



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Desarrollo de bionanoestructuras con DNA y proteínas CRISPR-Cas

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Jesús Ortiz Saucedo

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Armando Hernández García
[Instituto de Química](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
[Facultad de Medicina](#)

Dr. Ismael Bustos Jaimes
[Facultad de Medicina](#)

Ciudad Universitaria, CD. MX. Octubre, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ORTIZ SAUCEDO JESÚS
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **9 de abril de 2024**, 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 bionanoestructuras con DNA y proteínas CRISPR-Cas**", dirigida por el/la Dr(a). **HERNÁNDEZ GARCÍA ARMANDO**.

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

RODRÍGUEZ ROMERO ADELA	PMDCBQ	PRESIDENTE
CARRERO SÁNCHEZ JULIO CÉSAR	PMDCBQ	SECRETARIO
GUERRERO CÁRDENAS ADÁN OSWALDO	PMDCBQ	VOCAL
MAS OLIVA JAIME	PMDCBQ	VOCAL
SAAB RINCÓN GLORIA	PMDCBQ	VOCAL

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 9 de abril de 2024



Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado: Desarrollo de bionanoestructuras con DNA y proteínas CRISPR-Cas, que presenté para obtener el grado de maestro es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jesús Ortiz Saucedo'.

**Jesús Ortiz Saucedo
No. 523015109**

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas y al Instituto de Química (IQ).

Esta Investigación realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT IN210121.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca: 1229033 y al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP).

Al Dr. Armando Hernández García (Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, UNAM) por su asesoría durante el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del comité tutor, al Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco (Facultad de Medicina) y al Dr. Ismael Bustos Jaimes (Facultad de Medicina) por todo su apoyo, sus críticas y recomendaciones a este proyecto.

A los miembros del jurado: Dra. Adela Rodríguez Romero, Dr. Julio César Carrero Sánchez, Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas, Dr. Jaime Mas Oliva y Dra. Gloria Saab Rincón, por sus comentarios a este proyecto.

A todos los integrantes del laboratorio BioNano y compañeros del IQ, en especial a Gustave, Idalia, Regina, Karen, Xime, Odi, Mario, Andy, Meli y Eddie, por todas las risas y por estar en los buenos y malos momentos.

A Mel, por acompañarme en esta etapa de mi vida.

A Diego, por tu amistad y por compartir esta travesía conmigo.

A mis padres, por apoyarme y motivarme a seguir.

Índice

Índice	5
Resumen	7
Introducción	8
Nanotecnología	8
Bionanotecnología	9
Nanotecnología del DNA	10
Nanotecnología híbrida de DNA-proteínas	14
Antecedentes	17
Proteínas de unión TAL (transcription activator-like effector nucleases) a DNA de doble cadena..	17
Generalidades del sistema CRISPR-Cas12a	18
CRISPR-dCas para la formación de nanoestructuras híbridas	22
Sistema de heterodimerización FKBP – Rapamicina – FRB	23
Nanoestructuras híbridas, programables e inducibles con CRISPR-dCas y dsDNA	25
Justificación	27
Hipótesis	27
Objetivos	27
Objetivo general	27
Objetivos específicos	27
Materiales y métodos	28
Vectores	28
Producción de las proteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB	28
Purificación de las proteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB	29
Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC)	29
Cromatografía de afinidad a heparina	29
Cromatografía de exclusión por tamaño molecular	29
Caracterización de las proteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB	30
Amplificación de dsDNA mediante PCR	30
Diseño de crRNAs	31
Diseño y autoensamble de las bionanoestructuras	32
Caracterización de las bionanoestructuras	34
Heterodimerización de dCas12a-FKBP con dCas12a-FRB inducida por Rapamicina	34
Ensayo de unión de los RNP's al templado de dsDNA	34

Ensamble y visualización de las bionanoestructuras híbridas	34
Resultados.....	35
Purificación e identidad de las proteínas quiméricas	35
Caracterización de las interfases de los bloques de construcción proteicos	36
Interfase de heterodimerización química inducida por ligando	36
Interfase de unión específica a dsDNA	39
Caracterización morfológica de los bloques de construcción individuales	42
Caracterización morfológica de las bionanoestructuras híbridas autoensambladas	45
Discusión	50
Conclusiones	51
Perspectivas	51
Referencias.....	52
Anexos	57
Mapas de los plásmidos de expresión de dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB	57
Predicciones estructurales de las proteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB	60

Resumen

En la naturaleza, el DNA es la molécula universal para el almacenamiento de la información genética. Sin embargo, en la bionanotecnología, ha demostrado ser un bloque de construcción versátil para la formación de diversas nanoarquitecturas. Esta biomolécula es altamente programable, permitiendo diseñar nanoestructuras con gran precisión. Convencionalmente, la nanotecnología de DNA ha utilizado DNA de cadena sencilla (ssDNA) para construir nanoestructuras. A pesar de que el DNA de doble cadena (dsDNA) es muy común en la naturaleza, su uso para la construcción de nanoestructuras es limitado, particularmente debido a la fuerte repulsión entre sus cargas. Una estrategia para superar sus limitaciones es utilizar proteínas de unión a dsDNA, dando lugar a nanoestructuras híbridas. El sistema CRISPR-Cas abre la posibilidad de crear bionanoestructuras utilizando dsDNA, gracias a su capacidad de unión específica a secuencias de dsDNA a través de una endonucleasa guiada por un crRNA. Este proyecto se centra en el ensamblaje de bionanoestructuras híbridas utilizando ribonucleoproteínas catalíticamente inactivas que están fusionadas a dominios de heterodimerización (dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB). Estas proteínas quiméricas forman un complejo ribonucleoproteico con sus crRNAs y son capaces de reconocer secuencias específicas de DNA de doble cadena (dsDNA). Además, pueden polimerizarse a través del sistema de heterodimerización FKBP-FRB, el cual es inducido por rapamicina, permitiendo que los dominios FKBP y FRB se unan específicamente. Ambas proteínas se purificaron con éxito, y la dimerización fue controlada de manera eficiente con la adición de rapamicina. Asimismo, se comprobó que la dimerización por rapamicina no afecta la capacidad de estas ribonucleoproteínas para unirse específicamente a secuencias de dsDNA; esto asegura que pueden emplearse como bloques de construcción con interfaces bien definidas y con un ensamblaje preciso para la formación de nanoestructuras híbridas de dsDNA-proteína. Los resultados obtenidos confirman que el sistema inducido por rapamicina es efectivo para la polimerización de nanoestructuras, ya sea en formas lineales o ramificadas, ofreciendo una plataforma versátil para el diseño y ensamblaje controlado de materiales biomoleculares, con posibles aplicaciones en la fabricación de bionanomateriales ajustables.

Introducción

Nanotecnología

En la época actual, la nanotecnología destaca como uno de los campos emergentes más interesantes en la ciencia y se define como el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y ensamblajes de sistemas que tienen una estructura funcional en al menos una dimensión a escala nanométrica, que va desde 1 nm hasta los 100 nm (10^{-9} m) (Anal, 2018; Gazit & Mitraki, 2013) (**Figura 1**).

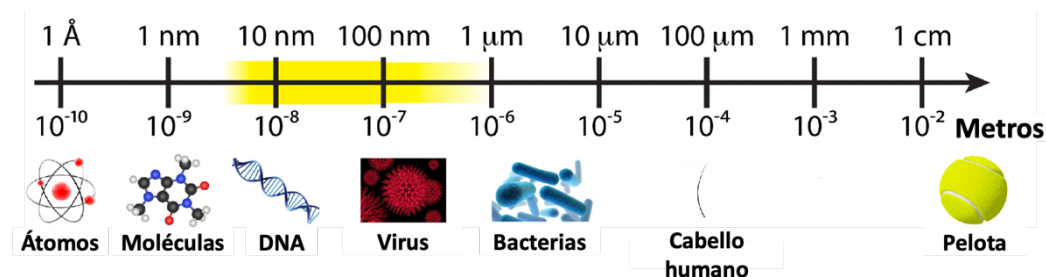


Figura 1: Escala nanométrica. Comparación del tamaño de biomoléculas y microorganismos con objetos macroscópicos, destacando la escala nanométrica en amarillo (Modificado de Bloemen, 2015).

El origen de la nanotecnología se le atribuye al físico Richard Feynman, quien en 1959 durante la reunión anual de la Sociedad Americana de Física en Caltech presentó una conferencia llamada "There's Plenty of Room at the Bottom", donde sugirió la posibilidad de manipular la materia a nivel molecular (Hulla et al., 2015). Las ideas discutidas en esta conferencia son muy relevantes en el presente y podrían ser útiles para desafíos futuros en el campo de la nanotecnología (Gazit & Mitraki, 2013). Norio Taniguchi de la Universidad de Ciencias de Tokio, introdujo por primera vez el término "nanotecnología" en 1974. Su definición sigue siendo relevante en la actualidad, Norio establece que la "nanotecnología" consiste en la manipulación de materiales mediante la separación, consolidación y deformación a escala nanométrica (Gazit & Mitraki, 2013).

El desarrollo de los nanomateriales es comúnmente asociado con moléculas inorgánicas, metales y polímeros derivados del carbono, como el grafeno y el fullereno. Sin embargo, también existen líneas de investigación interesadas en aprovechar la gran diversidad y versatilidad de las estructuras biológicas, que van desde proteínas hasta ácidos nucleicos. En general, las biomoléculas pueden considerarse como cadenas articuladas de átomos que interactúan de manera bien definida (Goodsell, 2004). Estas biomoléculas tienen una organización precisa en la escala nanométrica, resultado de sus interacciones moleculares específicas. Dado que esta organización es esencial para su función, el autoensamblaje

biológico aprovecha bloques de construcción biomoleculares con formas, tamaños y distribuciones espaciales claramente definidos (Mendes et al., 2013).

Bionanotecnología

La bionanotecnología, es una subrama de la nanotecnología, que tiene como enfoque central el diseño, modificación o creación de nueva maquinaria molecular con especificaciones atómicas utilizando elementos biológicos como guía (Nagamune, 2017). Las biomoléculas y los complejos biológicos en la naturaleza son bloques de construcción que se auto-ensamblan espontáneamente en estructuras compactas y, finalmente, en complejos funcionales (Goodsell, 2004). Este enfoque de ensamblaje se denomina "bottom-up", en el cual componentes simples como átomos o moléculas se unen para formar sistemas más complejos de mayor tamaño mediante procesos espontáneos de reconocimiento molecular específico. Por otro lado, existe el enfoque de ensamblaje "top-down", donde la materia a macroescala es fragmentada sucesivamente para generar materiales a nanoescala de tamaño y forma deseada (Gazit & Mitraki, 2013) (**Figura 2**).

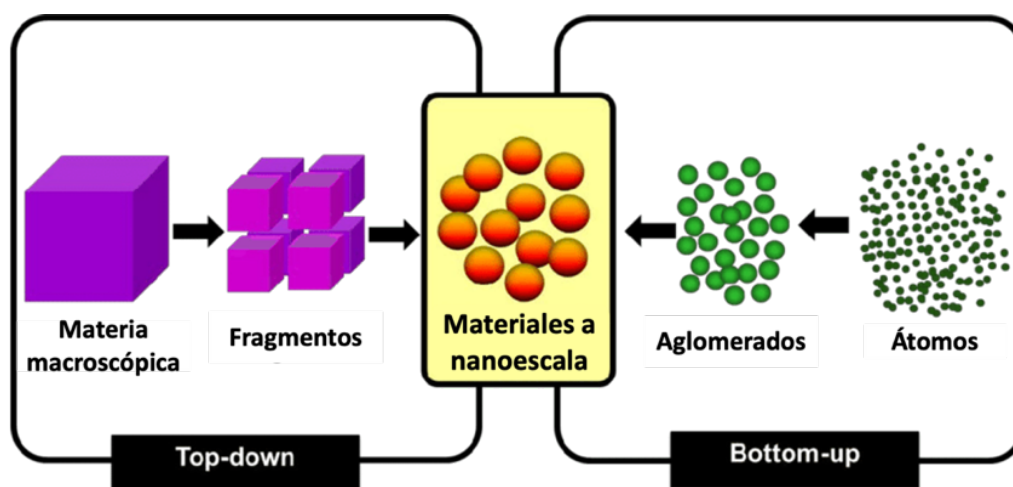


Figura 2: Enfoques para la construcción de nanomateriales. Comparación entre los dos métodos para la fabricación de materiales a nanoescala. "Top-down" (de arriba hacia abajo) y "Bottom-up" (de abajo hacia arriba) respectivamente (Modificado de Rawat, 2015).

Un ejemplo relevante de auto-ensamblaje es el ácido desoxirribonucleico (ADN), una molécula compuesta por una cadena de polinucleótidos que actúan como sus bloques de construcción. Cada nucleótido se compone de un azúcar de 5 carbonos (desoxirribosa), una base nitrogenada unida al azúcar y un grupo fosfato. En el DNA, se encuentran cuatro tipos distintos de nucleótidos (adenina, citosina, guanina y timina), los cuales se distinguen únicamente por la base nitrogenada (Mendes et al., 2013).

Gracias a las diversas caracterizaciones estructurales del DNA, se ha identificado la conformación más común, la tipo B, compuesta por dos cadenas antiparalelas de polinucleótidos. La estructura del DNA-B tiene una morfología de hélice regular que completa una vuelta cada 34 Å (3.4 nm), con un diámetro de aproximadamente 20 Å (2 nm). La distancia que hay entre cada par de nucleótidos adyacentes es de 3.4 Å (0.34 nm), lo que implica que hay aproximadamente 10 pares de bases por vuelta (Krebs et al., 2018) (**Figura 3**).

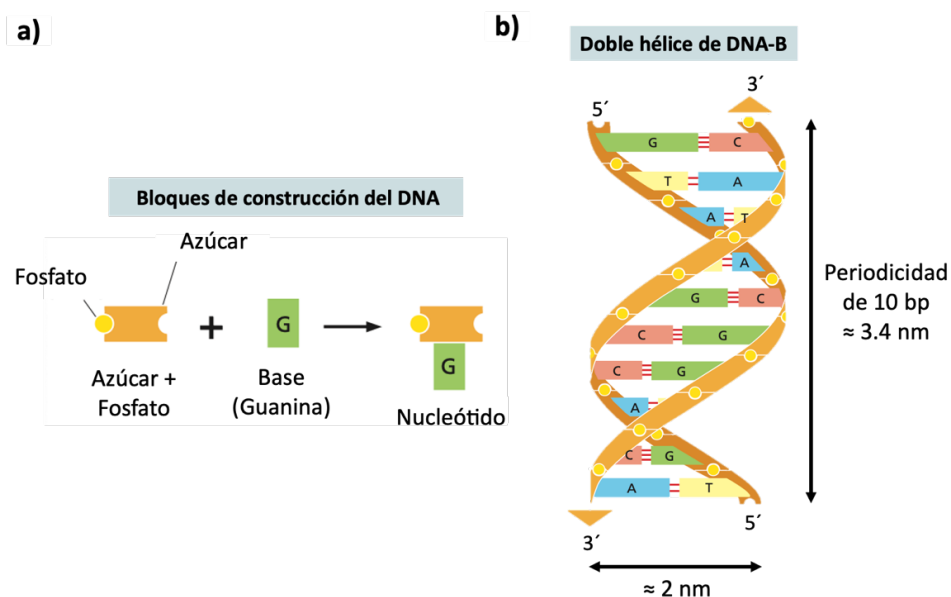


Figura 3: Estructura del ácido desoxirribonucleico y de la conformación tipo B. a) Composición general de los nucleótidos del DNA. b) Dimensiones de la doble hélice de DNA-B, que muestran el diámetro de la hélice y el número de pares de bases por vuelta. (Modificado de Alberts, 2019).

Nanotecnología del DNA

En la naturaleza, el DNA es la molécula universal para el almacenamiento de la información genética; por otro lado, en el mundo sintético el DNA se ha empleado como un bloque de construcción para la creación de arquitecturas a nanoescala (Li et al., 2020). En 1980, Nadrian C. Seeman fue el primero en proponer la utilización de DNA de doble cadena (dsDNA) para crear nanoestructuras, aprovechando la complementariedad de bases tipo Watson-Crick, estos investigadores propusieron que las dos cadenas que componen el DNA se unen entre sí mediante puentes de hidrógeno entre sus bases nitrogenadas, a esta interacción le nombraron apareamiento de bases, donde la adenina forma dos puentes de hidrógeno con la timina y la guanina forma tres puentes con la citosina (Krebs et al., 2018).

Seeman inspirado por el proceso de recombinación genética homóloga conocido como "uniones de Holliday" (Holliday, 1964) comprendió que era posible conectar extremos de DNA

mediante el apareamiento de bases para formar un material cristalino tridimensional (**Figura 4a**). Su objetivo era utilizar el DNA como un andamio cristalino como estructura de soporte para organizar y fijar proteínas de manera regular en el espacio. Siendo particularmente útil para poder cristalizar proteínas que no se cristalizan fácilmente debido a su flexibilidad estructural y a la presencia de múltiples conformaciones. Este andamio de DNA ayudaría a estabilizar las proteínas y facilitar su cristalización para su estudio mediante técnicas como la cristalografía de rayos X (Seeman, 1982) (**Figura 4b**).

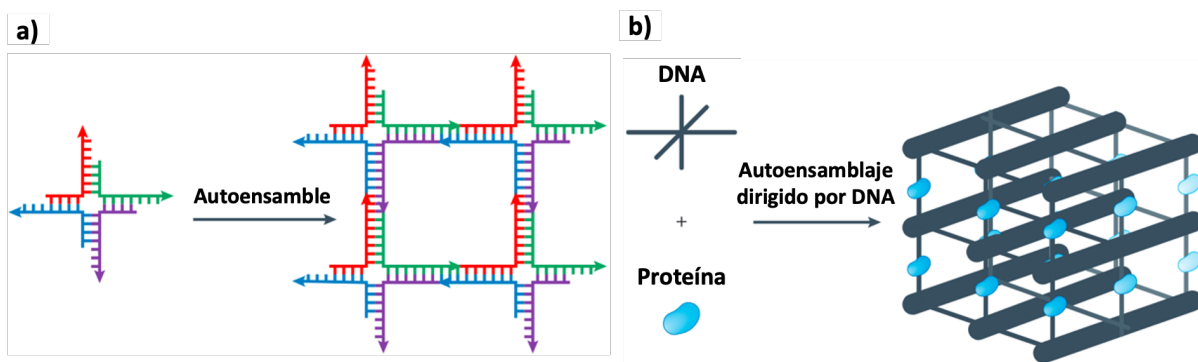


Figura 4: Nanoestructuras autoensambladas con DNA. a) Estructura ramificada de DNA inspirada en las uniones de Holliday. b) Andamio de DNA para el soporte de proteínas (Modificado de Seeman & Sleiman, 2017).

En la siguiente década el trabajo pionero de Seeman logró la construcción de una amplia gama de nanoestructuras con diversas formas geométricas en dos y tres dimensiones, ofreciendo estabilidad, conectividad y topología controladas (Seeman & Sleiman, 2017; Winfree et al., 1998). Entre estas estructuras destacan los azulejos de DNA compuestos por un motivo estructural rígido de DNA (llamado DX) que contiene puntos de ramificación (**Figura 5a**). Los motivos DX están compuestos por dos hélices dobles de DNA entrelazadas mediante el intercambio de una de sus cadenas, lo que proporciona mayor rigidez a estas conformaciones (Fu & Seeman, 1993; Li et al., 1996). Los motivos DX han permitido construir azulejos en forma de "Y", los cuales a su vez se autoensamblan en matrices bidimensionales con cavidades hexagonales (**Figura 5b**). También estos motivos DX, son capaces de ensamblarse para la formación de hélices en tres dimensiones (Lin et al., 2006) (**Figura 5c**).

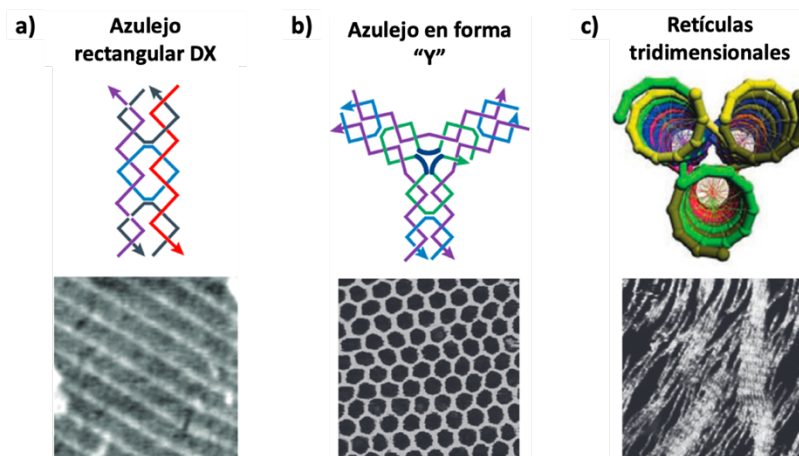


Figura 5: Motivos DX de ADN para la construcción de diversos azulejos de DNA. En la parte superior se muestran las representaciones gráficas y en la parte inferior se muestran micrografías de microscopía de fuerza atómica. **a)** Nanoazulejo de DNA en forma rectangular. **b)** Nanoazulejo de DNA con cavidades hexagonales. **c)** Retícula tridimensional formada por hélices DX (Modificado de Seeman & Sleiman, 2017).

