrid protein–dsDNA nanostars here reported, is crucial to expand the toolkit in bionanotechnology, and opens new ways to create novel DNA-based materials with complex functionalities.

Results and discussion

Design and preparation of components for protein–dsDNA nanostars

Our method is based on the use of dsDNA fragments (called arms) bearing sticky-end overhangs that self-assemble with a central three-arm junction, called “CLS”, that carries up to six

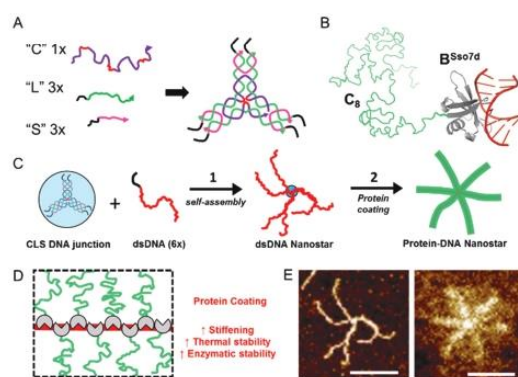


Fig. 1 Self-assembly of hybrid protein–dsDNA nanostars. (A) CLS DNA junction with 6 sticky ends. (B) DNA-binding protein C_8-B^{5so7d} . (C) Preparation of DNA nanostars through self-assembly of dsDNA fragments bearing sticky overhangs complementary and the CLS DNA junction. (D) dsDNA nanostars are coated with protein to increase its stiffness and stability against high temperature and degradation by nucleases. (E) AFM images of a naked (left) and protein-coated (right) dsDNA nanostar. Scale bar is 125 nm.

complementary sticky ends (Fig. 1A and Fig. S1†). 6-Arms nanostars were chosen as a proof of concept that we are able to prepare dsDNA nanostars with higher number of arms than previous reports.³⁵ Also, 6-arm may be enough to achieve stiffening of protein–DNA nanostructures. The nanostars produced through this method are called “CLS nanostars”. The CLS junction is made up of three oligonucleotides—Central (C, 78 nt), Large (L, 48 nt) and Small (S, 27 nt)—and is prepared by thermal annealing (Fig. S1†).^{10,12,43} The C oligonucleotide sequence was programmed to self-assemble with three copies of both oligonucleotides L and S. The latter oligonucleotides carry the sticky-ends which enable the self-assembly with a maximum of six dsDNA fragments. The final structure has 114 bp plus 60 nucleotides of the sticky ends and it runs in the gel as a ~200 bp structure.

Conventional PCR using chemically modified primers was used for the production of dsDNA fragments of length 211, 367, 539 and 722 bp. Each fragment also contained a 10 nucleotides sticky-end overhang. The primers have a polyethylene glycol (PEG₃) spacer “S” between the desired sticky-end overhang “Oh” and the primer “P” sequences (5′ Oh-S-P 3′) (Fig. S2a†). The function of the spacer is to arrest the template extension by the polymerase in every cycle (Fig. S2b†), leaving the overhang sequence single-strand. This method produces linear dsDNA fragments with a yield of 100% bearing overhangs of any desired length, and capable of interacting with a complementary sequence (Fig. S2c and S3†). The previously reported method to produce dsDNA nanostars involves the self-assembly of biotinylated dsDNA fragments with a streptavidin tetramer to obtain “Stv-Bt nanostars” with up to four arms (Fig. S4†).³⁵

Three different virus-coat-like proteins that bind to single dsDNA molecules were evaluated to determine if they could provide structural rigidity to the branched dsDNA nano-

structures and enhance their thermal and biochemical stability (Fig. 1B–E). The first protein, termed “C₈-B^{Sso7d}”, is composed of a long colloidal stability block “C₈” fused to a non-sequence specificity dsDNA binding domain “B^{Sso7d}” derived from the archaea *Sulfolobus solfataricus* (Fig. 1B).²⁶ The other two proteins are the virus-coat-like proteins “C₄-B^{K12}” and “C₄-S₁₀-B^{K12}”, where “C” is a colloidal stability block, “B^{K12}” an unspecific electrostatic-based DNA binding domain and “S₁₀” a silk-based self-assembly block.^{27,28} The proteins, which were previously reported to bind and coat single linear dsDNA molecules, have never been evaluated for coating branched dsDNA structures.

