



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

TESIS

**“DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS CRISPR-dCas9 Y
dCas12a FUSIONADAS A DOMINIOS DE HETERODIMERIZACIÓN”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO**

**PRESENTA
ITZEL GUADALUPE GONZÁLEZ CARMONA**

Asesor: ARMANDO HERNÁNDEZ GARCÍA



MÉXICO, CDMX.

2022



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: AGUSTÍN LÓPEZ MUNGUÍA CANALES
VOCAL: CARMINA MONTIEL PACHECO
SECRETARIO: ARMANDO HERNÁNDEZ GARCÍA
1ER. SUPLENTE: FELIX MORALES FLORES
2° SUPLENTE: EDGAR AXEL DONJUAN GUERRERO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE INGENIERÍA BIOMOLECULAR Y BIONANOTECNOLOGÍA,
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE BIOMACROMOLÉCULAS, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

DR. ARMANDO HERNÁNDEZ GARCÍA

SUPERVISOR TÉCNICO

M. EN C. CARLOS CALCINES CRUZ

SUSTENTANTE

ITZEL GUADALUPE GONZÁLEZ CARMONA

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT IN210121

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES.....	5
3.1 Nanoestructuras de ADN con proteínas.....	5
3.2 Sistema CRISPR – Cas9 y CRISPR – Cas12a	7
3.3 Sistema de heterodimerización FKBP – Rapamicina – FRB	10
4. JUSTIFICACIÓN	15
5. HIPÓTESIS.....	15
6. OBJETIVOS.....	15
6.1 Objetivo general	15
6.2 Objetivos particulares.....	15
7. MATERIALES Y MÉTODOS	16
7.1 Vectores.....	16
7.2 Cepas bacterianas.....	16
7.3 Reactivos.....	17
7.4 Medios de cultivo	17
7.5 Buffers para la purificación de dCas9 – FKBP y dCas9 – FRB.....	17
7.6 Buffers para la purificación de dCas12a – FKBP y dCas12a – FRB.....	17
7.7 RESUMEN DE LA METODOLOGÍA	18
7.8 Diseño de las proteínas de fusión recombinantes	19
7.9 Clonación de los plásmidos de las proteínas de fusión recombinantes....	21
7.10 Verificación de la secuencia	23
7.11 Producción de las proteínas de fusión	24

7.12 Verificación de la producción de proteína	24
7.13 Purificación de las proteínas de fusión.....	25
7.14 Ensayos de caracterización de las proteínas de fusión recombinantes....	27
7.15 Obtención del ADN objetivo y ARN guía	29
7.16 Ensayos de unión con el ADN por EMSA	30
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
8.1 Diseño de las proteínas de fusión	30
8.2 Clonación de los plásmidos de las proteínas de fusión	31
8.3 Verificación de las secuencias clonadas	33
8.4 Verificación de la producción de proteína	35
8.5 Purificación de las proteínas de fusión.....	38
8.6 Ensayos de caracterización de las proteínas	45
8.7 Obtención del ADN objetivo y ARN guía	50
8.8 Ensayos de unión con DNA (EMSA)	52
9. CONCLUSIONES	55
10.PERSPECTIVAS Y AVANCES.....	56
11.BIBLIOGRAFÍA.....	57
12.ANEXO 1	61