Como se ha demostrado anteriormente el DNA posee ventajas sin precedentes en comparación con otras moléculas utilizadas para diseñar estructuras moleculares. Este polianión es predecible y específico, lo que permite diseñar nanoarquitecturas con gran precisión (Hong et al., 2017). Un avance crucial en la nanotecnología del DNA es el “DNA origami”, presentado por Paul Rothemund en 2006. Esta técnica innovadora es muy versátil para el ensamble de nanoestructuras de DNA en diversas dimensiones y formas. Para lograr esto, Rothemund usó como andamio para moldear el genoma del bacteriófago M13mp18 que es DNA de cadena única (ssDNA) y utilizando cientos de oligonucleótidos cortos que actuaban como “grapas”, plegó este genoma de ssDNA mediante la hibridación en posiciones específicas de las “grapas”. En conjunto, las “grapas” plegaron el ssDNA de manera similar a la técnica de origami (papiroflexia) de papel (**Figura 6a**). Rothemund demostró con éxito que es posible el ensamblaje eficiente de nanoestructuras de DNA con formas y diseños racionales, que incluyen desde figuras geométricas hasta caras sonrientes (Rothemund, 2006) (**Figura 6b**).

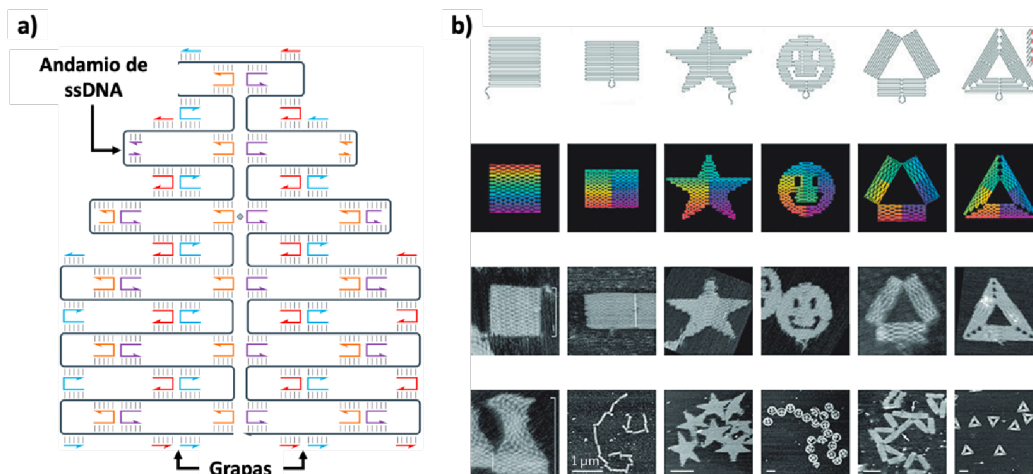


Figura 6: Esquema de la técnica de DNA origami. a) Representación gráfica de la técnica de origami, resaltando el ssDNA utilizado como andamio donde se posicionan los oligonucleótidos que funcionan como grapas. b) En la parte superior se presentan las representaciones computacionales de las diversas estructuras de DNA origami, mientras que en la parte inferior se muestran micrografías de microscopía de fuerza atómica que ilustran distintas formas de DNA origami (Modificado de Seeman & Sleiman, 2017).

A partir de ese avance, se han podido crear nanoestructuras de DNA en tres dimensiones. Recientemente, Benson et al. (2015) desarrollaron un método innovador para crear estructuras tridimensionales de DNA origami en forma de alambrado. Este método consiste en convertir la estructura deseada en una malla tridimensional triangulada y utilizar un algoritmo de trazado para delinear el contorno de esta estructura con el andamio de DNA origami, lo que resulta en el ensamblaje de estructuras tridimensionales complejas (**Figura 7**).

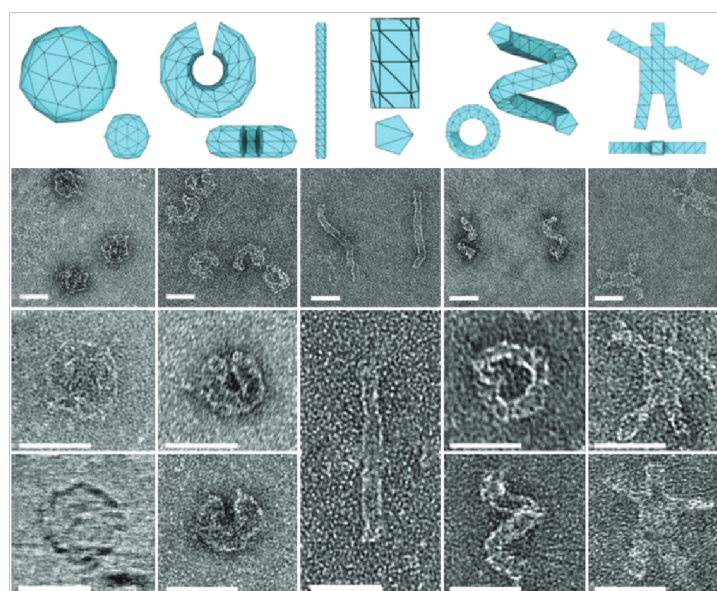


Figura 7: DNA origami tridimensional formado mediante el método de alambrado. En la parte superior se presentan las renderizaciones en 3D de las diversas estructuras de DNA origami. En la parte inferior se muestran las micrografías de microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa de cada una de las estructuras. (Recuperado de Seeman & Sleiman, 2017).

A pesar de que el DNA origami es una técnica muy utilizada, tiene ciertas limitaciones relacionadas al propio DNA. Este polinucleótido es altamente susceptible a la degradación por nucleasas, tal como lo reporta Castro et al. (2011). Además, para mantener la integridad estructural de las nanoestructuras de DNA se requiere concentraciones elevadas de Mg^{2+} en el rango de mM, ya que la fuerza catiónica es esencial para su estabilización. La estabilidad de las nanoestructuras de DNA depende en gran medida de la disponibilidad de iones residuales de Mg^{2+} , los cuales se unen a los fosfatos en el esqueleto del DNA y reducen la repulsión electrostática entre estos grupos (Kielar et al., 2018).

Las limitaciones del DNA pueden reducirse al integrar otros bloques de construcción, como las proteínas, dando lugar a nanoestructuras híbridas. Al combinar el DNA con proteínas se aprovechan las ventajas de ambos biomateriales: la predictibilidad y especificidad del DNA, junto con la amplia diversidad funcional de las proteínas, mitigando así las desventajas que poseen individualmente (Hernandez-Garcia, 2021).

Nanotecnología híbrida de DNA-proteínas

Las proteínas son las biomoléculas que sustentan la compleja maquinaria celular al realizar funciones esenciales, como actividad catalítica, formación de estructuras de soporte y la capacidad de reconocimiento molecular. Las proteínas tienen la capacidad de formar interacciones intermoleculares como intramoleculares, estas interacciones favorecen la formación de estructuras complejas, como oligómeros, polímeros y redes (Kuan et al., 2018). La nanotecnología ha aprovechado estas propiedades para diseñar nanoestructuras basadas en proteínas, convirtiéndolas en bloques de construcción fundamentales para crear nuevos nanomateriales, con más funciones que otros bloques de construcción. A diferencia del DNA, las proteínas cuentan con una gran variedad de motivos estructurales, como las hélices α y las láminas β , derivados de los 20 aminoácidos naturales que las conforman, lo que les otorga una versatilidad única (Hernandez-Garcia, 2021).

En la amplia gama de proteínas presentes en la naturaleza, algunas son capaces de reconocer y unirse específicamente entre sí o a otras biomoléculas como el DNA (Stephanopoulos, 2020). Las interacciones entre proteínas y DNA son clave para regular funciones biológicas. Estas interacciones pueden ser específicas o no específicas: las que se unen de manera específica generalmente tienen una mayor afinidad por sus sitios diana, en contraste con otras que se unen inespecíficamente (Williams & Maher, 2011). Un ejemplo relevante de interacción específica y con alta afinidad es la proteína p53. Esta tiene un dominio

central de unión al DNA de p53 (p53C), que se une al motivo consenso RRRC(A/T)(T/A)GYYY, donde “R” representa purinas (adenina o guanina) y “Y” indica pirimidinas (citosina o timina). Esta interacción tiene una constante de disociación (K_d) de 4.9 ± 0.6 nM cuando p53 forma un tetrámero, lo cual es crucial para la regulación genética en respuesta a daños celulares (Weinberg et al., 2004).

Por otro lado, la histona H1, que es una de las cinco principales proteínas histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4), no reconoce secuencias específicas de DNA. H1 tiene una región rica en lisina que facilita su unión al DNA por interacciones electrostáticas. Con una constante de disociación (K_d) de 2.7 - 2.9 μ M, no se une a secuencias específicas, lo que le permite moverse alrededor del DNA y facilitar el ensamble de otras proteínas que si sean específicas (Luzhetskaya et al., 2020).

Una ventaja relevante de los bloques de construcción proteicos es la capacidad que tienen para ensamblarse a temperaturas constantes. Mantener una temperatura constante durante el ensamblaje, en condiciones isotérmicas, facilita la formación de la bionanoestructura híbrida final (Hernández-García, 2021). El constante desarrollo de la ingeniería de proteínas ha ampliado la diversidad de bloques de construcción proteicos para su aplicación en nanotecnología, además propone nuevos métodos para añadir funciones, como la conjugación química de grupos funcionales o mediante la síntesis recombinante de proteínas de fusión (Gerrard & Domigan, 2020).

La integración de DNA y proteínas en nanoestructuras híbridas suele realizarse mediante una o dos estrategias distintas. La primera consiste en la modificación covalente directa de la proteína con el oligonucleótido (**Figura 6a**). No obstante, este enfoque presenta ciertas limitaciones, como el riesgo de comprometer la función de uno de los dos componentes (principalmente la proteína). Esto se debe a que tanto las proteínas como el DNA son biomoléculas con múltiples sitios potencialmente reactivos lo que puede dar lugar a una conjugación poco eficiente, esta dificultad puede generar problemas para separar los conjugados de las proteínas no modificadas (Stephanopoulos, 2020).

La segunda estrategia implica la utilización de interacciones no covalentes, las cuales ofrecen ventajas sobre el método mencionado anteriormente (**Figura 6b**). Estas interacciones permiten la creación de nanoestructuras híbridas flexibles, modulares y dinámicas con funciones complejas que imitan a los complejos nucleoproteicos naturales. Sin embargo, los complejos ensamblados pueden ser más susceptibles a las condiciones del medio que

aquellos formados mediante conjugación química. También, se requiere un equilibrio delicado en el autoensamblaje de dos macromoléculas diferentes. Se puede aprovechar la capacidad de algunas proteínas para establecer interacciones fuertes y específicas tanto con el DNA de cadena sencilla como, en particular, con el de doble cadena. (Hernandez-Garcia, 2021).

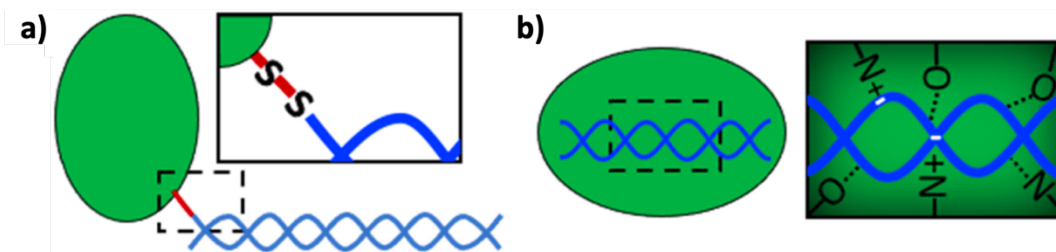


Figura 6: Estrategias para la integración de DNA y proteínas. En color verde se representa la proteína y en color azul el DNA de doble cadena (dsDNA). **a)** Ilustración de la conjugación covalente a través de un puente disulfuro entre la proteína y el dsDNA. **b)** Ilustración de la conjugación no covalente mediante puentes de hidrógeno entre la proteína y el dsDNA (Modificado de Hernandez-Garcia, 2021).

Existen dos enfoques dentro del campo de las nanoestructuras híbridas de DNA-proteínas. El primero se centra en la nanotecnología funcional, donde las proteínas mantienen sus propiedades intrínsecas, pero se posicionan específicamente en una nanoestructura de DNA autoensamblada previamente. En este enfoque, el DNA se utiliza solo como un soporte estructural, de modo que la sinergia entre DNA y proteína es baja (**Figura 7a**). La investigación reportada aquí se encuentra dentro del segundo campo: la nanotecnología estructural de DNA-proteína, en el cual ambos bloques de construcción actúan sinérgicamente durante el proceso de autoensamblaje (**Figura 7a**). En la nanotecnología estructural DNA-proteína, las proteínas desempeñan roles críticos en la estructura, mecánica y el ensamblaje final. Aunque tanto el DNA como las proteínas cumplen estas funciones, la sinergia entre ambos es fundamental para la formación de la bionanoestructura final (Hernandez-Garcia, 2021).

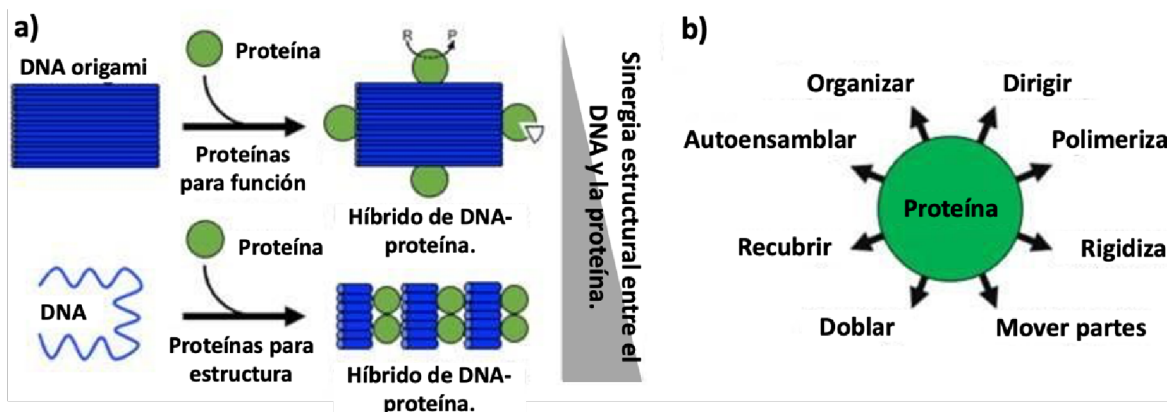


Figura 7. Enfoques de las nanoestructuras híbridas de proteínas-DNA. En color verde se representa la proteína y en color azul el DNA. **a)** Nanotecnología funcional (arriba) y nanotecnología estructural (abajo), además se muestra

un gradiente de sinergia entre el DNA y las proteínas dependiente del enfoque nanotecnológico. **b)** Diversidad de funciones estructurales de las proteínas en la nanotecnología de proteínas-DNA (Modificado de Hernandez-Garcia, 2021).

Antecedentes

Proteínas de unión TAL (transcription activator-like effector nucleases) a DNA de doble cadena

Recientemente se han descrito proteínas de unión específica al dsDNA llamadas nucleasas con actividad similar a un activador de transcripción TAL. Estas proteínas pueden ser modificadas para reconocer específicamente secuencias particulares. Si dos dominios TAL son fusionados en una sola proteína entonces pueden reconocer y unirse a dos regiones distintas dentro de una molécula de dsDNA. Cuando las proteínas TAL se unen a estas regiones, contraen el DNA, lo que conduce a su plegamiento. Este proceso da forma al DNA de manera similar a las técnicas utilizadas en el DNA origami (Praetorius & Dietz, 2017) (**Figura 8**).

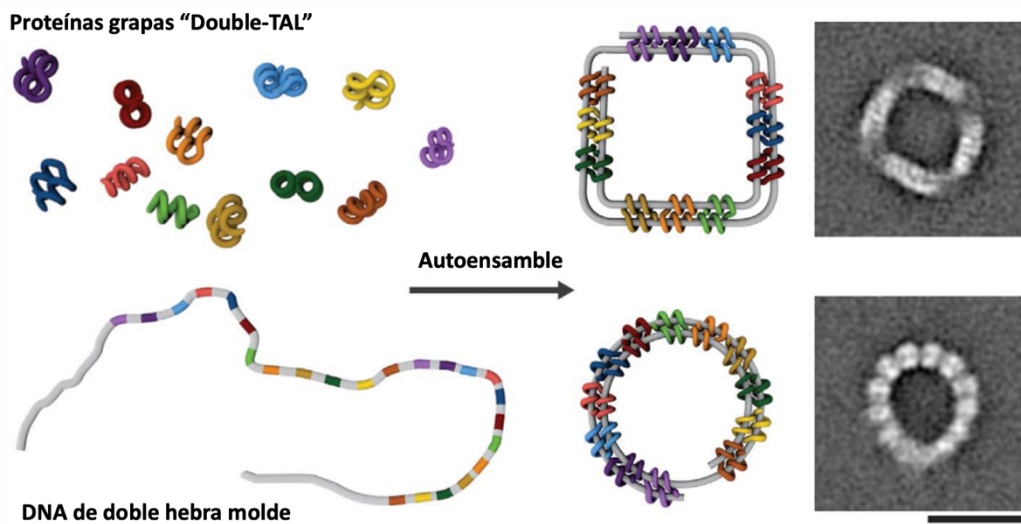


Figura 8. Representación esquemática del sistema de ensamblaje de proteínas TAL con DNA de doble cadena (dsDNA). a) Dimeros TAL (izquierda arriba) y dsDNA de 1,000 pb (izquierda abajo). b) Representación gráfica las nanoestructuras híbridas y micrografías de microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa de ambas estructuras (Modificado de Praetorius & Dietz, 2017).

Este precedente de nanotecnología híbrida de DNA-proteína demuestra que es posible moldear el dsDNA en formas precisas; sin embargo, presenta desventajas derivadas de la producción y diseño de las proteínas TAL. Para formar una estructura particular se requieren varias proteínas, lo cual implica un proceso de producción y purificación para cada proteína

individual. Esto se debe a que un dímero TAL solo reconoce un sitio en el dsDNA, lo que representa un obstáculo en términos de versatilidad, programabilidad, tiempo y costos (Praetorius & Dietz, 2017).

Generalidades del sistema CRISPR-Cas12a

En la actualidad, el uso de proteínas TAL no es el único sistema que existe para moldear el dsDNA en estructuras diseñadas racionalmente, también es posible utilizar otras proteínas con capacidad de unión específica al dsDNA. El sistema CRISPR-Cas12a posee un gran potencial como una alternativa viable para el ensamblaje de nanoestructuras diseñadas racionalmente, dado que identifica secuencias específicas de dsDNA. El descubrimiento de CRISPR-Cas reveló la capacidad de las bacterias y arqueas para adquirir e integrar elementos genéticos en su propio genoma, desarrollando un sistema inmune adaptativo llamado CRISPR (acrónimo en inglés de "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat"), el cual los protege de ataques de elementos genéticos móviles (MEGs), como plásmidos y fagos (Mojica et al., 2005).

El registro genético de ataques previos por ácidos nucleicos exógenos se almacena en los arreglos CRISPR. Estos arreglos están compuestos por secuencias repetitivas cortas y conservadas llamadas motivos adyacentes al protoespaciador (PAM), las cuales están estratégicamente ubicadas entre secuencias únicas llamadas espaciadores. Los espaciadores son insertados por proteínas Cas especializadas en el arreglo CRISPR durante infecciones por ácidos nucleicos invasores (Paul & Montoya, 2020). La inmunidad adaptativa de los procariotas contra los elementos genéticos móviles (MGEs) se logra mediante la formación de endonucleasas guiadas por RNA, que constituyen los complejos ribonucleoproteicos (RNP) efectores. Estos son capaces de detectar una infección por DNA exógeno que previamente fue incorporado en el arreglo CRISPR, escindiéndolo para prevenir una infección secundaria (Gasiunas et al., 2012) **(Figura 9)**.