Self-assembly of star-shaped dsDNA nanostructures

The self-assembly of complexes between dsDNA fragments carrying a 10 nt sticky end and the CLS junction (Fig. 2) or streptavidin (Fig. S5†) was assessed by agarose gel electrophoresis. We used dsDNA fragments with four lengths: 211, 367, 539 and 722 bp. The gel shows that each dsDNA fragment formed five distinct bands when mixed with the CLS junction with the lowest and highest bands being the most intense. The formation of five bands was also observed when dsDNA fragments with longer sticky ends (15 and 20 nt) were used (Fig. S6†). For example, in the case of the dsDNA fragment with a length of 367 bp, the observed bands had apparent sizes of ~400, ~800, ~1400, ~1700 and ~2300 bp, which are higher than the expected sizes for their linear counterparts: 734 (2×), 1101 (3×), 1468 (4×), 1835 (5×), and 2202 (6×). Considering that dsDNA with a branched topology runs more slowly (higher molecular weight) and binding to the CLS junction would add a mass of 174 bp (CLS junction itself runs in gel as a ~200 bp structure, see Fig. S1†), therefore, the observed bands could correspond to the dsDNA nanostars.⁴⁴ On the other hand, the lower band for all lanes seem to correspond

to a dsDNA arm alone because it matches the size of the arm without binding to the CLS junction, otherwise they would have a noticeable increase in size. A similar pattern was observed when we evaluated the formation of complexes between the streptavidin tetramer and four different biotinylated dsDNA arms (Fig. S5†).

Following purification of single bands from the gel and their re-analysis by electrophoresis, several bands of lower size than the original always appeared, independently of the method to form the complexes (Fig. S7 and S8†). This suggests that the complexes are disassembling while passing through the gel, possibly due by increased frictional forces. The disassembly effect, combined with low yield of formation of the 6-arm CLS dsDNA nanostar (as seen later by AFM), could explain why we observe a very intense bottom band and do not observe 6 bands in the agarose gel (Fig. 2 and Fig. S6†). Overall, the results suggest the formation of complexes between the CLS junction and the 5' Oh₁₀-S-dsDNA fragments of a wide range of lengths.

Atomic force microscopy characterization of naked dsDNA nanostars

We used AFM to verify the shape and physical dimensions of the resultant branched dsDNA complexes. We prepared CLS dsDNA complexes using dsDNA fragments with lengths of 367 and 722 bp (Fig. 3 and Fig. S9†). The AFM images show that all samples formed nanostructures with an undulating branched shape but still lacking a well-defined and regular star shape. CLS dsDNA nanostars with a maximum of 6 arms were observed when both dsDNA fragments of 367 and 722 bp were used (Fig. S16†). The average length of the arms was 123 ± 4.9 (SEM) nm when using dsDNA of length 367 bp and 239 ± 5.5 (SEM) nm for dsDNA of 722 bp. The values closely matched the theoretical lengths of ~125 and ~245 nm for dsDNA fragments of 367 bp, and 722 bp, respectively

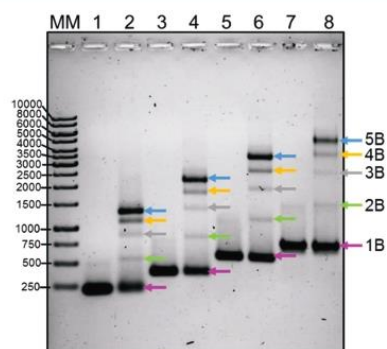


Fig. 2 Self-assembly of branched dsDNA nanostars. Electrophoretic mobility shift assay showing the results of the complexes formed after incubation of CLS DNA junction with linear dsDNA fragments bearing discrete overhangs in a 1:6 molar excess. dsDNA 211 bp alone (1) and with CLS junction (2), dsDNA 367 bp alone (3) and with CLS junction (4), dsDNA 539 bp alone (5) and with CLS junction (6), and dsDNA 722 bp alone (7) and with CLS junction (8). MM: Molecular markers.

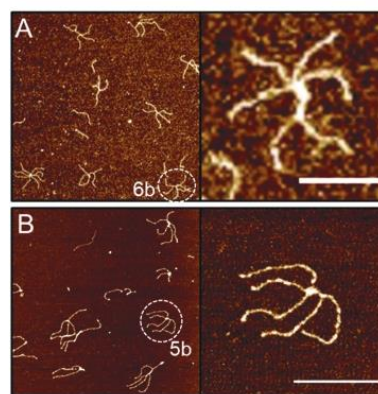


Fig. 3 AFM images of naked CLS dsDNA nanostars with branch length of 367 bp (A) and 722 bp (B). Left images are $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$ ('5b and 6b' indicates the number of branches). Scale bars in zoom-in images are 125 nm (A) and 250 nm (B).

(calculated using the canonical length of 0.34 nm bp^{-1} for dsDNA). Their undulating shape could be because the arms have a longer contour length than the persistence length of dsDNA ($\sim 50 \text{ nm}$). Streptavidin–biotin method allowed to prepare dsDNA nanostars with a maximum of 4 arms (Fig. S10†). The average height of the dsDNA branches is $\sim 0.5 \text{ nm}$ (Fig. S11†), matching the previously reported AFM values for dsDNA prepared in the same way.^{27,28} These results confirm that our methodology yielded self-assembled complexes with the expected branched shape with very flexible arms.