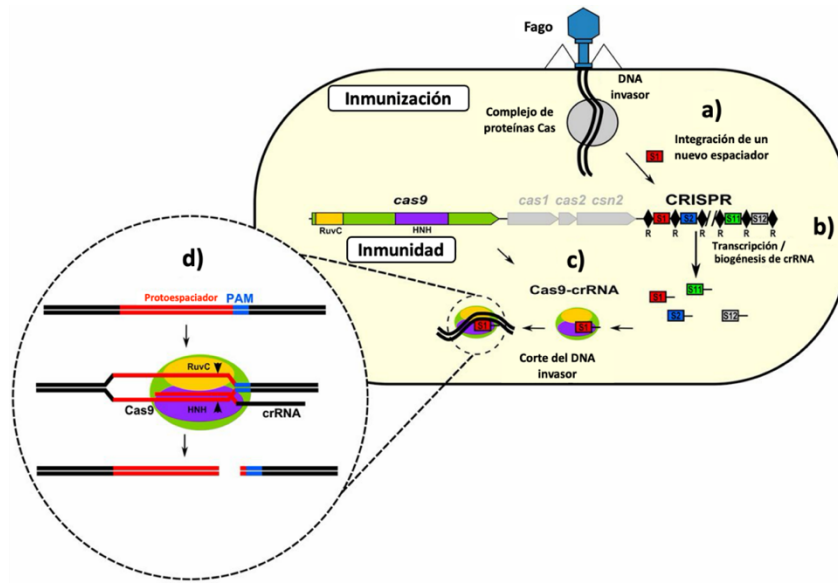


Figura 9. Representación esquemática del sistema CRISPR-Cas9. a) Integración del dsDNA invasor como espaciador en el arreglo CRISPR. b) Transcripción del espaciador y el motivo repetido (crRNA) c) Formación del complejo ribonucleoproteico con Cas 9, que reconoce el DNA homólogo invasor hibridando el crRNA, mediando la interferencia. d) Escisión del dsDNA invasor por el complejo ribonucleoproteico (RNP) (Modificado de Gasiunas et al., 2012).

Las proteínas Cas están clasificadas en diferentes tipos y subtipos basándose en sus características estructurales y funcionales, cada tipo muestra capacidades y aplicaciones diferentes. Hasta la fecha, se han identificado seis tipos principales y 31 subtipos dentro de la clasificación CRISPR-Cas (Nouri et al., 2024). Las endonucleasas Cas más destacadas del sistema CRISPR-Cas son Cas12a y Cas9, ambas presentan similitudes estructurales al adoptar una arquitectura bilobular cuando están en complejo con sus respectivos crRNAs. Las principales diferencias entre Cas12a y Cas9 se encuentran en el crRNA, Cas12a utiliza un crRNA más corto de entre 40-44 nt en comparación con Cas9, que requiere uno de entre 100-120 nt (Paul & Montoya, 2020). También reconocen una secuencia PAM diferente: Cas12a reconoce 4 nucleótidos: 5'-TTTV-3' (donde V puede ser cualquier nucleótido excepto T), mientras que Cas9 reconoce 3 nucleótidos, 5'-NGG-3' (donde N puede ser cualquier nucleótido) (Wang et al., 2016). Por último, la constante de disociación de Cas12a con el dsDNA ($K_D = 54$ fM) es menor que Cas9 con el dsDNA ($K_D = 1.85$ nM) (Raper et al., 2018; Strohkendl et al., 2018). Debido a estas diferencias, se optó por utilizar la endonucleasa Cas12a, ya que tiene una mayor afinidad por el dsDNA y utiliza un crRNA más corto, en comparación con Cas9.

El crRNA desempeña un papel crucial en el sistema CRISPR-Cas12a, se ensambla con la proteína Cas12a y la dirige específicamente hacia el motivo PAM (5' TTTV 3'), que se encuentra en el dsDNA blanco, para luego hibridarse con su hebra objetivo. El crRNA se compone de dos regiones distintas: una región conservada, que adopta una estructura secundaria en forma de "R-loop" y es indispensable para ensamblarse con la Cas12a, conformada por 18-20 ribonucleótidos y una región variable, compuesta por 20-22 ribonucleótidos, que se une al dsDNA (**Figura 10**) (Swarts & Jinek, 2019). Es importante resaltar que esta región variable puede ser reemplazada por cualquier otra secuencia, lo que permite dirigir a la misma proteína Cas12a a diferentes objetivos dentro del dsDNA. Esto convierte al sistema CRISPR-Cas12a en una herramienta con mayor versatilidad y programabilidad, además de reducir el tiempo y los costos en comparación con los dímeros TAL.

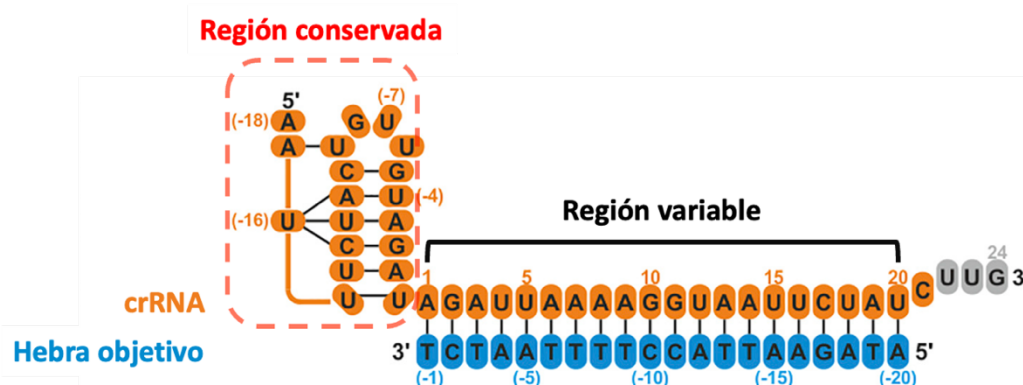


Figura 10. Representación del crRNA de Cas12a (en naranja). a) El cuadro punteado delimita la región conservada del crRNA en forma de "R-loop" (19 ribonucleótidos) b) Se señala con un corchete la región variable, la cual está hibridando con su hebra objetivo (en azul) (20 nucleótidos) (Modificado de Swarts & Jinek, 2019).

En esta investigación, se propone utilizar la versatilidad y precisión del crRNA junto con una versión catalíticamente inactiva de la endonucleasa Cas12 que, guiada por el crRNA se une específicamente al dsDNA sin hidrolizarlo. La proteína AsCpf1, también conocida como AsCas12a, es una endonucleasa de clase II aislada de *Acidaminococcus sp.* BV3L6 y se puede dividir en dos lóbulos. El primer lóbulo de reconocimiento α -helicoidal (REC), compuesto por los dominios REC-1 que consta de 13 α -hélices y el dominio REC-2 consta de diez α -hélices y una lámina β antiparalela (Gao et al., 2016).

El segundo lóbulo de actividad nucleasa (NUC) incluye los dominios WED, que están compuestos por un patrón central WED-III de nueve láminas β antiparalelas flanqueadas por siete α -hélices; WED-II, que consta de dos láminas β paralelas, y WED-I, conformado por dos α -hélices. También incluye el dominio PI, que consta de siete α -hélices y un lazo β insertado entre las regiones WED-II y WED-III. Así mismo, el dominio RuvC contiene los tres patrones

(RuvC-I-III), compuestos por un plegamiento típico de RNasa H, que consiste en una lámina mixta β de cinco hebras flanqueada por tres α -hélices y dos α -hélices adicionales además de tres hebras β . Este dominio contiene 3 residuos conservados cargados negativamente, Asp908, Glu993 y Asp1263, que forman el centro activo de la endonucleasa. También está el dominio NUC, que consta de cinco α -hélices, nueve hebras β y carece de similitud estructural con otras nucleasas conocidas. Ambos lóbulos están conectados por una hélice puente (BH) y un heterodúplex formado por crRNA-dsDNA insertado desde el centro del complejo completo (Gao et al., 2016; Yamano et al., 2016; Zetsche et al., 2015) (**Figura 11a**).

La variante de Cas12a (dCas12a) pierde la actividad catalítica de corte del dsDNA, esta proteína tiene mutaciones en el dominio catalítico RuvC, donde los aminoácidos Asp908, Glu993 y Asp1263 se cambiaron por Ala. Sin embargo, la endonucleasa dCas12a conserva su capacidad de reconocimiento específico al sitio objetivo en el dsDNA (Gao et al., 2016; Yamano et al., 2016) (**Figura 11b**).

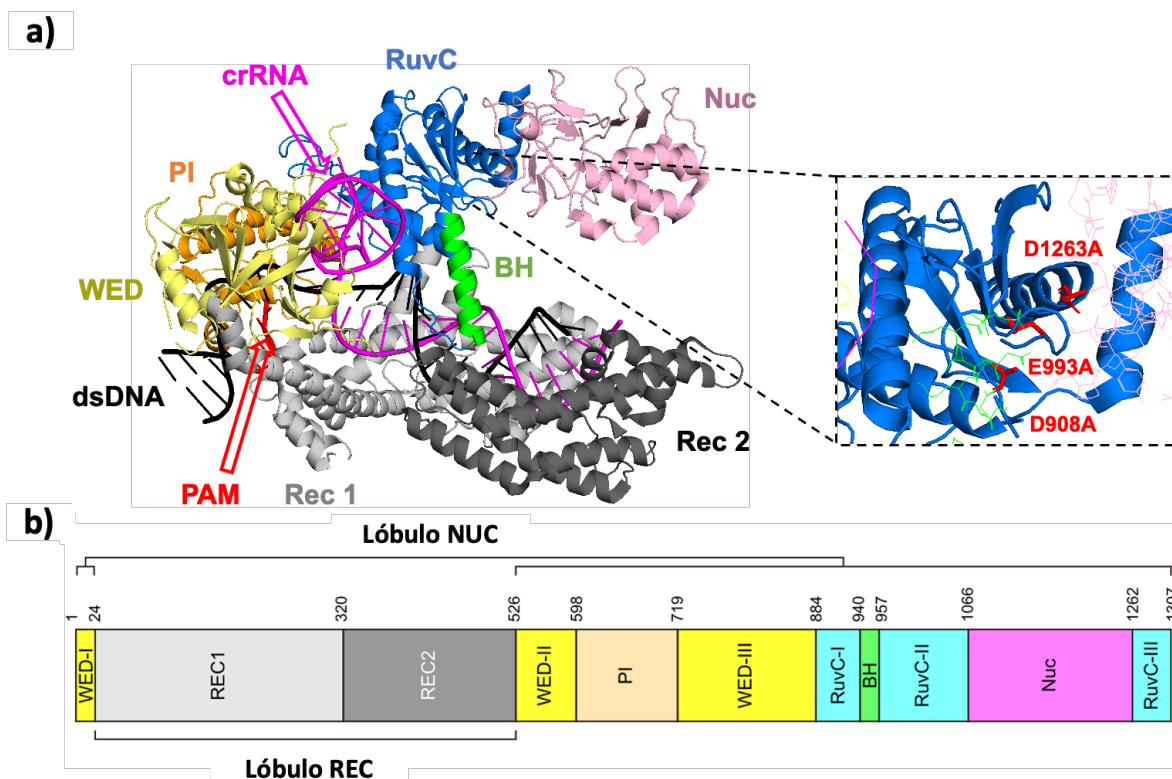


Figura 11. Estructura del sistema CRISPR-Cas12a. a) Estructura cristalográfica de la ribonucleoproteína dCas12a ensamblada con un dsDNA. Además, se muestran las mutaciones del sitio catalítico (derecha) PDB: 5B43. **b)** Organización de los dominios de la proteína dCas12a, se indican los lóbulos REC y NUC (Modificado de Yamano et al., 2016).

CRISPR-dCas para la formación de nanoestructuras híbridas

En los últimos años, los sistemas CRISPR-dCas12a se han empleado como "interruptores génicos" para regular la expresión génica. Esto se logra mediante la unión de las proteínas Cas sin actividad nucleasa (dCas) al dsDNA, las cuales ofrecen una herramienta para el posicionamiento específico en el dsDNA sin cortarlo (Xu & Qi, 2019). Recientemente, el grupo de investigación liderado por Wu y sus colaboradores en 2022, presentaron una estrategia para posicionar de manera específica endonucleasas dCas en un dsDNA y luego plegarlo. Esta estrategia utiliza una proteína quimérica compuesta por dCas9 y dCas12a unidas mediante un péptido responsivo. **(Figura 10a)**. Este sistema imita a las "grapas" de las proteínas TAL, donde el RNP bivalente reconoce específicamente secuencias objetivo dentro del dsDNA, formando nanoestructuras previamente diseñadas. Esta estrategia demostró la posibilidad de plegar *in situ* dsDNA lineales y circulares utilizando el sistema bivalente CRISPR-dCas, el cual reconoce un par de diferentes sitios blanco en el dsDNA, condensándolo en diversos diseños. El péptido que une a las dos endonucleasas es sustrato de otra enzima, la Caspasa 3, cuando esta proteasa está presente, se libera el DNA condensado. El objetivo de la nanoestructura híbrida es proteger la información genética cuando se encuentra condensada, imitando a los híbridos naturales de DNA-proteína presentes en los cromosomas, y provocar una transcripción génica sensible a estímulos eficiente en la forma desplegada **(Figura 10b)**.

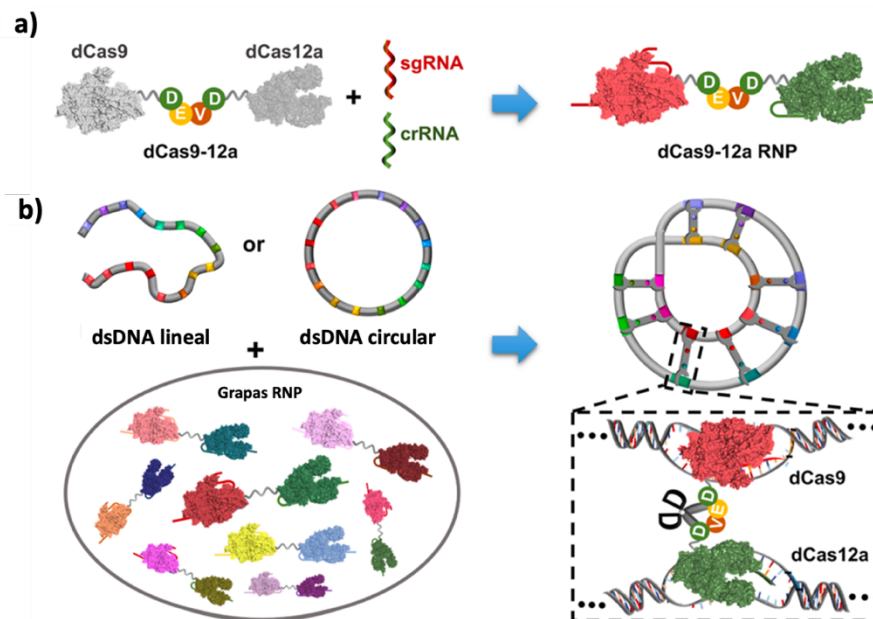


Figura 10. Representación del sistema bivalente CRISPR-dCas. a) Formación del complejo ribonucleoproteico con la endonucleasa bivalente y sus respectivos sgRNA y crRNA. b) Estrategia de condensación del dsDNA con las grapas de RNPs y representación del péptido sensible a Caspasa 3 (Modificado de Wu et al., 2022).

Esta estrategia de plegamiento y desplegamiento de dsDNA presenta limitaciones en la producción de proteínas debido al gran tamaño de ambas en términos de pares de bases (bp). La proteína dCas9 tiene un tamaño de ~12,300 bp, mientras que la dCas12a tiene ~11,700 bp, estos tamaños significativos pueden influir negativamente en la eficiencia de transformación y producción debido al tamaño considerable del plásmido (Chan et al., 2002). Para evitar la limitación de tener un solo plásmido de gran tamaño, se pueden utilizar dos proteínas por separado que tengan dominios de dimerización discretos, los cuales no generen una gran diferencia en el tamaño del plásmido para la producción de la proteína y que permitan inducir la dimerización sin requerir de otra proteína externa al sistema.

Sistema de heterodimerización FKBP – Rapamicina – FRB

En el laboratorio, se realizó previamente un trabajo enfocado al diseño y la producción de proteínas dCas12a fusionadas a los dominios de heterodimerización FKBP y FRB (Calcines-Cruz et al., 2021). Estos dominios, FKBP y FRB, son relativamente pequeños (aproximadamente 11.8 kDa y 11.4 kDa, respectivamente) y tienen una alta afinidad de unión a sus ligandos, lo cual los hace ideales para la ingeniería de proteínas (Fegan et al., 2010). Juntos, forman un sistema de dimerización químicamente inducido, siendo la molécula que los une la rapamicina. La rapamicina, un macrólido antifúngico, se une inicialmente al dominio FKBP con una alta afinidad (K_D de 0.2 nM), y luego el complejo rapamicina-FKBP se asocia con FRB, formando el complejo FRB-rapamicina-FKBP, que presenta una afinidad aún mayor de 100 fM. Es importante destacar que en ausencia de rapamicina, no se producen interacciones proteína-proteína entre FKBP y FRB (Banaszynski et al., 2005) (**Figura 11**).

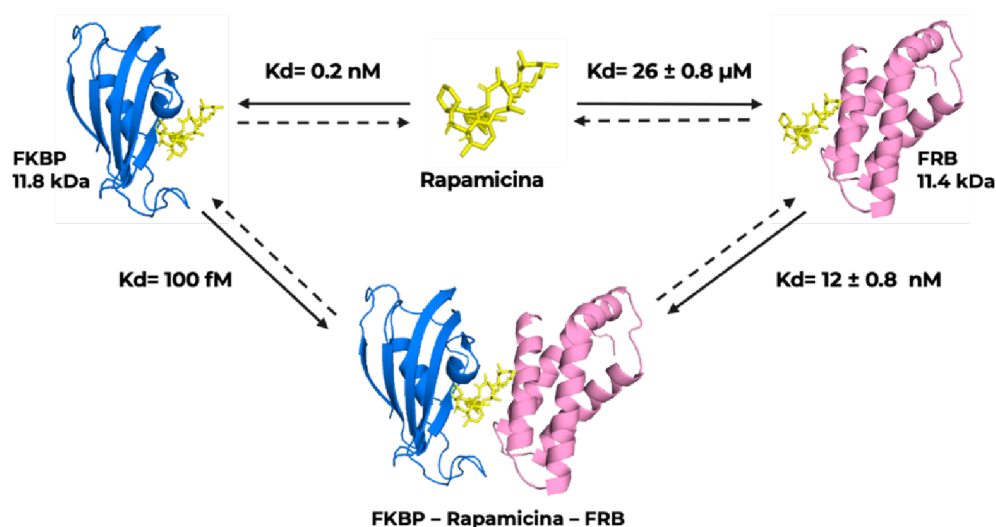


Figura 11. Diagrama del sistema de heterodimerización FKBP-Rapamicina-FRB. Este esquema muestra las K_D de los posibles eventos de unión involucrados en la formación del complejo ternario final PDB: 1FAP (Modificado de Banaszynski et al., 2005).

Este sistema inducible se ha empleado para la heterodimerización química de una proteína de fusión dCas12a-FKBP con un polipéptido sintético C-S10-FRB para el empaquetamiento de secuencias específicas de dsDNA. En este proceso, el sistema CRISPRdCas12a-FKBP se dirige específicamente a diferentes sitios dentro del DNA, y en presencia de rapamicina se ensambla con el polipéptido, actuando como una señal artificial de encapsulación del DNA. Gracias a esta estrategia de dimerización, se pueden potenciar las capacidades individuales de ambas proteínas (Calcines-Cruz et al., 2021) (**Figura 12**).

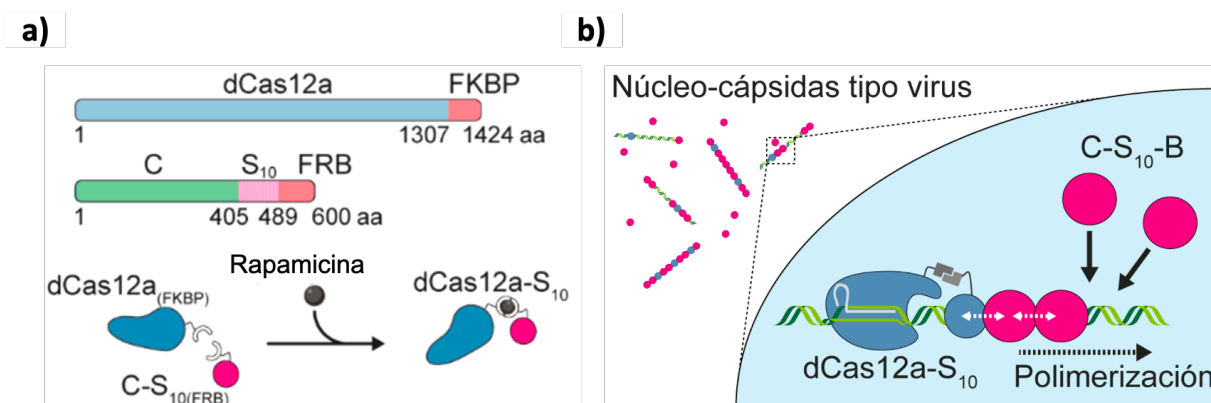


Figura 12. Representación del sistema de heterodimerización de dCas12a-FKBP y C-S₁₀-FRB. a) Esquema del diseño modular de dCas12a-FKBP y C-S₁₀-FRB, junto con la representación de la dimerización en presencia de rapamicina. b) Esquema del complejo dCas12a-S₁₀ posicionado en un dsDNA, reclutando la nucleación sobre este (Modificado de Calcines-Cruz et al., 2021).