Binding of dsDNA nanostars with proteins

Next, using Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA), we evaluated how increasing concentrations of the virus-coat-like proteins C_8-B^{Sso7d} , C_4-B^{K12} and $C_4-S_{10}-B^{K12}$, bind to dsDNA nanostars. Here we used nanostars bearing dsDNA arms with lengths of 367 and 722 bp (Fig. 4 and Table S3†). Stv-Bt nanostars are shown in Fig. S12.† We studied the reduction of the mobility of the dsDNA nanostars due to the neutralization of their negative charge by the addition of protein (expressed as a molar ratio of protein to DNA bp –ptn/bp– for protein C_8-B^{Sso7d} , or of positive charges from amino groups in the binding block “N” to negative charges from DNA phosphates “P” –N/P– for proteins C_4-B^{K12} and $C_4-S_{10}-B^{K12}$).

The negative charge of the CLS nanostars with arms of 367 and 732 bp was neutralized by the addition of C_8-B^{Sso7d} at ptn/bp = 0.25 and 0.5, respectively (Fig. 4A and B). When C_4-B^{K12} was added, neutralization was achieved at N/P = 2 (0.33 ptn/bp) for 367 bp and >2 ($>0.33 \text{ ptn/bp}$) for 732 bp (Fig. 4C and D), and for $C_4-S_{10}-B^{K12}$ at N/P = 4 (0.67 ptn/bp) for 367 bp and ~ 8 (1.33 ptn/bp) for 732 bp (Fig. 4E and F). C_8-B^{Sso7d} ptn/bp

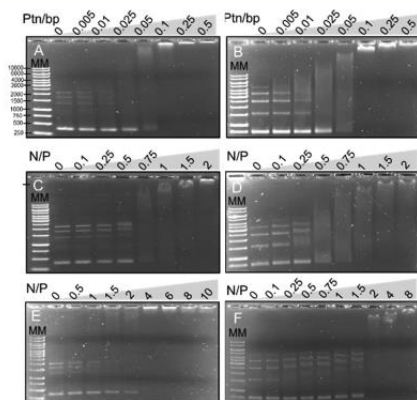


Fig. 4 Binding CLS dsDNA nanostars with virus-coat-like proteins. Electrophoretic mobility shift assays showing complexes formed between CLS DNA junction and dsDNA fragments of 367 bp (left column) and 722 bp (right column) being bound by protein C_8-B^{Sso7d} (A and B), C_4-B^{K12} (C and D) and $C_4-S_{10}-B^{K12}$ (E and F). N/P: ratio between total positive charge from protein and total negative charge from DNA nanostar.

ratio of 0.25 was previously reported to achieve charge neutralization for linear dsDNA fragments,²⁶ which means that only DNA nanostars with short arms were neutralized at the expected protein-to-DNA ratio, whereas the nanostars with long arms needed higher protein-to-DNA ratio. A similar situation happened for proteins C_4-B^{K12} and $C_4-S_{10}-B^{K12}$. Charge neutralization for linear dsDNA fragments using C_4-B^{K12} and $C_4-S_{10}-B^{K12}$ was previously achieved at N/P of ~ 1 ,^{27,28} indicating that these proteins needed higher protein-to-DNA ratio for branched structures, especially the ones with larger arm size. Neutralization of dsDNA nanostars with longer arms required higher protein-to-DNA ratios than smaller arms, possibly related to a higher steric hindrance caused by the longer arms. In summary, our results show that the dsDNA nanostars are being bound by all the virus-inspired proteins, with the protein C_8-B^{Sso7d} requiring a lower protein-to-DNA bp ratio to obtain similar charge neutralization of dsDNA nanostars than C_4-B^{K12} and $C_4-S_{10}-B^{K12}$ (Table S3†).

Atomic force microscopy characterization of dsDNA nanostars coated with proteins

The results of coating the dsDNA nanostars with the proteins are shown in Fig. 5 and Fig. S13–S15.† CLS dsDNA nanostars coated with C_8-B^{Sso7d} show a distinctive star-like shape (Fig. 5A and B) in comparison to naked structures lacking protein (Fig. 3A and B). Most of the C_8-B^{Sso7d} coated structures with arms of 367 bp have mostly 6 arms which look stiff, leading to a structurally regular and symmetric star-like shape (Fig. 5A, Fig. S13a and S14a–b†). The arms look more flexible when longer arms of 722 bp are used (Fig. 5B). For Stv-Bt nanostars coated with protein C_8-B^{Sso7d} , branched structures with up to four arms were observed (Fig. 5C and D). However, they look less defined than structures obtained through our method (CLS dsDNA nanostars). When using protein C_4-B^{K12} , the CLS dsDNA nanostars (Fig. S15a and b†) have a less defined shape. Although the arms and star-shape are still recognizable in the periphery of the structure, they are less defined in the center. On the other hand, most of Stv-Bt dsDNA nanostars do not

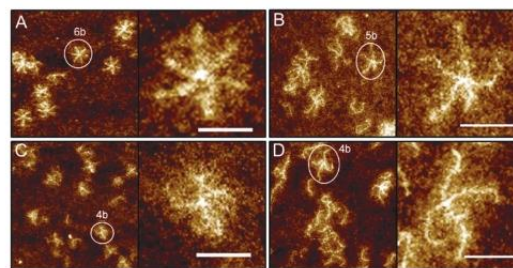


Fig. 5 dsDNA nanostars coated with virus-coat-like protein C_8-B^{Sso7d} . AFM images of CLS dsDNA nanostars (top row) with branch length of 367 bp (A) and 722 bp (B), and Stv-Bt dsDNA nanostars (bottom row) with branch length of 368 bp (C) and 732 bp (D). Ptn/bp = 0.5. Images are $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$ (except zoom-ins). The scale bars of zoom-in images are 125 nm (A & C) and 250 nm (B & D).

have star-shaped structures (Fig. S15c and d†). Using the C_4 - S_{10} - B^{K12} protein led to complete loss of the star-like shape of the structures obtained by both strategies. Only thick and stiff rod-like particles are mainly observed (Fig. S15e-h†). Mass distributions of dsDNA nanostars by number of branches show that most abundant CLS dsDNA nanostars have 6 and 5 arms for 367 and 722 bp, respectively, when coated with C_8 - B^{Sso7d} (Fig. S16†). In summary, C_8 - B^{Sso7d} is the most promising protein for coating single dsDNA nanostars without affecting their branched shape. The other proteins disrupted the star-shape, so they were set aside for the following experiments.

Next, we compared the stiffening effect in CLS nanostars with different arm lengths by coating them with the C_8 - B^{Sso7d} protein (Fig. 6). By comparing the AFM structures for naked and protein coated nanostars, we observed that protein coated nanostars bearing arms with lengths of 367 and 539 bp were properly displaying all their arms and were structurally stiffened and, thus, better defined than nanostars bearing longer (722 bp) or shorter (211 bp) arms. Protein coated nanostars with the same arm length but lesser number of arms looked less defined (Fig. 5C and D). This indicates that dsDNA nanostar templates with a higher number of arms of intermediate length (367–539 bp) are the most suitable for obtaining stiff and structurally defined nanostructures by coating them with the protein C_8 - B^{Sso7d} .

Thermal stability of DNA nanostars

We next used AFM to test the structural integrity of the naked and protein-coated dsDNA nanostars after incubation at 37 °C and 50 °C. After incubation at 37 °C for 3.5 h, fully formed naked CLS and Stv-Bt dsDNA nanostars were observed (Fig. 7A and B). Nanostars coated with the C_8 - B^{Sso7d} protein seem to preserve their star-like shape up to 9 h (Fig. 7C and D) but have a reduced number of branches (Fig. S17†), probably driven by protein aggregation and/or denaturation. When naked CLS dsDNA nanostars were heated at 50 °C, after 30 min none structures were observed and started to form large micron-size aggregates. On the other hand, branched protein coated CLS dsDNA nanostars were observed up to 3 h (Fig. 7E and F), although with a reduced number of branches (Fig. S18†). Thermal

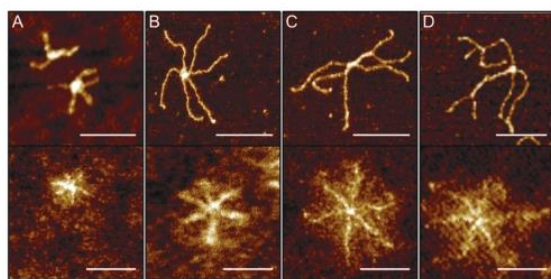


Fig. 6 Protein C_8 - B^{Sso7d} -coated dsDNA nanostars with programmable arm length. Naked (top row) and protein coated (bottom row) CLS dsDNA nanostars of 211 (A), 367 (B), 539 (C) and 722 bp (D). Scale bars are 150 nm.

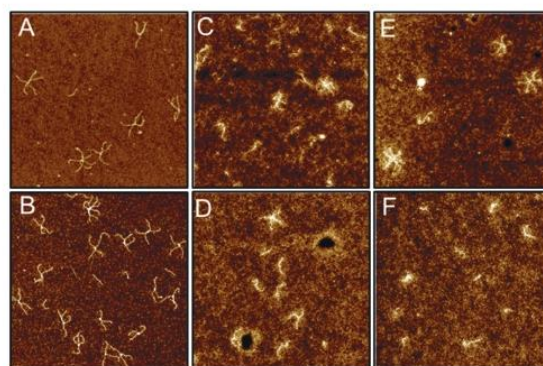


Fig. 7 Thermal stability of dsDNA nanostars. AFM images of (A) naked CLS dsDNA nanostars with arms of 367 bp and (B) naked Stv-Bt dsDNA nanostars with arms of 368 bp incubated at 37 °C for 3.5 h. Protein C_8 - B^{Sso7d} coated CLS dsDNA nanostars incubated at 37 °C for 1 h (C) and 9 h (D) and at 50 °C for 1 h (E) and 3 h (F). Images are $1.5 \times 1.5 \mu\text{m}$.

melting curves of naked dsDNA arms and CLS dsDNA nanostars were 89.5 °C and shifted to 92.5 °C and 91.5 °C for protein coated-dsDNA arms and CLS dsDNA nanostars, respectively (Fig. S19†). All this suggests that protein coating seems to increase the thermal stability of the dsDNA nanostars.