Nanoestructuras híbridas, programables e inducibles con CRISPRdCas y dsDNA

Basándonos en la evidencia anterior, se puede demostrar que las proteínas de fusión dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB se unen de manera específica al DNA bicatenario, y que, gracias a estos dominios proteicos, el sistema responde a la presencia de un ligando químico. En este sistema, las ribonucleoproteínas quiméricas amplían sus capacidades gracias a las dos interfaces que poseen: la primera interfaz reconoce y se posiciona en secuencias específicas dentro del dsDNA, mientras que la segunda interfaz permite la polimerización inducida por la rapamicina. **(Figura 13).**

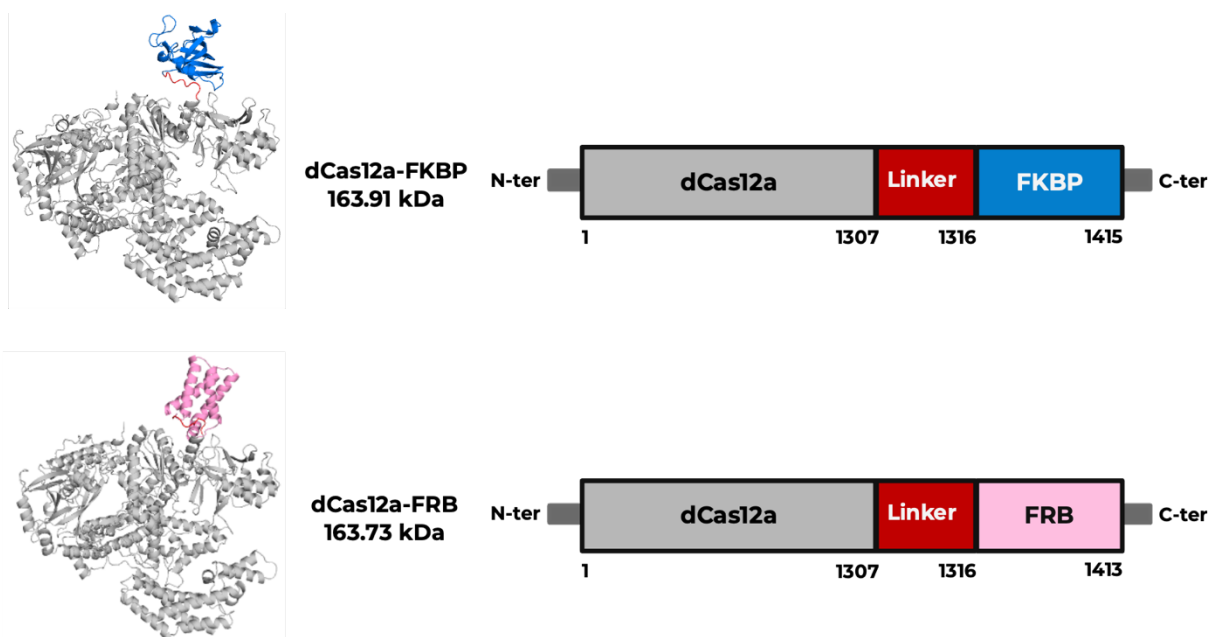


Figura 13. Estructuras tridimensionales de las proteínas fusión. Estructura tridimensional de dCas12a-FKBP, peso molecular y esquema del diseño modular de sus interfaces. En gris, se representa dCas12a; en rojo, el linker; y en azul, FKBP (arriba). Estructura tridimensional de dCas12a-FRB, peso molecular y esquema del diseño modular de sus interfaces. En gris, se representa dCas12a; en rojo, el linker; y en rosa, FRB (abajo). Las estructuras en 3D fueron obtenidas con AlphaFold 3, y las estimaciones de confianza (pLDDT) para ambas proteínas se presentan en **Anexos Figura 3 y 4** (Abramson et al., 2024).

En general, el uso del sistema CRISPR-dCas para la formación de nanoestructuras se ha centrado en la condensación de dsDNA. Sin embargo, este proyecto introduce una nueva estrategia para el ensamblaje de nanoestructuras mediante un enfoque de diseño racional. A diferencia de la condensación, esta involucra el autoensamblaje supramolecular, donde el dsDNA actúa como andamio para posicionar a las ribonucleoproteínas fusión dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB y en presencia de rapamicina estos bloques de construcción se polimerizan para formar diseños racionales **(Figura 14).**

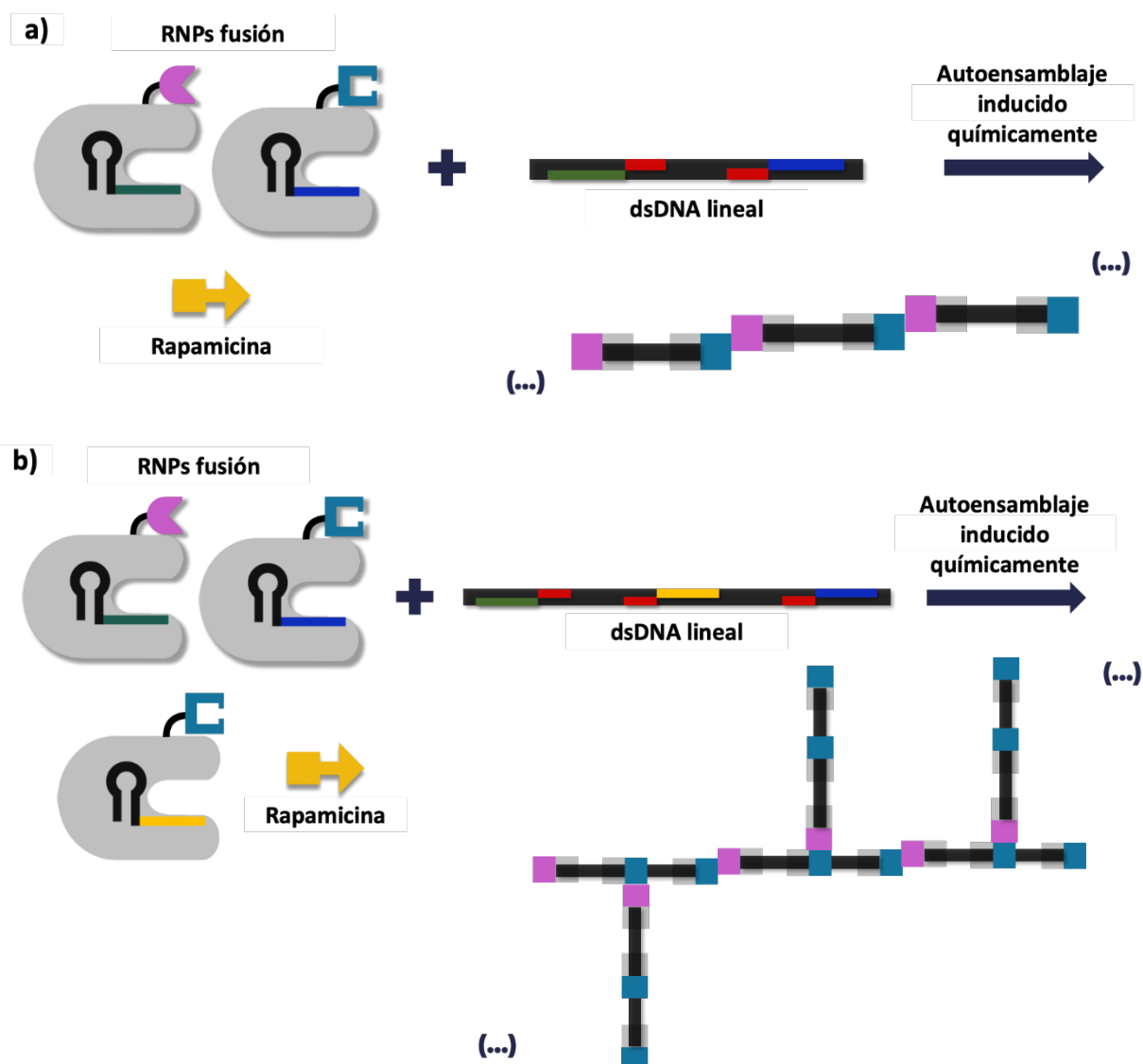


Figura 14. Representaciones del sistema de autoensamblaje y los bloques de construcción empleados en la formación de nanoestructuras híbridas. a) Muestra dos proteínas fusión dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB con sus crRNAs, rapamicina y el dsDNA utilizados para la formación de nanofibras. **b)** Muestra tres proteínas fusión dCas12a-FKB y dCas12a-FRB con sus crRNAs, rapamicina y el dsDNA utilizados para la formación de nanoramificaciones.

Estos bloques de construcción híbridos basados en el sistema CRISPR-dCas promueven la polimerización controlada de plantillos de dsDNA; presentado potenciales aplicaciones en el área de biotecnología. Gracias al sistema de heterodimerización FKBP-FRB permite el ensamblaje específico de proteínas de interés. Este enfoque puede ser aprovechado para crear nuevas plataformas que puedan presentar antígenos o para el desarrollo de biosensores capaces de detectar moléculas en función del ensamble inducido de enzimas en regiones específicas sobre el dsDNA.

Justificación

Las nanoestructuras híbridas de DNA-proteínas son una rama en constante desarrollo dentro de la bionanotecnología, por lo cual es necesario el desarrollo de nuevos bloques de construcción para la creación de nuevas estructuras. Los bloques aquí propuestos facilitan la polimerización controlada del dsDNA y también tienen el potencial de ensamblar específicamente otras proteínas de interés mediante el sistema FKBP-FRB. Esta investigación propone una estrategia innovadora para la creación de nanoestructuras programables e inducibles químicamente, utilizando las proteínas quiméricas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB. Estas proteínas, en complejo con sus crRNAs, tienen la capacidad de ensamblarse específicamente a secuencias en un dsDNA y de dimerizarse en presencia de rapamicina a temperatura fisiológica.

Hipótesis

La presencia de rapamicina promoverá la polimerización de las ribonucleoproteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB ensambladas en el dsDNA, lo que resultará en la formación de nanoestructuras supramoleculares.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar nanoestructuras híbridas inducibles químicamente utilizando las proteínas quiméricas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB, las cuales en complejo con su crRNA se ensamblan específicamente con dsDNA y son sensibles a la presencia de rapamicina.

Objetivos específicos

- Diseñar los dsDNA y crRNA.
- Producir y purificar las proteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB.
- Inducir la dimerización de las proteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB en presencia de rapamicina.
- Evaluar la actividad de unión al dsDNA de las ribonucleoproteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB mediante un ensayo de cambio en la movilidad electroforética.

- Caracterizar morfológicamente los bloques de construcción individuales, siendo las ribonucleoproteínas ensambladas a sus sitios específicos en el dsDNA, utilizando microscopía de fuerza atómica.
- Caracterizar morfológicamente las bionanoestructuras formadas (nanofibras y nanoramificaciones) inducidas por rapamicina, mediante microscopía de fuerza atómica.

Materiales y métodos

Vectores

La clonación de los vectores para las proteínas recombinantes dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB fue realizada por Calcines-Cruz et al., 2021. Los vectores han sido diseñados con mutaciones que inactivan la actividad del dominio nucleasa (D908A, E993A y D1263A en RuvC), y cada uno contiene un dominio de heterodimerización específico (FKBP para dCas12a-FKBP y FRB para dCas12a-FRB). Además, ambos vectores tienen una etiqueta de histidinas 6xHis, un sitio de reconocimiento para la proteasa SUMO, y contienen un gen de resistencia a ampicilina. Los mapas de ambos plásmidos de expresión se encuentran en **Anexos Figura 1 y 2**.

Producción de las proteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB

La producción y purificación de las proteínas quiméricas se basó en el protocolo para Cas12a de Mohanraju et al., 2018. Se utilizó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) con sus respectivos vectores para la expresión de las proteínas recombinantes dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB. Las cepas se crecieron selectivamente en medio Terrific Broth (TB) con 100 µg/mL de ampicilina en matraces Erlenmeyer de 1 L, realizando dos cultivos separados para cada proteína. Ambos cultivos se incubaron a 37 °C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica (OD) entre 0.6 y 0.8 unidades de absorbancia (UA). Posteriormente, se disminuyó la temperatura a 12 °C. La expresión de ambas proteínas se indujo mediante la adición de 1 mM de isopropilo β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 30 minutos después de la transición de temperatura y se mantuvo durante 24 horas. Al finalizar el tiempo de inducción, se obtuvieron los pellets celulares mediante centrifugación a 6000 RCF (*Fuerza centrífuga relativa*), estos pellets fueron almacenados a -80 °C para su posterior purificación.

Purificación de las proteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB

Se resuspendieron los pellets en 35 mL de buffer de lisis (20 mM Tris-HCl pH = 8.0, 250 mM NaCl, 10 mM imidazol, 1 mM PMSF). Posteriormente, se sonicaron los pellets celulares a una potencia de 765 Watts durante 6 minutos, en ciclos ON/OFF de 5 s/25 s a 4 °C. La muestra lisada se centrifugó a 35,000 RCF durante 35 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se filtró con una membrana de tamaño de poro de 0.22 µm, para posteriormente ser purificado mediante una serie de cromatografías seriadas.

Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC)

El sobrenadante filtrado se inyectó en una columna de cromatografía de afinidad por níquel HisTrap™ FF previamente equilibrada con buffer de lisis. La columna se lavó con buffer de lavado (20 mM Tris-HCl pH = 8.0, 250 mM NaCl, 20 mM imidazol) y finalmente, las proteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB se eluyeron con un buffer de elución (20 mM Tris-HCl pH = 8.0, 250 mM NaCl, 250 mM imidazol). Las fracciones resultantes fueron depositadas en una membrana con un tamaño de corte de 50 kDa, añadiendo la proteasa SUMO (small ubiquitinlike modifier) para remover la etiqueta de 6xHis de las proteínas. La muestra se dializó durante toda la noche a 4 °C, con agitación constante, en un buffer de diálisis (20 mM HEPES-KOH pH = 8.0, 250 mM KCl, 10% glicerol, 1 mM DTT, 1 mM EDTA).

Cromatografía de afinidad a heparina

La muestra dializada se centrifugó a 4,500 RCF durante 10 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se diluyó en una proporción 1:1 (v/v) con buffer de dilución (10 mM HEPES-KOH pH = 8.0). Esta muestra diluida se inyectó en una columna de afinidad a heparina HiTrap™ Heparin HP, que retiene proteínas de unión a ácidos nucleicos, como las proteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB. Previamente, la columna fue equilibrada con buffer IEX-A (20 mM HEPES-KOH pH = 8.0, 150 mM KCl) y las proteínas fueron eluidas utilizando buffer IEX-B (20 mM HEPES-KOH pH = 8.0, 2 M KCl).

Cromatografía de exclusión por tamaño molecular

Las fracciones de proteína recuperadas de la columna de heparina se concentraron a 500 µL mediante centrifugación a 5,000 RCF durante 15 minutos a 4 °C, utilizando unidades de filtración Amicon Ultra-15 MWCO (*Molecular Weight Cut-Off*) con un tamaño de corte de 100 kDa. La solución concentrada se inyectó en una columna de exclusión por tamaño

HiLoad™ 16/600 Superdex™ 200 pg, previamente equilibrada con buffer SEC (20 mM HEPESKOH pH 8.0, 500 mM KCl, 10% glicerol, 1 mM DTT). El mismo buffer se utilizó para la elución y se recolectaron las fracciones de la proteína conforme al cromatograma esperado. Posteriormente, se realizó un SDS-PAGE para seleccionar y combinar las fracciones que contenían proteínas puras, las cuales fueron posteriormente concentradas nuevamente utilizando las unidades de filtración mencionadas anteriormente. La concentración de la proteína se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop con la opción de medición "1 Abs = 1 mg/mL". Luego, se aplicó un factor de corrección de 1.009 según lo reportado por Mohanraju et al., 2018 para poder estimar con mayor precisión su concentración, este factor es necesario porque existen diferentes variantes de Cas12 y las proteínas utilizadas en este trabajo son fusiones de AsCas12a, , Finalmente, las muestras de proteína se almacenaron a -80 °C.

Caracterización de las proteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB

La separación de las fracciones proteicas de cada paso cromatográfico, así como la pureza e identidad de las proteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB, se evaluaron mediante SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) y Western Blot, respectivamente. La pureza relativa de las proteínas se determinó mediante análisis densitométrico utilizando el software Fiji según lo reportado por Gallagher, 2014 y la identidad de las proteínas se confirmó utilizando un anticuerpo policlonal anti-Cas12a (GeneTex, 133298).

Amplificación de dsDNA mediante PCR

Se sintetizó un dsDNA lineal de 140 bp con sitios específicos de unión para dos RNPs y un dsDNA de 210 bp con tres sitios específicos de unión para RNPs. Además, se sintetizaron cebadores para la amplificación de ambos dsDNA. Todos los DNAs fueron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies, USA). Las secuencias de ambos DNAs se encuentran en **Anexos Tabla 1.**

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la PCR de punto final

Oligos	Secuencia	% GC	Tm
Fw_P140	5' -CAAGGTCTAGGCACAATCCC-3'	55	55.4 °C
Rv_P140	5' -GCAACGAGTACATGCACTGC-3'	55	56.9 °C

%GC: Representa el porcentaje de guanina y citosina, siendo recomendable un rango de entre 40 al 60%. Tm: Es la temperatura en la cual la mitad de los oligonucleótidos están en estado monocatenario y la otra mitad se encuentran emparejados con su secuencia complementaria.

Las amplificaciones de ambos dsDNAs se realizaron en un termociclador T100 (BioRad). La mezcla de reacción consistió en 12.5 µL de Master Mix 2X (K0171-NEB), 1.25 µL de oligo Fw (10 µM), 1.25 µL de oligo Rv (10 µM), 9 µL de agua y 1 µL del dsDNA (140 bp o 210 bp, según corresponda). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos (1 ciclo), seguida de desnaturalización a 95 °C por 10 segundos, alineamiento a 56 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 9 segundos (para 140 bp) o 13 segundos (para 210 bp) durante 35 ciclos; finalizando con una extensión final a 72 °C por 5 minutos y almacenamiento a 12 °C (1 ciclo). Los amplicones fueron purificados mediante precipitación con etanol y luego teñidos con SYBR Safe para su posterior análisis mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% a 100 V durante 1 hora.

Diseño de crRNAs

Se diseñaron tres crRNAs basados en el metaanálisis realizado por Zhu & Liang en 2019, el cual analizó más de 11,000 secuencias de crRNAs reportadas para la edición genómica con el sistema CRISPR-Cas12a. Este análisis resaltó que tanto la eficiencia y especificidad del crRNA hacia el dsDNA objetivo dependen significativamente de cómo están compuestos y posicionados los nucleótidos en la región variable del crRNA. Considerando estos factores, se llevó a cabo un diseño racional de los 3 crRNAs con el objetivo de favorecer la unión específica y reducir las uniones no específicas. A continuación, se presenta una tabla con la nomenclatura, el porcentaje de GC, y un diagrama que ilustra la hibridación de cada crRNA con su secuencia diana en el dsDNA (**Tabla 2**). Todos los crRNAs fueron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies, USA). Las secuencias de los tres crRNAs se encuentran en **Anexos Tabla 1**.

Tabla 2. Nomenclatura, porcentaje de GC y diagrama de hibridación de crRNAs con sus secuencias objetivo en dsDNA

Nomenclatura de los crRNAs	%GC	Diagrama de ensamble crRNA - dsDNA
"A"	46	 140 bp
		 210 bp
"C"	50	 140 bp
		 210 bp
"E"	46	 140 bp
		 210 bp

Diseño y autoensamble de las bionanoestructuras

Para formar los complejos RNP, se incubaron los crRNAs con dCas12a-FRB o dCas12a-FKBP (según fuera el caso) en una estequiometría de 1:1 a 37 °C durante 20 minutos en buffer de ensamble (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH = 8, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT). Después de la formación de los complejos RNP, estos se unieron con el dsDNA correspondiente (2 RNPs para el dsDNA de 140 bp o 3 RNPs para el dsDNA de 210 bp) incubándolos en una estequiometría de 6:1 a 37 °C durante 1 hora en el mismo buffer de ensamble (**Figura 15**).