Enzymatic stability of protein–dsDNA nanostars

Finally, we used electrophoresis in agarose gel to examine the stability of naked and C_8 - B^{Sso7d} -coated CLS and Stv-Bt dsDNA nanostars in the presence of the enzyme DNase I (Fig. 8). First, we studied if branched dsDNA possessed improved stability over a non-branched dsDNA. The agarose gel shows that the bands corresponding to naked non-branched dsDNA completely disappeared after 1 min of being incubated with the nuclease (Fig. 8A and Fig. S20a†), whereas the band for naked dsDNA nanostars disappeared after 5 minutes (Fig. 8B and

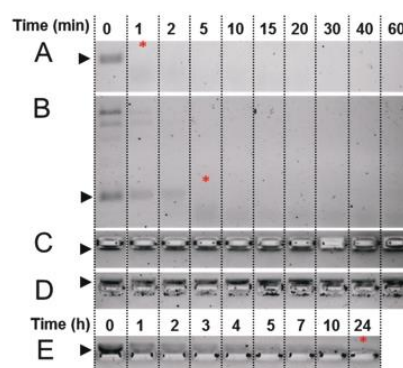


Fig. 8 Enzymatic stability of protein coated-dsDNA nanostars. Naked linear dsDNA (A) and CLS dsDNA nanostars (B), protein C_8 - B^{Sso7d} coated CLS dsDNA (C) and Stv-DNA nanostars (D & E) (Ptn/bp = 0.5). Black arrows and red asterisks indicate the sample band and the time when the band was fully digested, respectively.

Fig. S20b†). Enzymatic stability was further enhanced by coating the dsDNA nanostars with C_8 -B^{Sso7d} protein (Fig. 8C and D). We saw no reduction in intensity of the band corresponding to the coated CLS and Stv-Bt dsDNA nanostars over the course of a 60 min incubation. Similar behaviour was observed for the band of protein-coated non-branched dsDNA fragments, which remained basically intact the entire time (Fig. S20c and d†). We had to incubate the protein coated dsDNA nanostars up to 24 h to detect the full disappearance of their corresponding band (Fig. 8E). This means that coating dsDNA nanostars with protein increased the time necessary to be digested completely approximately more than 600× times in comparison to naked and lineal dsDNA, and 120× times in comparison to naked branched nanostars.

Conclusion

Our study demonstrates that it is possible to obtain hybrid protein–dsDNA nanostars with programmable arm lengths by coating pre-formed star-shaped dsDNA nanostructures with a virus-inspired protein. The high structural flexibility of the star-shaped dsDNA nanostructures was significantly reduced by coating them with a DNA-binding protein such as C_8 -B^{Sso7d} while not affecting their branched shape. The protein-induced stiffening effect was significantly higher for dsDNA nanostars with a high number of arms of length among 367 and 539 bp, corresponding to 125 and 183 nm, respectively. This shows that DNA-binding proteins can function as structural “rigidifiers” and reduce the inherent high flexibility of dsDNA nanostars. The hybrid protein–dsDNA nanostars have outstanding enhanced stability against enzymatic attack compared to non-coated and non-branched dsDNA. Also, dsDNA nanostars are stable for several hours at physiological temperature, and when coated with protein, their stability is increased at even higher temperatures. Our study shows that new types of hybrid protein–dsDNA building blocks can be prepared through the combination of long dsDNA fragments and DNA-binding proteins, where the dsDNA provides programmability and the proteins can tune the mechanical properties, stability and susceptibility to degradation. This study opens new perspectives for creating hybrid protein–dsDNA nanostars with programmable features. The use of hybrid protein–dsDNA nanostars as molecular scaffolds for creating higher order structures and for displaying of multivalent bioactive ligands is now possible.

Experimental

Materials

All DNA oligonucleotides and modified primers were purchased from Integrated DNA Technologies. $MgCl_2$, TEMED, $Na_2S_2O_8$, DNase I amplification grade, streptavidin from *Streptomyces avidinii*, and DTT were acquired from Sigma Aldrich. The 2× Phire Green Hot Start II PCR Master Mix, GeneJET Gel Extraction Kit, Top Vision Agarose, TAE 50×

buffer, TBE 10× buffer, 10 000X Sybr Safe DNA Gel Stain, 100 bp DNA Ladder, GeneRuler 1 Kb DNA Ladder were acquired from Thermo Fisher Scientific. Acrylamide, bis-acrylamide and Tris were purchased from Bio-Rad. PELCO® Mica Discs were purchased from Ted Pella, Inc. Multiplate 96-well PCR plates (unskirted white) and plate sealing film and EvaGreen® Dye were purchased from Bio-Rad and GoldBio, respectively. Proteins C_8 -B^{Sso7d}, C_4 -B^{K12} and C_4 -S₁₀-B^{K12} were biosynthesized by recombinant strains of *Pichia pastoris* and purified by fractional precipitation.^{26–28}

Preparation of dsDNA fragments with discrete overhangs and biotinylated dsDNA

The PCR reactions were done in a T-100 BioRad thermocycler. 50 µL of reaction mixture were prepared containing Phire Green Hot Start II PCR Master Mix (1×), forward primer (1 mM), reverse primer (1 mM) and a template (2675 bp plasmid, 30 ng). PCR was performed on a 2-step protocol consisting of an initial denaturation at 98 °C/30 s, 35 cycles of 98 °C/5 s and 72 °C/10 s followed by a final extension at 72 °C/1 min. The expected band production was verified by electrophoresis in agarose gel. DNA bands were purified from gel following the protocol of the commercial kit.