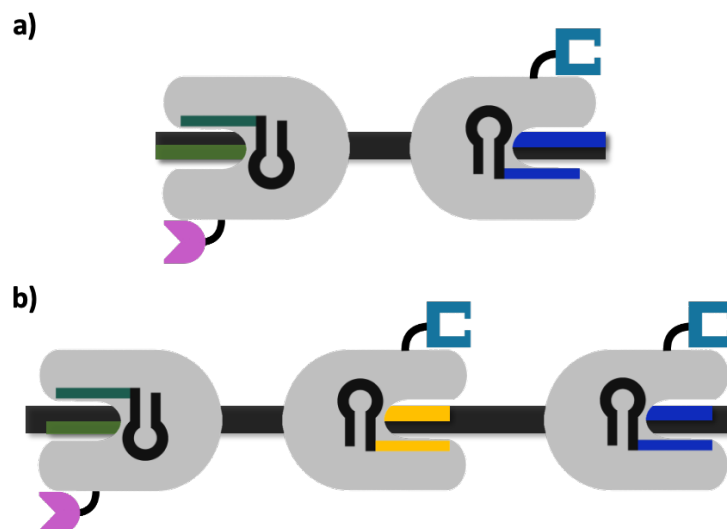


Figura 15. Representación del diseño de los RNPs ensamblados con sus sitios específicos en ambos dsDNAs. a) dsDNA de 140 bp ensamblado con sus dos RNPs en sus sitios específicos. **b)** dsDNA de 210 bp ensamblado con sus tres RNPs en sus sitios específicos.

Tras la incubación, se incorporó rapamicina (R-101 de GOLDBIO) para inducir la polimerización de los bloques de construcción híbridos, formando así nanoestructuras en forma de nanofibras y nanoramificaciones, los cuales posteriormente fueron caracterizados (**Figura 16**).

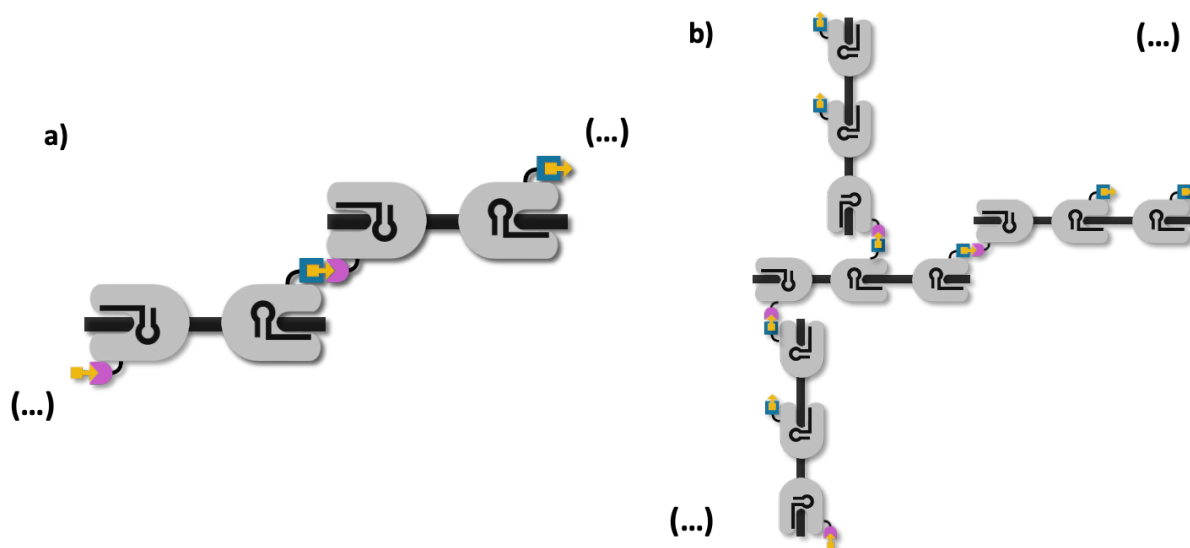


Figura 16. Representación del diseño de los bloques de construcción polimerizados. a) Bloques de construcción polimerizados en forma de nanofibras. **b)** Bloques de construcción polimerizados en forma de nanoramificaciones. Estos bloques permiten la polimerización controlada del dsDNA y tienen el potencial de ensamblar específicamente diversas proteínas de interés.

Caracterización de las bionanoestructuras

Heterodimerización de dCas12a-FKBP con dCas12a-FRB inducida por Rapamicina

La dimerización de dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB en presencia de rapamicina se evaluó por medio de esparcimiento dinámico de luz utilizando el equipo Nano Zetasizer Malvern, modelo ZEN 3600. Se empleó una celda de cuarzo de 20 μ L (ZEN2112) para medir las muestras a temperatura ambiente. Ambas proteínas se mezclaron con rapamicina a concentraciones de 2 μ M y 4 μ M respectivamente, en buffer de ensayo (20 mM HEPES-KOH pH = 7.5, 100 mM KCl, 1 mM DTT).

Ensayo de unión de los RNP's al templado de dsDNA

Se llevó a cabo un ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) para evaluar la unión específica de los complejos RNP al dsDNA blanco. Previamente, se ensamblaron los RNPs con crRNA específicos y no específicos en una relación 1:1 a una concentración de 400 nM, en buffer de ensamble a 37 °C durante 20 min. Posteriormente, estos complejos se incubaron con dsDNA (140 bp) en una relación 4:1 a una concentración de 400 nM:100 nM, tanto en presencia como en ausencia de rapamicina (800 nM), en buffer de ensamble a 37 °C durante 1 hora. Las muestras se tiñeron con SYBR Gold y se analizaron en un gel de poliacrilamida al 8% a 70 V durante 40 minutos.

Ensamble y visualización de las bionanoestructuras híbridas

Se realizó la formación de los RNPs incubando los crRNAs con dCas12a-FRB o dCas12a-FKBP (según el caso) en una relación 1:1 a una concentración de 500 nM en buffer de ensamble a 37 °C durante 20 min. Después, se ensamblaron los RNPs con los dsDNA en una relación 6:1 a una concentración final de 50 nM RNP y 8 nM dsDNA en buffer de ensamble a 37 °C durante 1 hora. Inmediatamente después, se añadió rapamicina en una relación 1000:1 respecto al RNP y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se depositaron 5 μ L de la muestra en una mica fresca de moscovita durante 15 minutos; la mica se lavó con 1000 μ L de agua Milli-Q y se secó bajo una corriente suave de aire. Las micrografías se obtuvieron por un microscopio de fuerza atómica (MultiMode 8 NanoScope V, Bruker) en modo *ScanAsyst* en aire con una resolución de 1024 muestras/línea. Las micrografías se procesaron con el software NanoScope Analysis v1.89 y Fiji. El análisis de las distribuciones de las longitudes de las nanoestructuras obtenidas fue realizado con el software GraphPad Prism v9.

Resultados

Purificación e identidad de las proteínas quiméricas

Las proteínas quiméricas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB se aislaron de la fracción soluble del lisado celular de *E. coli* BL21 (DE3) y se purificaron para utilizarlas como bloques de construcción proteicos. Para obtenerlas con alta pureza, se realizaron tres pasos cromatográficos consecutivos: afinidad por níquel, afinidad por heparina y exclusión por tamaño molecular. La cromatografía de afinidad a níquel se realizó gracias a que ambas proteínas tenían una etiqueta de 6xHis flanqueada por una secuencia de reconocimiento SUMO en el extremo N-terminal, dicha etiqueta fue removida utilizando la proteasa SUMO, y los fragmentos resultantes fueron eliminados durante el proceso de diálisis. Se realizó una cromatografía de afinidad a heparina, en la que ambas proteínas cargadas positivamente son capaces de interactuar con las cargas negativas de la heparina. Por último, las proteínas se purificaron según su tamaño mediante una cromatografía de exclusión molecular (**Figura 17**).

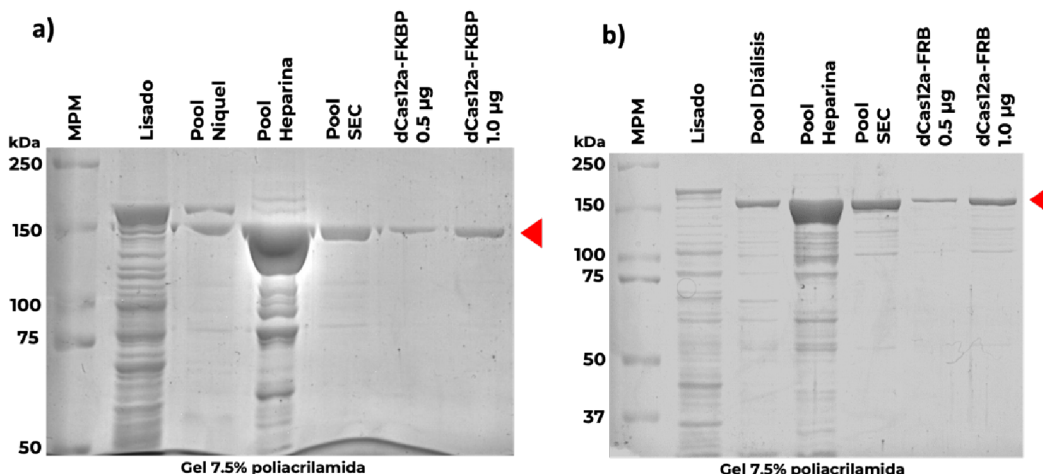


Figura 17. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 7.5 % del proceso de purificación de dCas12-FKBP (a) y dCas12a-FRB (b). Se muestran, de izquierda a derecha: lisado de la fracción soluble, purificación por afinidad a níquel (a), remoción de etiqueta 6xHis (b), purificación por afinidad a heparina, purificación por exclusión molecular y finalmente ambas proteínas purificadas (resaltadas en rojo respectivamente).

Ambas proteínas fueron purificadas exitosamente alcanzando una pureza estimada superior al 87% según el análisis densitométrico de los geles de SDS-PAGE realizado con el software Fiji, siguiendo la metodología descrita por Gallagher, 2014. Los rendimientos obtenidos fueron de 15.04 mg/L para dCas12a-FKBP y 9.44 mg/L para dCas12a-FRB. La identidad de las proteínas purificadas se verificó mediante Western blot utilizando anticuerpos policlonales anti-Cas12a (**Figura 18**).

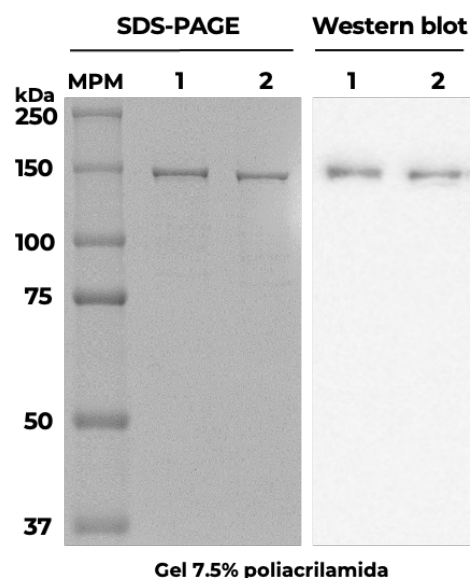


Figura 18. Gel de poliacrilamida al 7.5 %: a la izquierda: SDS-PAGE, y a la derecha: Western blot de las proteínas purificadas dCas12a-FKBP (1) y dCas12a-FRB (2).

Estos resultados aseguran que ambos bloques de construcción proteicos están preparados para su posterior ensamblaje con otros bloques de construcción del sistema.

Caracterización de las interfases de los bloques de construcción proteicos

Interfase de heterodimerización química inducida por ligando

Se utilizó la técnica de esparcimiento dinámico de luz para comprobar que la heterodimerización química de los dominios FKBP-FRB es inducida por rapamicina. Se midió el incremento en el diámetro hidrodinámico al formarse el heterodímero entre las proteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB en presencia de rapamicina. Las mediciones muestran que en ausencia de rapamicina, no hay un cambio en el diámetro hidrodinámico, lo que indica la ausencia de interacciones inespecíficas de proteína-proteína. Sin embargo, en presencia de rapamicina las proteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB mostraron un incremento en su diámetro hidrodinámico de aproximadamente 12 nm a 24 nm (**Figura 19**).

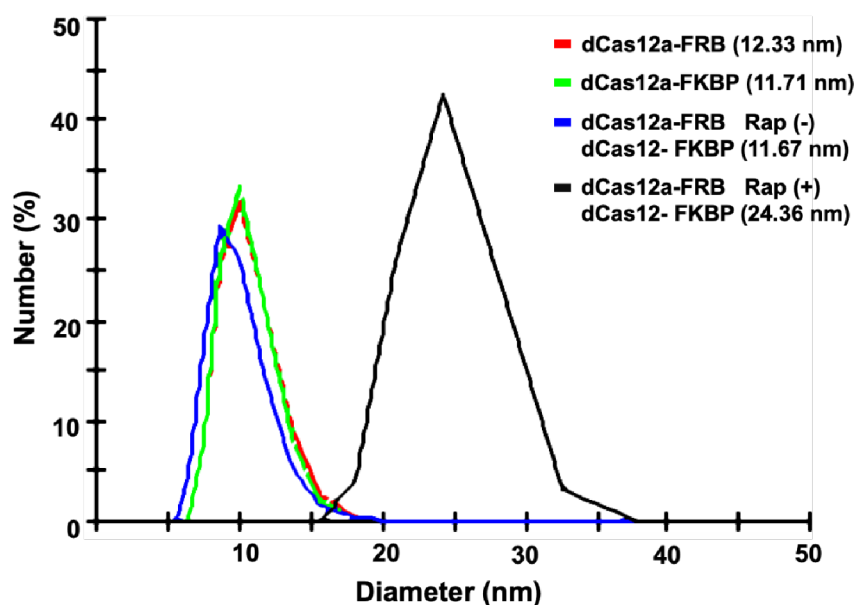


Figura 19: Distribuciones del diámetro hidrodinámico de las proteínas fusión. dCas12a-FRB (12.33 nm) se muestra en rojo, dCas12a-FKBP (11.71 nm) en verde, dCas12a-FRB y dCas12a-FKBP (11.67 nm) en azul y dCas12a-FRB + dCas12a-FRB + Rapamicina (24.36 nm) en negro. Las concentraciones utilizadas fueron de dCas12-FRB/FKBP [2 μ M] y para rapamicina [4 μ M].

Las fluctuaciones observadas en las distribuciones del diámetro hidrodinámico podrían deberse a que, para este experimento, ambas proteínas fusión se dimerizaron en forma Apo (sin crRNA). En este estado, la Cas12a alterna entre las conformaciones elongada y semicompacta. En la elongada, los lóbulos de reconocimiento (REC1 y REC2) y el dominio nucleasa (NUC) se encuentran más extendidos. Cuando se une la endonucleasa al crRNA, la proteína adopta una estructura más compacta, lo que facilita su actividad catalítica para el corte del dsDNA. Esta flexibilidad estructural en el estado Apo podría estar impactando en las fluctuaciones en los diámetros hidrodinámicos observadas en el gráfico de DLS (Jianwei et al., 2023).

También se verificó la heterodimerización química de ambas proteínas quiméricas en presencia y ausencia de su ligando mediante microscopía de fuerza atómica (AFM). Tras incubar las proteínas durante 20 minutos, con y sin rapamicina, se tomaron las micrográficas correspondientes (**Figura 20 a y b**). Se midieron 400 diámetros de las proteínas de cada muestra y se observó un aumento en el tamaño de las proteínas en presencia de rapamicina, con un rango de 34 a 38 nm, lo que sugiere la formación de heterodímeros proteicos (**Figura 20 a**). En comparación, las proteínas sin rapamicina presentaron un rango de 18 a 21 nm, correspondiente a proteínas no dimerizadas (**Figura 20 b**). También se observaron partículas

de mayor diámetro, superiores a 42 nm, que podrían ser agregados de proteínas debido al secado de las muestras. Esto es común en la microscopía de fuerza atómica para proteínas, ya que el proceso de preparación y secado de las muestras puede inducir la formación de agregados. Además, se realizó un histograma comparativo del tamaño de ambas proteínas, donde en rojo se representa la heterodimerización y en negro las proteínas sin dimerizar (Figura 20 c).

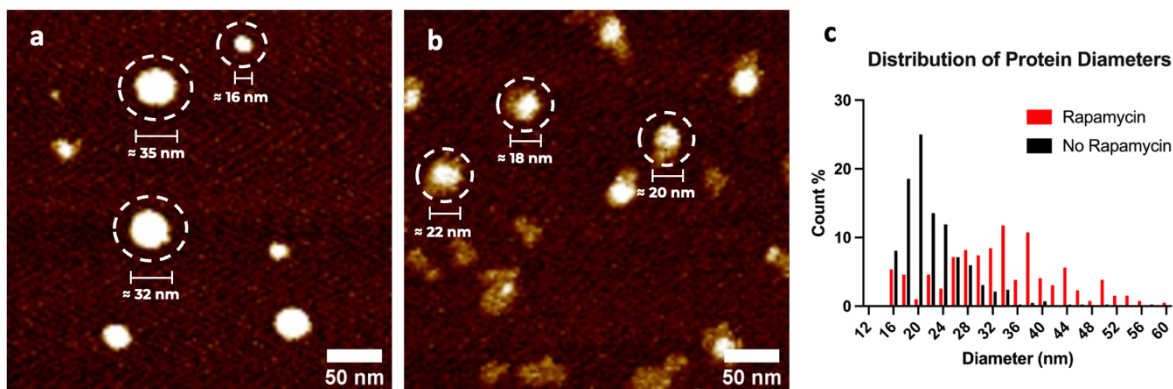


Figura 20: Micrografías de fuerza atómica y análisis de tamaño de la heterodimerización entre las proteínas quiméricas. **a)** Micrografía de dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB dimerizadas en presencia de rapamicina, resaltando dímeros y un monómero, con sus respectivos diámetros. **b)** Micrografía de dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB en ausencia de rapamicina, resaltando monómeros, con sus respectivos diámetros. **c)** Histograma comparativo del tamaño de ambas proteínas, mostrando las diferencias de los diámetros entre las proteínas dimerizadas (en rojo) y no dimerizadas (en negro).

A partir de las micrografías obtenidas de las proteínas quiméricas en presencia de rapamicina, se realizó un conteo de las proteínas individuales y dimerizadas. Se contabilizaron 183 proteínas en forma de monómeros y 202 proteínas como dímeros, lo que corresponde a un 47.5% en monómeros y un 52.5% en dímeros (Figura 21).

Protein Dimerization with Rapamycin

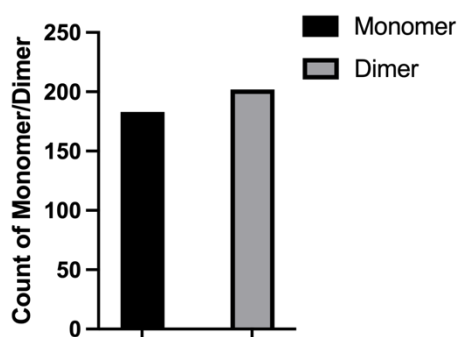


Figura 21: Distribución de proteínas en monómero y dímoro en presencia de rapamicina, conteo de nanopartículas obtenido mediante micrografías de fuerza atómica. El eje X muestra los monómeros y dímeros, mientras que el eje Y es el número total de proteínas en cada estado.

Ambos resultados confirman que la rapamicina induce la heterodimerización de las proteínas quiméricas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB. La dispersión dinámica de luz mostró un aumento del doble en el diámetro hidrodinámico con respecto a las proteínas que no tenían el ligando, incrementándose de 12 nm a 24 nm. La microscopía de fuerza atómica también indicó un incremento en el tamaño de las proteínas por la presencia de rapamicina, pasando de 18 nm a 38 nm. Además, el conteo total de las proteínas indicó que el 52.5% alcanzó a dimerizarse, mientras que el 47.5% permaneció en forma de monómeros en presencia de rapamicina.

Interfase de unión específica a dsDNA

Los amplicones de 140 bp y 210 bp de dsDNA obtenidos por PCR de punto final fueron purificados y verificados por electroforesis en gel de agarosa. Estos fragmentos se utilizaron como andamios para posicionar específicamente los complejos RNPs, para el ensamblaje de dos RNPs en el dsDNA se utilizó el templado de 140 bp y para tres RNPs el dsDNA de 210 bp. Los cebadores diseñados generaron amplificaciones específicas, tal como se observa en la **Figura 22**, donde las bandas obtenidas corresponden al tamaño de los dsDNA diseñados previamente.