Preparation of CLS junction

The motif was prepared with basis in a previous report.⁴⁵ The three required DNA oligos “C” (200 nM), “L” (600 nM) and “S” (600 nM) were mixed in TAE- Mg^{2+} 1× buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, 12.5 mM $MgCl_2$). The motif was formed by heating and cooling down the mixture in thermocycler as follows: 95 °C/1 min, 90 °C/10 min, 85 °C/10 min, 80 °C/10 min, 75 °C/10 min, 70 °C/10 min, 65 °C/10 min, 60 °C/10 min, 55 °C/10 min, 50 °C/10 min, 45 °C/10 min, 40 °C/10 min, 35 °C/10 min, 30 °C/10 min, 25 °C/10 min, 20 °C/10 min. Correct formation of the CLS junction was evaluated using a native 6% polyacrylamide gel (19:1 acrylamide/bisacrylamide) at 80 V.

Preparation of CLS dsDNA nanostars

Purified dsDNA with or without discrete overhang (250 ng) was mixed with a solution of CLS junction (adjusted to maintain a molar proportion C : L : S : dsDNA of 1 : 3 : 3 : 6) in TAE- Mg^{2+} 1× buffer and incubated at room temperature for 60 min. Formation of CLS dsDNA nanostars was evaluated by electrophoresis at 4 °C in 1% agarose gel at a constant voltage of 80 V using TAE 1× as running buffer.

Preparation of streptavidin–biotin dsDNA nanostars

An aliquot of a 500 mM stock of streptavidin in water was mixed with 250 ng of biotinylated dsDNA in a molar proportion Stv:Bt-dsDNA of 1:4 in TBE- Mg^{2+} 0.25× (22.5 mM Tris, 22.5 mM boric acid, 0.5 mM EDTA) with 2 mM $Mg(CH_3COO)_2$ and incubated at room temperature for 16 hours. Stv-Bt dsDNA nanostar formation was evaluated by electrophoresis at 4 °C in 1% agarose gel at a constant voltage of 80 V using TBE 0.25× as running buffer.

Coating dsDNA nanostars with proteins

Binding dsDNA nanostars with the proteins was evaluated by Electrophoretic Mobility Shift Assays at 80 V in 1% agarose gels, at 4 °C, using TAE or TBE as running buffer for CLS or Stv-Bt dsDNA nanostars, respectively. Samples were prepared in the following way: a volume of protein stock in ultra-pure water ($C_4-S_{10}-B^{K12}$ stock was supplemented with 1 mM DTT) needed for reaching a specific N/P or protein/pb ratio was mixed with previously prepared dsDNA nanostars to a final concentration of total dsDNA arm-fragment 21 nM in Tris 1 mM buffer. Samples were incubated for 1 hour at room temperature before the run.

Atomic force microscopy

AFM characterization was carried out with a MultiMode 8-HR (Bruker). Samples were prepared on TAE-Mg²⁺ (non-coated nanostars) or TAE 1× buffer (coated nanostars). Protein-coated dsDNA nanostars were at a concentration of 21 nM (based on total dsDNA fragment), while naked dsDNA nanostars were at 4.2 nM (based on total dsDNA fragment). 5 to 10 µL of sample were deposited onto freshly cleaved mica and incubated for 5 min at room temperature to allow absorption. The surface was then rinsed using 500 µL of ultrapure 0.2 µm filtered water and dried slowly using filtered compressed air. Images were collected at 896 or 1024 samples/line using a Digital Instruments NanoScope V and silicon nitride cantilevers with a nominal spring constant of 0.32 Nm⁻¹ and a 0.8–1.0 Hz scan rate. Imaging was performed at room temperature using the ScanAsystTM air mode. Images were processed using NanoScope Analysis V.1.89 and lengths measured on ImageJ.

DNase stability assay

A solution of 25 nM dsDNA fragments alone or in nanostars, naked or coated with protein C_8-B^{Sso7d} (protein/bp = 0.5) was mixed with Enzyme DNase I, at 0.4 U DNase per µg DNA, and reaction buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 2 mM MgCl₂). The sample was incubated at 37 °C, and 5 µL aliquots were taken at different times. Aliquots were immediately mixed with 5 µL of 50 mM EDTA to stop DNase activity and stored on ice until analysed by electrophoresis using 1% agarose gel at a constant voltage of 80 V, using as running buffer TAE or TBE buffer for CLS or Stv-Bt dsDNA samples, respectively.

Thermal stability

5 µL aliquots from a stock solution (containing protein-coated or naked dsDNA nanostars, 21 or 4.2 nM based on total dsDNA fragment, respectively, in TAE-Mg²⁺ or TAE 1× buffer) were incubated at specific temperature and time in a dry bath. They were immediately centrifuged and deposited onto freshly cleaved mica as previously described for AFM visualization.

Thermal melting curves

Analysis was performed using a Bio-Rad iQ5 Real-Time PCR Detection System with a 490/20X (excitation) and 530/30 M (emission) filter. Solutions (80 µL) containing naked lineal

dsDNA and CLS dsDNA nanostars, and protein C_8-B^{Sso7d} -coated lineal dsDNA and CLS dsDNA nanostars (10 ng µL⁻¹ based on dsDNA), with their respective buffers (TAE-Mg²⁺, Tris 1 mM) were previously incubated with 0.25 mM EvaGreen at room temperature for 30 minutes. 25 µL of samples were placed in Multiplate 96-well PCR plates, high profile, unskirted white (BioRad) and covered with Microseal 'B' PCR Plate sealing film (BioRad). Samples were heat from 25 °C to 95 °C at 0.5 °C intervals with a dwell time of 10 seconds.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

A. Hernandez-Garcia acknowledges financial support from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) through PAPIIT project IA201917. E. Sanchez-Rueda acknowledges financial support from CONACYT, Mexico, for postgraduate studies. We thank Laboratorio Nacional de Estructuras Moleculares (IQ-UNAM) for the access to the AFM facilities. We thank Dr Nicholas Stephanopoulos for critical reading of the manuscript.

Notes and references

- 1 L. Yang, C. Yao, F. Li, Y. Dong, Z. Zhang and D. Yang, *Small*, 2018, **14**, 1800185.
- 2 Y. Qu, J. Yang, P. Zhan, S. Liu, K. Zhang, Q. Jiang, C. Li and B. Ding, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, **9**, 20324–20329.
- 3 E. Galati, M. Tebbe, A. Querejeta-Fernández, H. L. Xin, O. Gang, E. B. Zhulina and E. Kumacheva, *ACS Nano*, 2017, **11**, 4995–5002.
- 4 H. Zhang, J. Chao, D. Pan, H. Liu, Y. Qiang, K. Liu, C. Cui, J. Chen, Q. Huang, J. Hu, L. Wang, W. Huang, Y. Shi and C. Fan, *Nat. Commun.*, 2017, **8**, 14738.
- 5 R. Agarwal, V. Singh, P. Journey, L. Shi, S. V. Sreenivasan and K. Roy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2013, **110**, 17247–17252.
- 6 K. S. Chu, W. Hasan, S. Rawal, M. D. Walsh, E. M. Enlow, J. C. Luft, A. S. Bridges, J. L. Kuijter, M. E. Napier, W. C. Zamboni and J. M. DeSimone, *Nanomedicine*, 2013, **9**, 686–693.
- 7 M. Caldorera-Moore, N. Guimard, L. Shi and K. Roy, *Expert Opin. Drug Delivery*, 2010, **7**, 479–495.
- 8 L. Jiang, S. Yang, R. Lund and H. Dong, *Biomater. Sci.*, 2018, **6**, 272–279.
- 9 J. Kim, Y. Rheem, B. Yoo, Y. Chong, K. N. Bozhilov, D. Kim, M. J. Sadowsky, H.-G. Hur and N. V. Myung, *ACTA Biomater.*, 2010, **6**, 2681–2689.
- 10 Y. He, T. Ye, M. Su, C. Zhang, A. E. Ribbe, W. Jiang and C. Mao, *Nature*, 2008, **452**, 198.