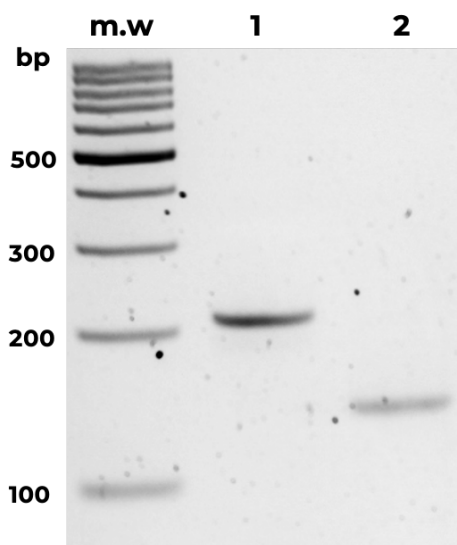


Figura 22. Amplificación de los templados de dsDNA. Gel de agarosa al 5%. En el carril 1 se muestra el templado de 210 bp y en el carril 2 se muestra el templado de 140 bp, con ≈ 75 ng de cada templado. Ambos templados fueron purificados mediante precipitación con etanol.

Una vez verificados tanto el tamaño como la pureza de ambos templados, se procedió a utilizarlos como andamios para ensamblar de manera específica los complejos RNPs correspondientes.

Se realizó un ensayo de movilidad electroforética en gel de poliacrilamida al 8% (PAGE) para confirmar que la unión de las proteínas quiméricas al dsDNA en complejo con sus crRNA no se ve afectada por la rapamicina, manteniendo su capacidad de reconocer específicamente las secuencias objetivo tanto en presencia como en ausencia de rapamicina. Se formaron complejos RNPs de dCas12a-FRB y dCas12a-FKBP con crRNAs específicos e inespecíficos, según el caso. Estos RNPs se incubaron con un dsDNA de 140 pb que contenía dos secuencias diana para los crRNAs, en una proporción estequiométrica de 400 nM:100nM (RNPs:dsDNA) (**Figura 23**). La estequiometría óptima de RNP:dsDNA se estableció mediante ensayos de movilidad electroforética, se probaron diversas relaciones molares de 1:1, 2:1, 4:1, 6:1 y 10:1 (RNPs:dsDNA). Se determinó que la estequiometría 4:1 era la más eficiente para retener completamente el templado de dsDNA.

En el primer carril, se encuentra solo dsDNA. En el segundo y tercer carril, están los RNPs específicos para la secuencia del dsDNA, en presencia y ausencia de rapamicina, respectivamente. En el cuarto y quinto carril, están los RNPs inespecíficos para la secuencia del dsDNA, también en presencia y ausencia de rapamicina, respectivamente. En el sexto y séptimo carril, las proteínas dCas12a-FRB y dCas12a-FKBP en su estado Apo, de igual manera en presencia y ausencia de rapamicina, respectivamente.

Los RNPs formados con sus crRNAs específicos (+) tuvieron una unión efectiva al dsDNA, mientras que los RNPs con crRNAs inespecíficos (-) no lograron retener completamente el dsDNA, mostrando actividad inespecífica que puede ser atribuida a la naturaleza catiónica de las proteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB. Además, la presencia de rapamicina no afectó la unión específica de los RNPs al dsDNA, indicando que la heterodimerización inducida por rapamicina no interfiere con la capacidad de reconocimiento de secuencias específicas de las proteínas quiméricas.

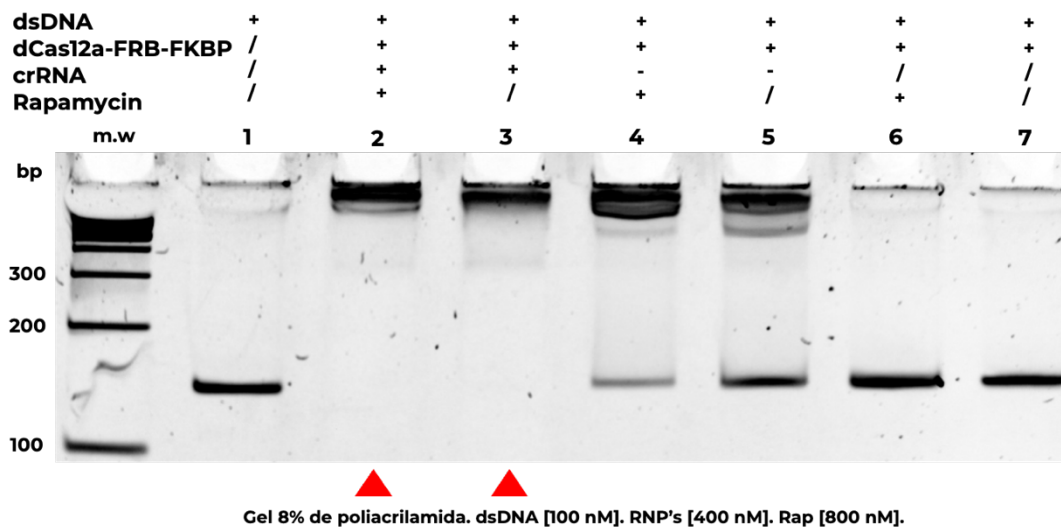


Figura 23. Análisis de movilidad electroforética en gel de poliacrilamida PAGE al 8% con dsDNA de 140 pb en todos los carriles. Se muestran en los carriles de derecha a izquierda. **1:** dsDNA solo (140 bp); **2 y 3:** RNPs específicos (+) al dsDNA con y sin rapamicina, respectivamente; **4 y 5:** RNPs inespecíficos (-) al dsDNA con y sin rapamicina, respectivamente; **6 y 7:** dCas12a-FRB y dCas12a-FKBP sin formar complejo con crRNA, con y sin rapamicina, respectivamente. Las flechas rojas indican la posición esperada del dsDNA en ausencia de RNPs.

Estos resultados indican que las proteínas quiméricas dCas12a-FKBP y dCas12aFRB, en complejo con sus crRNAs, son capaces de reconocer específicamente secuencias objetivo dentro de un dsDNA, manteniendo esta capacidad de unión específica de manera independiente a la presencia o ausencia de rapamicina.

Caracterización morfológica de los bloques de construcción individuales

Se evaluó la especificidad de unión de las proteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB en complejo con sus crRNAs hacia secuencias objetivo en un dsDNA de 210 bp, utilizando microscopía de fuerza atómica. Este dsDNA contiene tres regiones diana distintas que se hibridan con uno de los crRNAs ("A", "C" o "E"), el diagrama de ensamble se encuentra en la **Tabla 2**, permitiendo el posicionamiento específico de los RNPs a escala nanométrica.

Se incubaron dos RNPs, ambos compuestos por dCas12a-FRB, con el crRNA "A" en uno y el crRNA "C" en el otro, junto con el dsDNA de 210 bp, estos RNPs fueron diseñados para posicionarse en los extremos del dsDNA. Se midieron experimentalmente las longitudes totales de los bloques formados por estos RNPs ensamblados en los extremos del dsDNA (**Figura 24 a - c**), con estos datos se realizó un histograma que mostró que la distribución de la longitud total de los bloques híbridos se encontraba en un rango de entre ≈ 62 nm a ≈ 68 nm (**Figura 24 d**). También se midieron las distancias entre el centro de un RNP y el centro del otro RNP, obteniéndose longitudes que variaban entre ≈ 39 nm y ≈ 45 nm.

Se calculó la longitud teórica total del dsDNA de 210 bp, considerando que hay 0.34 nm entre cada par de bases, resultando en una longitud de 71.4 nm. Asimismo, se calculó la distancia teórica entre ambos RNPs ensamblados, tomando en cuenta los 24 nucleótidos del dsDNA donde se hibridan los crRNAs "A" y "C", obteniéndose una longitud de 50.32 nm (**Figura 24 e**). Las distancias teóricas se compararon con las distancias experimentales, observándose distancias menores a las teóricas. Esto podría deberse debido a que cada RNP desnatura la doble hebra en la secuencia donde se hibrida el crRNA, modificando la distancia constante de 0.34 nm entre cada par de bases. Además, al remover el solvente de las muestras se puede modificar la estructura de los RNPs y el dsDNA, afectando así las longitudes esperadas.

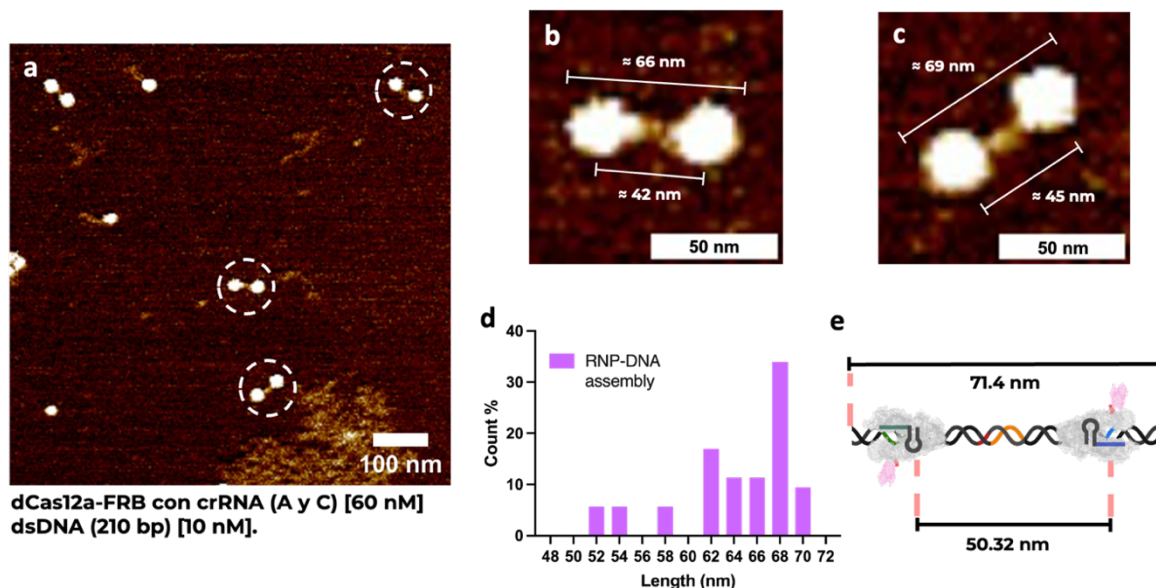


Figura 24: Bloque de construcción individual ensamblado con dos RNPs. **a)** Micrografía de fuerza atómica donde se destacan los bloques individuales que contienen dos RNPs ensamblados en el dsDNA. **b) y c)** Micrografías de fuerza atómica donde se muestran sus longitudes totales de los bloques de construcción, así como la longitud entre ambos RNPs. **d)** Histograma de la longitud total de los bloques de construcción híbridos. **e)** Representación esquemática del bloque de construcción propuesto, mostrando las longitudes teóricas entre los RNPs y la longitud total del mismo.

También se incubaron tres RNPs, compuestos por dCas12a-FKBP, con el crRNA “A”, el crRNA “C” y el crRNA “E”, junto con el dsDNA de 210 bp, estos RNPs fueron diseñados para posicionarse en el medio y en los extremos del dsDNA, basado en el diagrama de ensamble de la **Tabla 2**. Se midieron experimentalmente las longitudes totales de los bloques formados por estos RNPs ensamblados en las tres regiones del dsDNA (**Figura 25 a - c**). Con estos datos, se elaboró un histograma que mostró que la distribución de la longitud total de los bloques híbridos se encontraba en un rango de entre 60 nm a 62 nm (**Figura 25 d**). Del mismo modo, se midieron las distancias entre los centros de los tres RNPs, que variaron entre 19 nm y 23 nm.

Por último, se calculó la distancia teórica entre los tres RNPs ensamblados, considerando la longitud total del templado de dsDNA (71.4 nm) y los nucleótidos donde se hibridan los crRNAs “A”, “C” y “E”, obteniéndose una longitud teórica de 25.16 nm entre cada RNP (**Figura 25 e**).

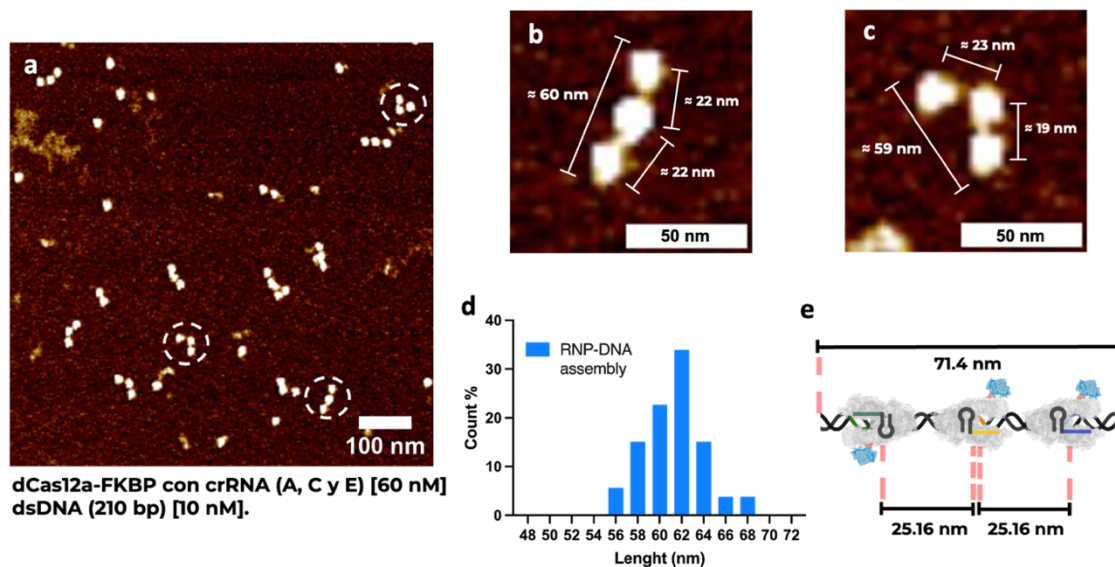


Figura 25: Bloque de construcción individual ensamblado con tres RNPs. **a)** Micrografía de fuerza atómica donde se destacan los bloques individuales que contienen tres RNPs ensamblados en el dsDNA. **b) y c)** Micrografías de fuerza atómica donde se muestran sus longitudes totales de los bloques de construcción, así como la longitud entre los RNPs. **d)** Histograma de la longitud total de los bloques de construcción híbridos. **e)** Representación del bloque de construcción propuesto, mostrando las longitudes teóricas entre los RNPs y la longitud total del mismo.

Las micrografías de fuerza atómica indican que los RNPs muestran una alta especificidad en el reconocimiento de sus secuencias objetivo en el dsDNA. Además, las longitudes totales de los bloques híbridos se aproximan a las expectativas teóricas, aunque se observan desviaciones debido a la desnaturalización local del dsDNA por los RNPs y a la remoción del solvente. Sin embargo, estos resultados confirman que estos bloques de construcción se ensamblan con gran precisión a escala nanométrica.

Caracterización morfológica de las bionanoestructuras híbridas autoensambladas.

Se comprobó mediante microscopía de fuerza atómica que la polimerización de las nanoestructuras es inducida por la presencia de rapamicina. Para ello, se ensamblaron los bloques de construcción individuales compuestos por el RNP “A” (dCas12a-FRB con su crRNA “A”), el RNP “C” (dCas12a-FKBP con su crRNA “C”), y el dsDNA de 140 bp, que contiene dos regiones diana distintas en sus extremos que hibridan con uno de los crRNAs (“A” o “C”), basado en diagrama de ensamble de la **Tabla 2**. El ensamblaje se realizó sin añadir rapamicina, esperando que no se formaran polímeros.

Se midieron experimentalmente las longitudes totales de los bloques formados por estos RNPs ensamblados en los extremos del dsDNA (**Figura 26 a - c**); con estas mediciones, se realizó un histograma que mostró que la distribución de la longitud total de los bloques de construcción se encontraba en un rango de entre ≈ 34 nm a ≈ 40 nm (**Figura 26 d**). También se midieron las distancias entre los centros de los dos RNPs, obteniéndose longitudes que variaban entre ≈ 20 nm y ≈ 22 nm. Por último, se calculó la distancia teórica del bloque de construcción, considerando la longitud total del templado de dsDNA (47.6 nm) y los nucleótidos donde se hibridan los crRNAs “A” y “C”, obteniendo una longitud teórica de 25.84 nm entre cada RNP (**Figura 26 e**).

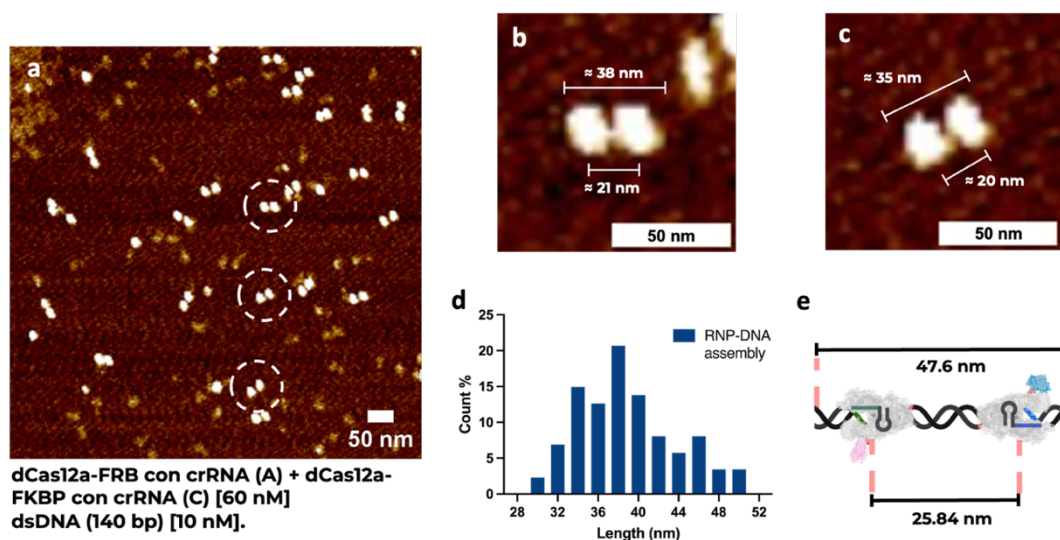


Figura 26: Bloque de construcción individual ensamblado con tres RNPs. a) Micrografía de fuerza atómica donde se destacan los bloques individuales que contienen dos RNPs ensamblados en el dsDNA. b) y c) Micrografías de fuerza atómica donde se muestra la longitud total de los bloques de construcción, así como la longitud entre sus RNPs. d) Histograma de la longitud total de los bloques de construcción híbridos.

e) Representación esquemática del bloque de construcción propuesto, mostrando las longitudes teóricas entre los RNPs y la longitud total del mismo.

Después de ensamblar los bloques de construcción individuales, se añadió rapamicina para inducir la polimerización. Esta metodología, denominada “Additive Methodology” (AM), consiste en agregar los bloques de construcción de manera consecutiva. Como se muestra en la **Figura 27 a y 27 b**, la rapamicina induce de manera efectiva la polimerización de los monómeros, también se realizó una representación esquemática del polímero ensamblado por cuatro monómeros (**Figura 27 c**), a su vez se midieron las longitudes totales de los polímeros obtenidos y, con estos datos, se elaboró un histograma que mostró la distribución de la longitud total de las polimerizaciones. Además, se realizó un análisis para calcular el número de monómeros ensamblados gracias a la presencia de rapamicina. Se encontró que el 80.65% de las bionanoestructuras ensambladas tenían una longitud entre ≈ 60 nm y ≈ 80 nm, indicando la presencia de dos monómeros ensamblados, cada uno con una longitud de ≈ 34 nm. Asimismo, el 17.5% de los polímeros se encontraban en el rango de ≈ 95 nm a ≈ 105 nm, correspondiente a tres monómeros ensamblados. Finalmente, se encontró un 1.85% de los polímeros con una longitud de ≈ 135 nm, lo que corresponde a una baja eficiencia de polimerización con cuatro monómeros ensamblados (**Figura 27 d**).

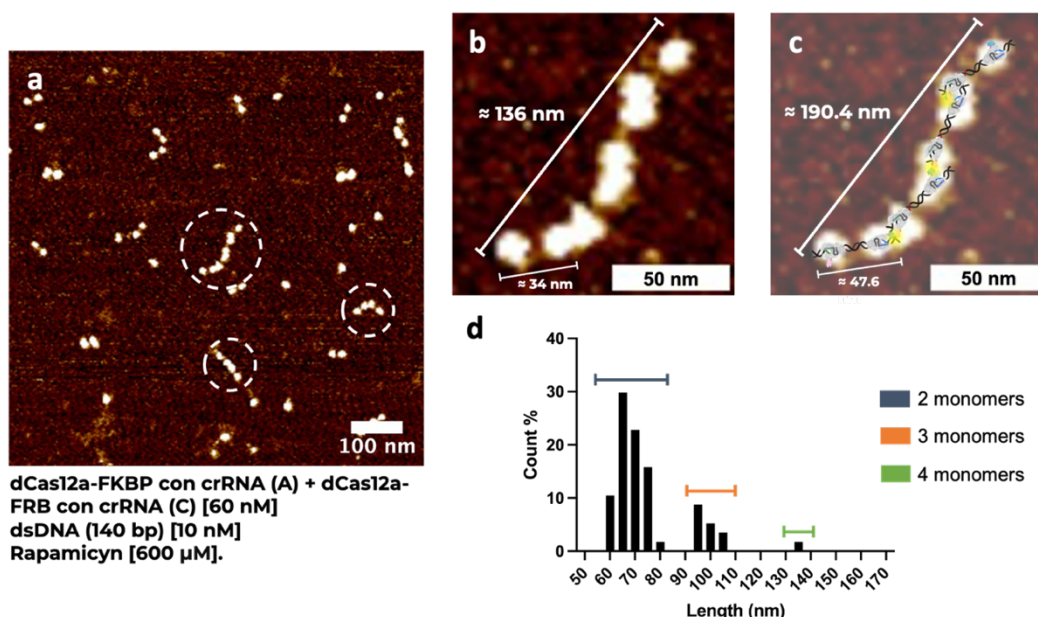


Figura 27: Bionanoestructuras híbridas autoensambladas en presencia de rapamicina. a) Micrografía de fuerza atómica donde se destacan los polímeros ensamblados. **b)** Micrografía de fuerza atómica de un polímero compuesto por 4 monómeros ensamblados, donde se muestra la longitud total del polímero obtenida,

así como la longitud de uno de sus monómeros. **c)** Representación esquemática del polímero ensamblado de 4 monómeros, mostrando la longitud total teórica de los 4 monómeros, así como la longitud teórica de uno de sus monómeros. **d)** Histograma de la longitud total de las polimerizaciones, en azul para 2 monómeros, naranja para 3 monómeros y verde para 4 monómeros.

Se calculó la distancia teórica tomando en cuenta las bp que hay entre los centros de los RNPs, que es ≈ 33.3 nm. También se midieron las distancias entre los centros de los dímeros de RNPs, obteniéndose longitudes que variaban entre 26 nm a 28 nm (**Figura 28**).

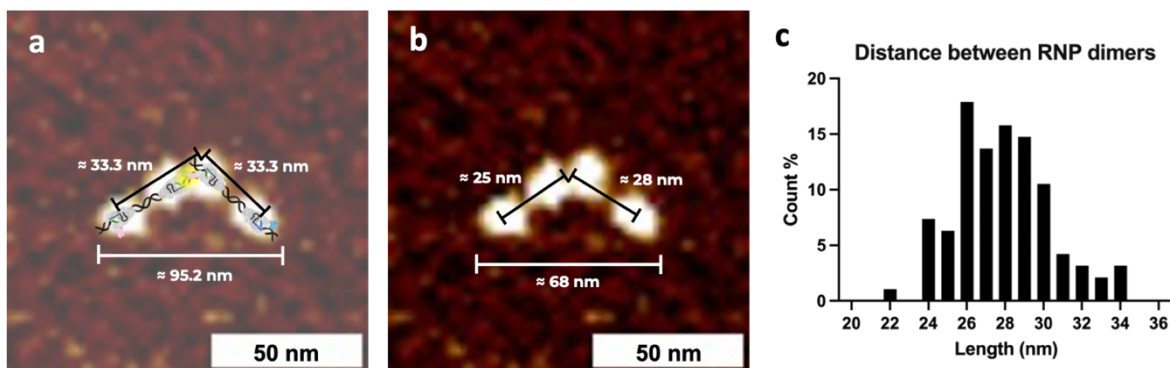


Figura 28: Dímero autoensamblado por la presencia de rapamicina. **a)** Representación esquemática de los dos monómeros ensamblados mostrando su longitud total teórica, así como la longitud teórica de los centros de los RNPs ensamblados. **b)** Micrografía de fuerza atómica de la misma bionanoestructura compuesta por dos monómeros ensamblados, donde se muestra la longitud total del dímero, así como su longitud entre los centros de los RNPs ensamblados. **c)** Histograma de la distancia entre los centros de los dímeros.

Estos resultados demuestran que la rapamicina induce efectivamente la polimerización de los bloques de construcción individuales, formando principalmente bionanoestructuras de dos monómeros (80.65%), con menores proporciones de tres (17.5%) y cuatro monómeros (1.85%). Además, se observó que las distancias entre los centros de los dímeros de RNPs variaron entre ≈ 26 nm y ≈ 28 nm, lo que indica una desviación respecto a la distancia teórica calculada. Esta desviación, es consistente con los resultados de experimentos anteriores, debido a la desnaturalización local del dsDNA provocada por los RNPs y a la eliminación del solvente.

Para lograr una mayor polimerización de los bloques de construcción, se evaluaron dos metodologías adicionales y se compararon con la "Additive Methodology" (AM). La primera fue la inducción secuencial de interacciones proteína-proteína, seguida de la interacción del dímero proteico con el dsDNA, denominada "Protein-Protein" (PP). La segunda metodología fue la inducción simultánea de ambas interacciones, conocida como

“One Pot” (OP). Las nanoestructuras se ensamblaron utilizando estas metodologías y fueron evaluadas mediante microscopía de fuerza atómica para determinar cuál promovía mejor la polimerización de los monómeros. Se midieron las nanoestructuras obtenidas y se elaboró un histograma que mostró la distribución de la longitud total para las tres metodologías. Además, se analizó el número de monómeros ensamblados (**Figura 29**).

En el caso de la “Additive Methodology”, las nanoestructuras formadas consistieron predominantemente en dos monómeros ensamblados (80.65%), con menores proporciones de tres y cuatro monómeros (17.5% y 1.85%, respectivamente). Para la metodología “Protein-Protein”, las nanoestructuras formadas estaban mayoritariamente compuestas por dos y tres monómeros ensamblados (38.17 % cada uno), con menores proporciones de estructuras de cuatro, cinco y seis monómeros (9.08%, 9.08%, y 5.43%, respectivamente). En contraste, la metodología “One Pot” resultó en una menor proporción de nanoestructuras con dos monómeros ensamblados (14.05%) y una mayor proporción con tres monómeros (40.62%), junto con estructuras de cuatro (10.92%), cinco (14.05%), seis (7.8%), siete (10.93%) y ocho monómeros (1.56%).

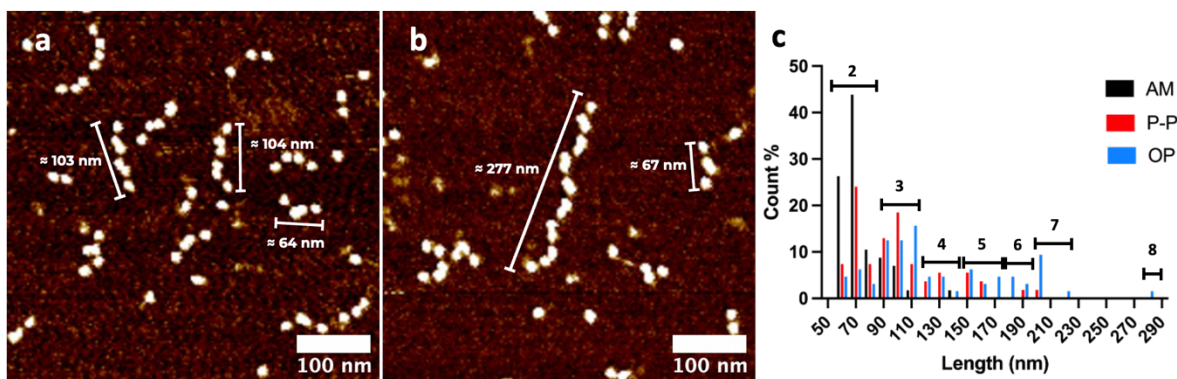


Figura 29: Micrografías de fuerza atómica de nanoestructuras ensambladas utilizando las metodologías **a)** “ProteinProtein” y **b)** “One Pot”, donde se muestran las longitudes totales de cada nanofibra. **c)** Histograma de la longitud total de las nanoestructuras ensambladas por las tres diferentes metodologías (AM, P-P y OP), donde se resalta también el número de monómeros ensamblados.

La metodología “Protein-Protein” favoreció la formación de estructuras con dos y tres monómeros, mientras que la metodología “One Pot” promovió una mayor diversidad de ensamblajes con una tendencia hacia estructuras de más de tres monómeros. Ambas metodologías mostraron una mayor polimerización de los bloques de construcción en comparación con la “Additive Methodology”.

También se llevó a cabo la formación de las nanoestructuras híbridas diseñadas en forma de nanoramificaciones, utilizando bloques de construcción compuestos por 3 RNPs ensamblados en un dsDNA de 210 bp mediante la metodología "One Pot". Se midieron las nanoestructuras ramificadas a partir de las micrografías de fuerza atómica obtenidas, y se realizaron histogramas de distribución de las longitudes lineales totales (**Figura 30 a - c**). Además, se analizaron las longitudes del eje principal y las ramificaciones secundarias derivadas de dicho eje (**Figura 30 d y e**). Las longitudes totales, sumando todas las ramificaciones, variaron entre ≈ 100 nm y ≈ 250 nm, las longitudes del eje central se encontraron entre ≈ 65 nm y ≈ 185 nm, de las cuales se desprendían ramificaciones secundarias de entre ≈ 50 nm y ≈ 70 nm. La mayoría de las nanoestructuras ramificadas obtenidas presentaron un nodo de ramificación que se dividía en tres ramificaciones.

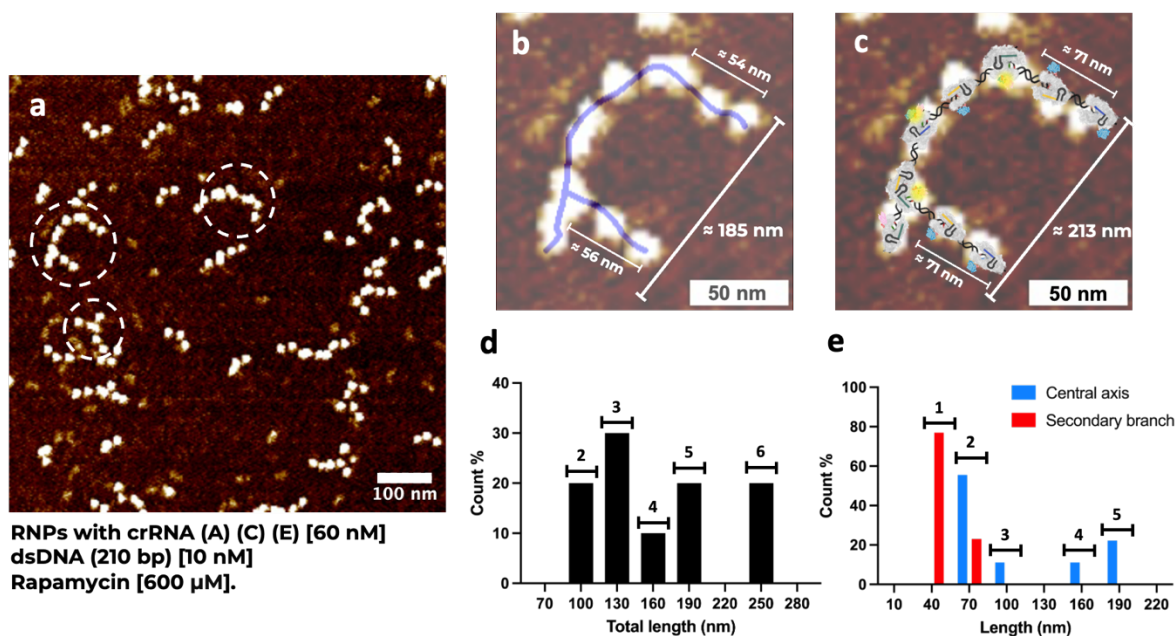


Figura 30: Nanoramificaciones autoensambladas inducidas por rapamicina. **a)** Micrografía de fuerza atómica donde se destacan las nanoramificaciones. **b)** Micrografía de fuerza atómica de una ramificación compuesta por 4 monómeros ensamblados, mostrando la longitud del eje principal del polímero y la longitud de sus 2 ramificaciones secundarias. **c)** Representación esquemática del polímero ensamblado de 4 monómeros, mostrando la longitud total teórica de las 2 ramificaciones secundarias y la del eje principal. **d)** Histograma de la longitud total de las nanoramificaciones, indicando también el número de monómeros ensamblados **e)** Histograma de la longitud total del eje central (azul) y de las ramificaciones secundarias (rojo), indicando también el número de monómeros ensamblados.

Discusión

Esta investigación demostró que las ribonucleoproteínas quiméricas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB pueden ser utilizadas como bloques de construcción innovadores para la formación de nanoestructuras híbridas. La capacidad de unión a secuencias específicas en el dsDNA del sistema CRISPR-Cas es clave para este proceso. Además, la sensibilidad a la rapamicina que le confieren los dominios de heterodimerización FKBP-FRB ofrece un control inducible para promover la polimerización, lo que otorga a estos bloques la capacidad de construir nanomateriales de manera precisa y controlada. La capacidad para diseñar y formar estructuras lineales y ramificadas amplía las aplicaciones potenciales de estos nanomateriales en diversos campos. Como se reporta en el estudio de Lu et al. (2024), donde utilizaron DNA origami como plataforma para guiar el ensamblaje preciso de nanoestructuras DNA-proteína en formas lineales y ramificadas, controlando la geometría y la estequiometría. Este método permite diseñar clústeres de ligandos proteicos, optimizando su interacción con los receptores celulares y mejorando la bioactividad. Estos complejos también contribuyen al desarrollo de nuevos materiales biomoleculares. Asimismo, el posicionamiento específico de proteínas puede mejorar la eficiencia catalítica al organizar espacialmente enzimas, como lo demuestran Berckman y Chen (2019), quienes utilizaron proteínas de fusión de dCas9 combinadas con un dominio de unión a celulosa (CBD) y una endoglucanasa (CelA), lo que permitió co-localizar las enzimas en un templado de dsDNA y optimizar procesos como la hidrólisis de celulosa. Este sistema también facilita la reconfiguración del orden y la proximidad de las enzimas en el metabolón, lo que podría tener aplicaciones significativas tanto in vitro como in vivo para la activación de rutas metabólicas. Estos resultados sugieren que las nanoestructuras híbridas aquí propuestas pueden ser funcionalizadas integrando otros bloques de construcción que tengan el sistema de heterodimerización FKBP-FRB. Esto podría permitir el ensamblaje de antígenos en las estructuras o decorarlas con péptidos o enzimas, con una estequiometría precisa, para este enfoque se podrían utilizar las nanoestructuras lineales en lugar de las ramificadas ya que el ensamblaje mostró ser menos eficiente debido a su mayor complejidad estructural. Para mejorar la eficiencia de ensamblaje de las nanoramificaciones, se podría explorar la modificación de los parámetros fisicoquímicos para optimizar la dimerización de los dominios FKBP-FRB. Alternativamente, se podría considerar la integración de otros sistemas de dimerización mediante ingeniería genética,

como el sistema SpyCatcher-SpyTag, o la conjugación química covalente a través de residuos de Cys-Maleimida.

Conclusiones

Esta investigación ha mostrado que las ribonucleoproteínas de fusión dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB pueden emplearse como bloques de construcción con interfaces definidas. Ambas proteínas se purificaron con altos niveles de pureza, y la heterodimerización es controlada mediante la adición de rapamicina. Además, se confirmó que la dimerización proteica inducida por rapamicina no afecta la capacidad de estas ribonucleoproteínas para reconocer y unirse de manera específica a secuencias de dsDNA, permitiendo un ensamblaje ortogonal preciso. La rapamicina indujo con éxito la polimerización de las nanoestructuras, predominando aquellas compuestas por dos monómeros, aunque también se observaron estructuras más complejas ensambladas con hasta cuatro monómeros. Al comparar las metodologías de ensamblaje, la metodología “One Pot” resultó ser la más eficiente para ensamblar estas nanoestructuras. Este sistema ofrece una plataforma versátil para la formación de bionanoestructuras híbridas con posibles aplicaciones en biotecnología, ingeniería de materiales o catálisis enzimática. Ambas nanoestructuras pueden ajustarse para la fabricación controlada de otros bionanomateriales.

Perspectivas

- Incorporación de fluoróforos a los templados de dsDNA en las nanoestructuras lineales que podrían ser utilizados como “nanorulers” en microscopía de superresolución STORM. Permitirían realizar una caracterización detallada del ensamblaje y la estructura.
- Explorar metodologías para optimizar el ensamblaje de las nanoramificaciones.
- Estos bloques de construcción podrían ser usados para diseñar nuevas nanoestructuras, como el moldeado de dsDNA mediante una técnica similar al DNA Origami. La incorporación de otras moléculas podría expandir las aplicaciones de las nanoestructuras, permitiendo la creación de materiales con propiedades específicas.

Referencias

- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C. C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., ... Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 630(8016), 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
- Alberts, B. (2019). *Essential cell biology* (Fifth edition). W.W. Norton & Company.
- Anal, A. K. (2018). *Bionanotechnology Principles and Applications*. CRC Press.
- Banaszynski, L. A., Liu, C. W., & Wandless, T. J. (2005). Characterization of the FKBP·Rapamycin·FRB Ternary Complex. *Journal of the American Chemical Society*, 127(13), 4715–4721. <https://doi.org/10.1021/ja043277y>
- Benson, E., Mohammed, A., Gardell, J., Masich, S., Czeizler, E., Orponen, P., & Högberg, B. (2015). DNA rendering of polyhedral meshes at the nanoscale. *Nature*, 523(7561), 441–444. <https://doi.org/10.1038/nature14586>
- Berckman, E. A., & Chen, W. (2019). Exploiting dCas9 fusion proteins for dynamic assembly of synthetic metabolons. *Chemical Communications*, 55(57), 8219–8222. <https://doi.org/10.1039/C9CC04002A>
- Bloemen, M. (2015). Immunomagnetic separation of bacteria by iron oxide nanoparticles. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1065.1365>
- Calcines-Cruz, C., Finkelstein, I. J., & Hernandez-Garcia, A. (2021). CRISPR-Guided Programmable Self-Assembly of Artificial Virus-Like Nucleocapsids. *Nano Letters*, 21(7), 2752–2757. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c04640>
- Castro, C. E., Kilchherr, F., Kim, D.-N., Shiao, E. L., Wauer, T., Wortmann, P., Bathe, M., & Dietz, H. (2011). A primer to scaffolded DNA origami. *Nature Methods*, 8(3), 221–229. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1570>
- Chan, V., Dreolini, L. F., Flintoff, K. A., Lloyd, S. J., & Mattenley, A. A. (2002). The Effect of Increasing Plasmid Size on Transformation Efficiency in *Escherichia coli*. 2.
- Fegan, A., White, B., Carlson, J. C. T., & Wagner, C. R. (2010). Chemically Controlled Protein Assembly: Techniques and Applications. *Chemical Reviews*, 110(6), 3315– 3336. <https://doi.org/10.1021/cr8002888>
- Fu, T. J., & Seeman, N. C. (1993). DNA double-crossover molecules. *Biochemistry*, 32(13), 3211–3220. <https://doi.org/10.1021/bi00064a003>
- Gallagher, S. R. (2014). Digital Image Processing and Analysis with ImageJ. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 9(1). <https://doi.org/10.1002/9780470089941.eta03cs9>