- 11 M. Chandra, S. Keller, C. Gloeckner, B. Bornemann and A. Marx, *Chem. - Eur. J.*, 2007, **13**, 3558–3564.
- 12 Y. He, Y. Chen, H. Liu, A. E. Ribbe and C. Mao, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 12202–12203.
- 13 K. Mohri, E. Kusuki, S. Ohtsuki, N. Takahashi, M. Endo, K. Hidaka, H. Sugiyama, Y. Takahashi, Y. Takakura and M. Nishikawa, *Biomacromolecules*, 2015, **16**, 1095–1101.
- 14 S. M. Du, S. W. Zhang and N. C. Seeman, *Biochemistry*, 1992, **31**, 10955–10963.
- 15 Y. L. Wang, J. E. Mueller, B. Kemper and N. C. Seeman, *Biochemistry*, 1991, **30**, 5667–5674.
- 16 K. Huang, D. Yang, Z. Tan, S. Chen, Y. Xiang, Y. Mi, C. Mao and B. Wei, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2019, **58**, 12123–12127.
- 17 J. Lee Tin Wah, C. David, S. Rudiuk, D. Baigl and A. Estevez-Torres, *ACS Nano*, 2016, **10**, 1978–1987.
- 18 X. Wei, J. Nangreave and Y. Liu, *Acc. Chem. Res.*, 2014, **47**, 1861–1870.
- 19 H. Auvinen, H. Zhang, Nonappa, A. Kopilow, E. H. Niemelä, S. Nummelin, A. Correia, H. A. Santos, V. Linko and M. A. Kostainen, *Adv. Healthcare Mater.*, 2017, **6**, 1700692.
- 20 H. Bila, E. E. Kurisinkal and M. M. C. Bastings, *Biomater. Sci.*, 2019, **7**, 532–541.
- 21 N. L. Wenz, S. Piasecka, M. Kalinowski, A. Schneider, C. Richert and C. Wege, *Nanoscale*, 2018, **10**, 6496–6510.
- 22 Y. Yamanaka, R. S. Winardhi, E. Yamauchi, S. Nishiyama, Y. Sowa, J. Yan, I. Kawagishi, A. Ishihama and K. Yamamoto, *J. Biol. Chem.*, 2018, **293**, 9496–9505.
- 23 C. Zhang, A. Hernandez-Garcia, K. Jiang, Z. Gong, D. Guttula, S. Y. Ng, P. P. Malar, J. A. van Kan, L. Dai, P. S. Doyle, R. de Vries and J. R. C. van der Maarel, *Nucleic Acids Res.*, 2013, **41**, e189.
- 24 K. Zhou, J. Dong, Y. Zhou, J. Dong, M. Wang and Q. Wang, *Small*, 2019, 1804044.
- 25 M. Hegner, S. B. Smith and C. Bustamante, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, **96**, 10109–10114.
- 26 A. Hernandez-Garcia, N. A. Estrich, M. W. T. Werten, J. R. C. Van Der Maarel, T. H. LaBean, F. A. de Wolf, M. A. Cohen Stuart and R. de Vries, *ACS Nano*, 2017, **11**, 144–152.
- 27 A. Hernandez-Garcia, D. J. Kraft, A. F. J. Janssen, P. H. H. Bomans, M. A. Cohen Stuart, D. M. E. Thies-Weesie, M. E. Favretto, R. Brock, F. A. de Wolf, M. W. T. Werten, P. van der Schoot, M. C. Stuart and R. de Vries, *Nat. Nanotechnol.*, 2014, **9**, 698.
- 28 A. Hernandez-Garcia, M. W. T. Werten, M. C. Stuart, F. A. de Wolf and R. de Vries, *Small*, 2012, **8**, 3491–3501.
- 29 A. Lacroix, T. G. W. Edwardson, M. A. Hancock, M. D. Dore and H. F. Sleiman, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 7355–7362.
- 30 F. Praetorius and H. Dietz, *Science*, 2017, **355**, eaam5488.
- 31 D. Schiffels, V. A. Szalai and J. A. Liddle, *ACS Nano*, 2017, **11**, 6623–6629.
- 32 I. M. Storm, M. A. C. Stuart, R. de Vries and F. A. M. Leermakers, *Phys. Rev. E*, 2018, **97**, 32501.
- 33 Y. Yang, D. Han, J. Nangreave, Y. Liu and H. Yan, *ACS Nano*, 2012, **6**, 8209–8215.
- 34 B. Högberg, T. Liedl and W. M. Shih, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 9154–9155.
- 35 Y. Tian, Y. He, A. E. Ribbe and C. Mao, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 3404–3405.
- 36 S. Guilbaud, L. Salomé, N. Destainville, M. Manghi and C. Tardin, *Phys. Rev. Lett.*, 2019, **122**, 28102.
- 37 N. R. Kallenbach, R.-I. Ma and N. C. Seeman, *Nature*, 1983, **305**, 829–831.
- 38 C. J. Lim, Y. R. Whang, J. Yan and L. J. Kenney, *Nucleic Acids Res.*, 2011, **40**, 3316–3328.
- 39 B. Kundukad, P. Cong, J. R. C. van der Maarel and P. S. Doyle, *Nucleic Acids Res.*, 2013, **41**, 8280–8288.
- 40 T. H. LaBean, H. Yan, J. Kopatsch, F. Liu, E. Winfree, J. H. Reif and N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 1848–1860.
- 41 X. Li, X. Yang, J. Qi and N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 6131–6140.
- 42 M. R. Jones, N. C. Seeman and C. A. Mirkin, *Science*, 2015, **347**, 1260901.
- 43 Y. He and C. Mao, *Chem. Commun.*, 2006, 968–969.
- 44 G. Zeng, *BioTechniques*, 1998, **25**, 206–208.
- 45 C. Zhang, M. Su, Y. He, X. Zhao, P. Fang, A. E. Ribbe, W. Jiang and C. Mao, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 10665–10669.

EL CINVESTAV Y GRUPO NEOLPHARMA SE COMPLACEN EN OTORGAR EL PRESENTE

Diploma

A: **Eddie Guillermo Sánchez Rueda**

Por obtener el 1er Lugar del Premio a la Innovación
en Bionano: Ciencia y Tecnología 2019

Con el trabajo intitulado:

*"Desarrollo de nanoestrellas de ADN y proteína
con características programables y alta estabilidad"*


Dr. José Mustre de León
Director General
Cinvestav


Lic. Efrén Ocampo López
Presidente Ejecutivo
Grupo Neolpharma