- Gao, P., Yang, H., Rajashankar, K. R., Huang, Z., & Patel, D. J. (2016). Type V CRISPRCas Cpf1 endonuclease employs a unique mechanism for crRNA-mediated target DNA recognition. *Cell Research*, 26(8), 901–913. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.88>
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39). <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- Gazit, E., & Mitraki, A. (2013). *Plenty of room for biology at the bottom: An introduction to bionanotechnology* (Second Edition). Imperial College Press ; Distributed by World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- Gerrard, J. A., & Domigan, L. J. (Eds.). (2020). *Protein Nanotechnology: Protocols, Instrumentation, and Applications* (Vol. 2073). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9869-2>
- Goodsell, D. S. (2004). *Bionanotechnology: Lessons from nature*. Wiley-Liss.
- Hernandez-Garcia, A. (2021). Strategies to Build Hybrid Protein–DNA Nanostructures. *Nanomaterials*, 11(5), 1332. <https://doi.org/10.3390/nano11051332>
- Holliday, R. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetical Research*, 5(2), 282–304. <https://doi.org/10.1017/S0016672300001233>
- Hong, F., Zhang, F., Liu, Y., & Yan, H. (2017). DNA Origami: Scaffolds for Creating Higher Order Structures. *Chemical Reviews*, 117(20), 12584–12640. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00825>
- Hulla, J., Sahu, S., & Hayes, A. (2015). Nanotechnology: History and future. *Human & Experimental Toxicology*, 34(12), 1318–1321. <https://doi.org/10.1177/0960327115603588>
- Jianwei, L., Jobichen, C., Machida, S., Meng, S., Read, R. J., Hongying, C., Jian, S., Yuan, Y. A., & Sivaraman, J. (2023). Structures of apo Cas12a and its complex with crRNA and DNA reveal the dynamics of ternary complex formation and target DNA cleavage. *PLOS Biology*, 21(3), e3002023. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002023>
- Kielar, C., Xin, Y., Shen, B., Kostianen, M. A., Grundmeier, G., Linko, V., & Keller, A. (2018). On the Stability of DNA Origami Nanostructures in Low-Magnesium Buffers. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(30), 9470–9474. <https://doi.org/10.1002/anie.201802890>
- Krebs, J. E., Goldstein, E. S., Kilpatrick, S. T., & Lewin, B. (2018). *Lewin's genes XII* (Twelfth edition). Jones & Bartlett Learning.
- Kuan, S. L., Bergamini, F. R. G., & Weil, T. (2018). Functional protein nanostructures: A chemical toolbox. *Chemical Society Reviews*, 47(24), 9069–9105. <https://doi.org/10.1039/C8CS00590G>

- Li, X., Yang, D., Shen, L., Xu, F., & Wang, P. (2020). Programmable Assembly of DNA-protein Hybrid Structures. *Chemical Research in Chinese Universities*, 36(2), 211–218. <https://doi.org/10.1007/s40242-019-0038-x>
- Li, X., Yang, X., Qi, J., & Seeman, N. C. (1996). Antiparallel DNA Double Crossover Molecules As Components for Nanoconstruction. *Journal of the American Chemical Society*, 118(26), 6131–6140. <https://doi.org/10.1021/ja960162o>
- Lin, C., Liu, Y., Rinker, S., & Yan, H. (2006). DNA Tile Based Self-Assembly: Building Complex Nanoarchitectures. *ChemPhysChem*, 7(8), 1641–1647. <https://doi.org/10.1002/cphc.200600260>
- Lu, Q., Xu, Y., Poppleton, E., Zhou, K., Sulc, P., Stephanopoulos, N., & Ke, Y. (2024). DNANanostructure-Guided Assembly of Proteins into Programmable Shapes. *Nano Letters*, 24(5), 1703–1709. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.3c04497>
- Luzhetskaya, O. P., Sedykh, S. E., & Nevinsky, G. A. (2020). How Human H1 Histone Recognizes DNA.
- Mendes, A. C., Baran, E. T., Reis, R. L., & Azevedo, H. S. (2013). Self-assembly in nature: Using the principles of nature to create complex nanobiomaterials. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 5(6), 582–612. <https://doi.org/10.1002/wnan.1238>
- Mohanraju, P., Oost, J., Jinek, M., & Swarts, D. (2018). Heterologous Expression and Purification of the CRISPR-Cas12a/Cpf1 Protein. *BIO-PROTOCOL*, 8(9). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2842>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Nagamune, T. (2017). Biomolecular engineering for nanobio/bionanotechnology. *Nano Convergence*, 4(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s40580-017-0103-4>
- Nouri, Z. H. M., Poormazaheri, H., Mohammadaliha, T., Dashatan, A. A., Dash, F. G. T., & Dolati, M. (2024). Recent advances and practical applications of CRISPR/Cas technology in clinical trial of cancer and infectious diseases: A comprehensive review.
- Paul, B., & Montoya, G. (2020). CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications. *Biomedical Journal*, 43(1), 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2019.10.005>
- Praetorius, F., & Dietz, H. (2017). Self-assembly of genetically encoded DNA-protein hybrid nanoscale shapes. *Science*, 355(6331), eaam5488. <https://doi.org/10.1126/science.aam5488>
- Raper, A. T., Stephenson, A. A., & Suo, Z. (2018). Functional Insights Revealed by the Kinetic Mechanism of CRISPR/Cas9. *Journal of the American Chemical Society*, 140(8), 2971–2984. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b13047>

- Rawat, R. S. (2015). Dense Plasma Focus—From Alternative Fusion Source to Versatile High Energy Density Plasma Source for Plasma Nanotechnology. *Journal of Physics: Conference Series*, 591(1), 012021. <https://doi.org/10.1088/17426596/591/1/012021>
- Rothemund, P. W. K. (2006). Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 440(7082), 297–302. <https://doi.org/10.1038/nature04586>
- Seeman, N. C. (1982). Nucleic acid junctions and lattices. *Journal of Theoretical Biology*, 99(2), 237–247. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(82\)90002-9](https://doi.org/10.1016/0022-5193(82)90002-9)
- Seeman, N. C., & Sleiman, H. F. (2017). DNA nanotechnology. *Nature Reviews Materials*, 3(1), 17068. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.68>
- Stephanopoulos, N. (2020). Hybrid Nanostructures from the Self-Assembly of Proteins and DNA. *Chem*, 6(2), 364–405. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2020.01.012>
- Strohkendl, I., Saifuddin, F. A., Rybarski, J. R., Finkelstein, I. J., & Russell, R. (2018). Kinetic Basis for DNA Target Specificity of CRISPR-Cas12a. *Molecular Cell*, 71(5), 816–824.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.043>
- Swarts, D. C., & Jinek, M. (2019). Mechanistic Insights into the cis- and trans-Acting DNase Activities of Cas12a. *Molecular Cell*, 73(3), 589–600.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.021>
- Wang, H., La Russa, M., & Qi, L. S. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 227–264. <https://doi.org/10.1146/annurevbiochem-060815-014607>
- Weinberg, R. L., Veprintsev, D. B., & Fersht, A. R. (2004). Cooperative Binding of Tetrameric p53 to DNA. *Journal of Molecular Biology*, 341(5), 1145–1159. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.06.071>
- Williams, M. C., & Maher, L. J. (Eds.). (2011). *Biophysics of DNA-Protein Interactions: From Single Molecules to Biological Systems*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92808-1>
- Winfree, E., Liu, F., Wenzler, L. A., & Seeman, N. C. (1998). Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals. *Nature*, 394(6693), 539–544. <https://doi.org/10.1038/28998>
- Wu, T., Cao, Y., Liu, Q., Wu, X., Shang, Y., Piao, J., Li, Y., Dong, Y., Liu, D., Wang, H., Liu, J., & Ding, B. (2022). Genetically Encoded Double-Stranded DNA-Based Nanostructure Folded by a Covalently Bivalent CRISPR/dCas System. *Journal of the American Chemical Society*, 144(14), 6575–6582. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c01760>
- Xu, X., & Qi, L. S. (2019). A CRISPR–dCas Toolbox for Genetic Engineering and Synthetic Biology. *Journal of Molecular Biology*, 431(1), 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.037>

- Yamano, T., Nishimasu, H., Zetsche, B., Hirano, H., Slaymaker, I. M., Li, Y., Fedorova, I., Nakane, T., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2016a). Crystal Structure of Cpf1 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*, 165(4), 949–962. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.003>
- Yamano, T., Nishimasu, H., Zetsche, B., Hirano, H., Slaymaker, I. M., Li, Y., Fedorova, I., Nakane, T., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2016b). Crystal Structure of Cpf1 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*, 165(4), 949–962. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.003>
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., Volz, S. E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E. V., & Zhang, F. (2015). Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell*, 163(3), 759–771. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>
- Zhu, H., & Liang, C. (2019). CRISPR-DT: Designing gRNAs for the CRISPR-Cpf1 system with improved target efficiency and specificity. *Bioinformatics*, 35(16), 2783–2789. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty1061>

Anexos

Mapas de los plásmidos de expresión de dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB

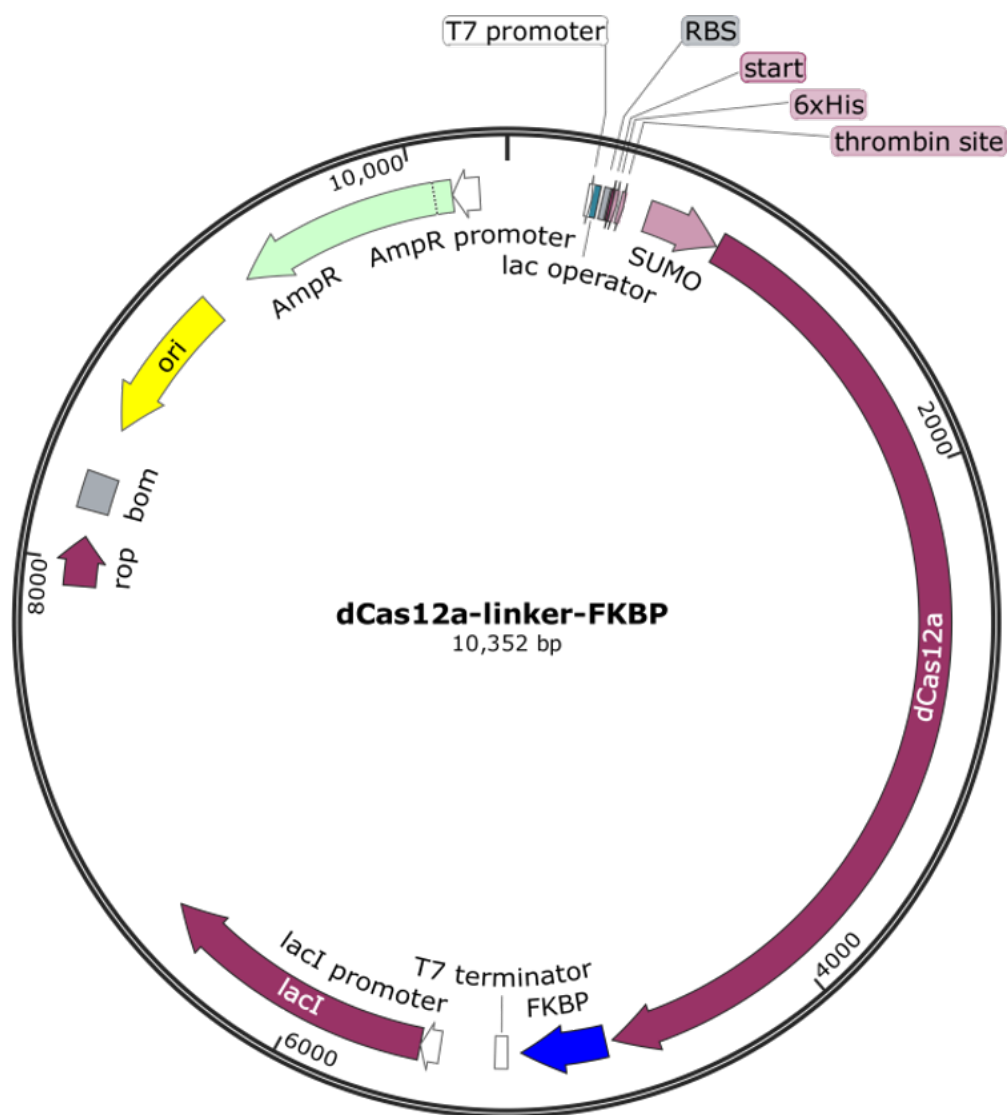


Figura 1. Plásmido de expresión de dCas12a-FKBP. Se destacan las características principales del plásmido, incluyendo el gen de resistencia a ampicilina (AmpR), el origen de replicación (ori), el promotor T7, las etiquetas SUMO y 6xHis, así como dCas12a y el dominio de heterodimerización FKBP.

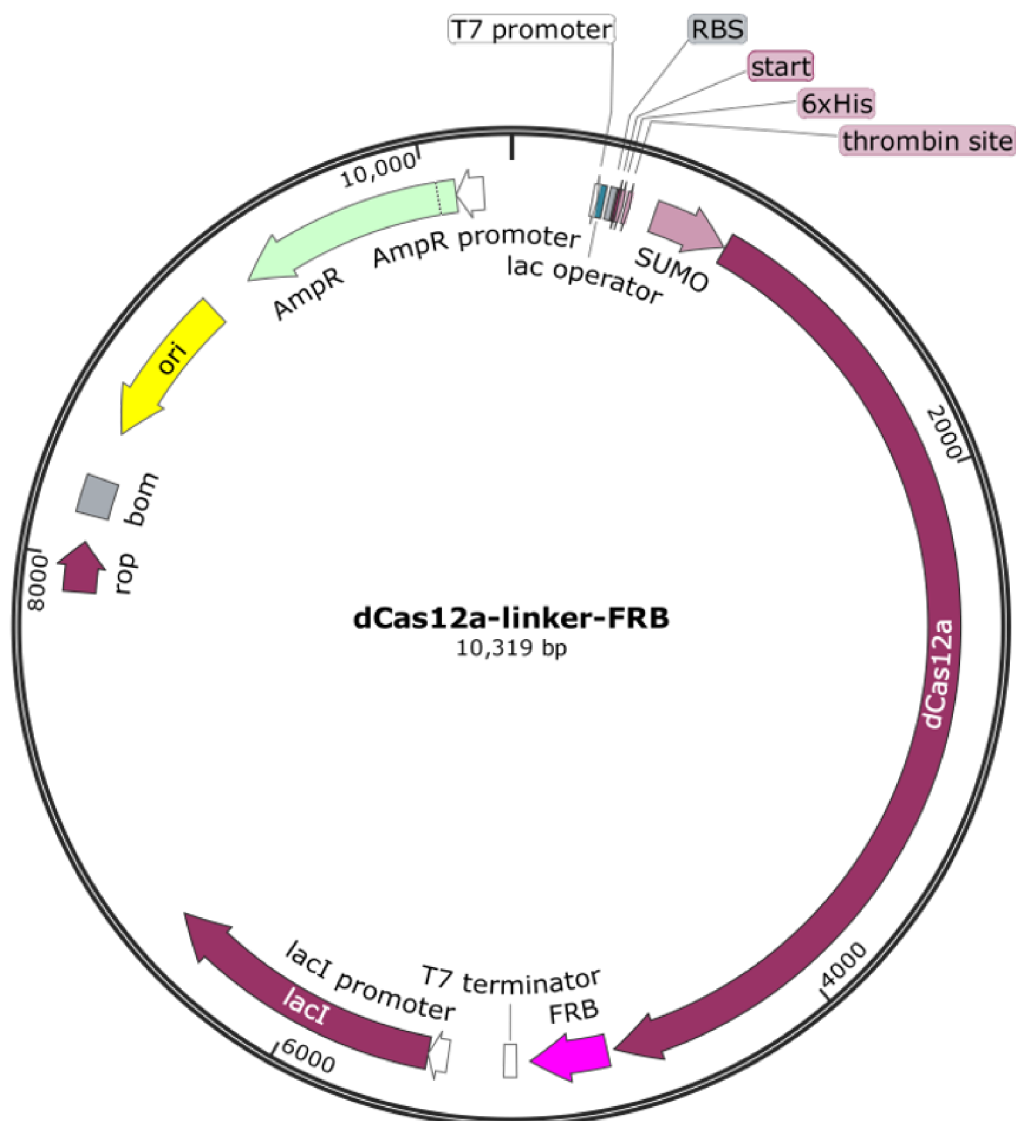


Figura 2. Plásmido de expresión de dCas12a-FRB. Se destacan las características principales del plásmido, incluyendo el gen de resistencia a ampicilina (AmpR), el origen de replicación (ori), el promotor T7, las etiquetas SUMO y 6xHis, así como dCas12a y el dominio de heterodimerización FRB.

Tabla 1. Secuencias de los dsDNAs y crRNAs utilizados para posicionar las proteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB en el DNA. La secuencia completa del crRNA consiste en la región constante 5' -UAAUUUCUACUCUUGUAGAU-3' (20 nt) y la región variable 5' -(24 nt)-3' que se muestra en la tabla. En rojo se resaltan los sitios PAM y en verde, amarillo y azul los sitios diana, respectivamente.

Secuencia dsDNA 140 bp con sus sitios diana	
2 sitios diana	CAAGGTCTAGGCACAATCCC
	AGGTGTTGATT
	GTAGTTGTGCTGC
	GAAAA
	CAAGTACGTGT
	CGCCGCTAACTAGGTGGCATCACACCGTAG
	T
	TTACGCCATCGCGTTGATATGGTATCT
	GCAG
	TGCATGTACTCGTTGC
Secuencia dsDNA 210 bp con sus sitios diana	
3 sitios diana	CAAGGTCTAGGCACAATCCC
	AGGTGTTGATT
	GTAGTTGTGCTGC
	GAAAA
	GCTTCAAGCTA
	GACGCGGCCTCCGCGAGTGGCGTACGAG
	TTT
	CGCAGTACTGTACGACCTAGCATGC
	TAATCA
	TGCTGTACAGGTGAGCGACGTCGTGCAATCG
	GTCCACGTTTA
	GTTGATATGGT
	ATCT
	GCAGTGCATGTACTCGTTGC
Secuencias crRNAs	
"A"	GCAGCACAACUACAAUACACCU
"C"	CGCCAU CGCGUUGAU AUGGUAUCU
"E"	GCAGUACUGUACGACCUAGCAUGC

Predicciones estructurales de las proteínas dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB

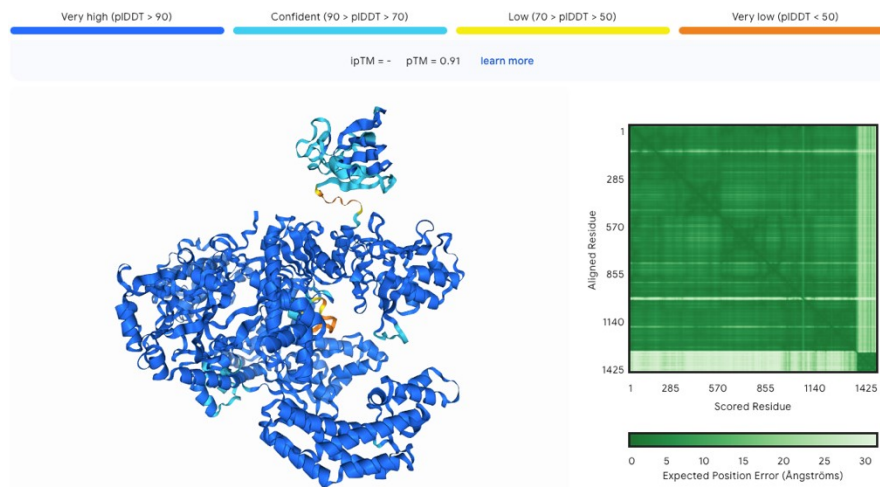


Figura 3. Simulación de la estructura 3D de la proteína dCas12-FKBP obtenida con AlphaFold 3. Se muestra la estructura de la proteína con la escala de confianza pLDDT codificada por colores (arriba), los valores altos (azul oscuro) indican regiones con alta confianza y los valores bajos (naranja/amarillo) indican regiones con menor confianza en la predicción.

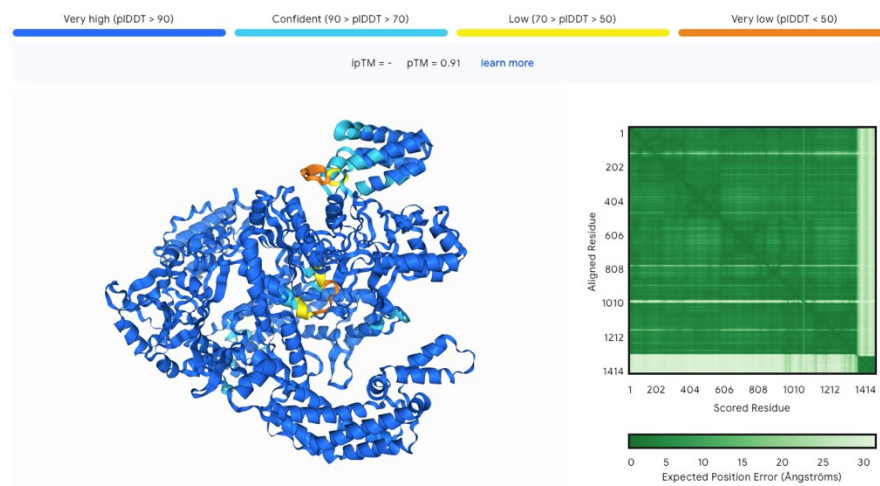


Figura 4. Simulación de la estructura 3D de la proteína dCas12-FRB obtenida con AlphaFold 3. Se muestra la estructura de la proteína con la escala de confianza pLDDT codificada por colores (arriba), los valores altos (azul oscuro) indican regiones con alta confianza y los valores bajos (naranja/amarillo) indican regiones con menor confianza en la predicción.