1. RESUMEN

La tecnología de ADN Origami es una técnica que se basa en la unión de los ácidos nucleicos para la fabricación de nanoestructuras programadas con ADN monocatenario (ssDNA) de forma bidimensional (2D) y tridimensional (3D) (Dey *et al.*, 2021). Estas nanoestructuras se han utilizado en el campo de la investigación como en la caracterización y análisis de funciones de proteínas, biosensores de ácidos nucleicos y proteínas, entre otras cosas. Sin embargo, desde hace unos años, se ha propuesto utilizar ADN bicatenario y proteínas diméricas en esta técnica para darle una mayor estabilidad a las nanoestructuras y aumentar su campo de aplicación. Un ejemplo importante de esta estrategia es la que usó Praetorius & Dietz, 2017 con las proteínas TALEN, las cuales tienen un uso potencial en la edición genética. La razón por la cual se utilizaron estas proteínas es porque tienen una característica deseada para crear nanoestructuras, ya que se pueden unir fácilmente a las secuencias de ADN bicatenario, lo que permitiría una fácil distribución de las proteínas diméricas en las nanoestructuras. No obstante, recientemente las proteínas CRISPR – Cas9 y CRISPR – Cas12a se han descubierto como potenciales editoras genéticas con una mayor sensibilidad y facilidad de manipulación, lo que a su vez abre la posibilidad de su aplicación en el ámbito de la biotecnología. Entre los experimentos recientes destacados en esta área se encuentra el proyecto de Calcines Cruz *et al.*, 2021 en el cual se dimerizó la proteína dCas12a a un polipéptido tribloque (C–S₁₀–B) para la realización de una VLP (partículas similares a virus) orientada a autoensamblarse programablemente a ADN específico. Sin embargo, el desarrollo como tal de nanoestructuras de dsADN con proteínas dCas9 y dCas12a sigue sin ser explorado hasta el momento.

Es por esto que en este proyecto se propone el uso de las proteínas inactivadas CRISPR-dCas9 y CRISPR-dCas12a (ya que solo se unen, pero no cortan el ADN) para la formación de nanoestructuras con ADN bicatenario más estables. Sin embargo, debido al gran tamaño de la secuencia de las dos proteínas (~10,000 pares de bases -pb- cada una), no se podría diseñar la dimerización en un solo plásmido ya que complicaría demasiado la transformación y por ende la síntesis de las proteínas. Esto es debido a que la eficiencia de transformación de las cepas disminuye de acuerdo con el aumento de tamaño de los plásmidos. Siendo menos eficiente un plásmido de 20,000 pb a un plásmido de 10,000 pb. Por lo que se propone producir por separado las proteínas con el uso del sistema de dimerización FKBP – FRB, químicamente inducido por rapamicina, el cual ha sido utilizado

ampliamente y ha sido estudiado a profundidad. Además, los dominios de dimerización FKBP y FRB son pequeños (~12 kDa), haciendo que no varíe tanto el tamaño del plásmido final, manteniendo de esta forma la eficiencia de transformación y la síntesis de las proteínas.

El objetivo de esta tesis es la de clonar y producir las proteínas para posteriormente, en otro trabajo, estudiar su dimerización con DNA. El lograr estas nuevas nanoestructuras de ADN bicatenario con las proteínas CRISPR-Cas9 y CRISPR-Cas12a podría generar nuevas herramientas de investigación y allanar el camino para aplicaciones únicas de interés en salud y biotecnología. Debido a que estas proteínas se pueden unir a diferentes secuencias de ADN, se podrían crear estructuras altamente personalizadas y bucles en el ADN genómico para estudiar la relación entre la arquitectura del genoma y expresión génica, o para posicionar proteínas involucradas en otros procesos intracelulares en formas definidas por el usuario. También se podrían realizar nanoestructuras tridimensionales que podrían contener y liberar medicamentos, se podrían realizar nanobiosensores o caracterización de proteínas.

Para esto se requiere primero del diseño, la síntesis, purificación y caracterización de todas las proteínas recombinantes dCas9 – FKBP, dCas9 – FRB, dCas12a – FKBP y dCas12a – FRB, en lo cual se enfocará resolver en este proyecto. Por lo que en este proyecto se clonaron los genes de las proteínas CRISPR – Cas fusionados a los dominios de dimerización (FKPB y FRB) mediante técnicas estándar de biología molecular para su producción recombinante en *E. coli*. Se purificaron por cromatografía de afinidad, diálisis, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión de tamaño y ultracentrifugación. Posteriormente se verificó su estructura mediante difracción de rayos X. Al final, se comprobó la dimerización de las proteínas en presencia de rapamicina mediante dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés).

2. INTRODUCCIÓN

Este proyecto se ubica dentro del campo multidisciplinario de la bionanotecnología, cuyo objeto de estudio es la aplicación tecnológica de bioestructuras con tamaño nanométrico (entre 1 y 100 nanómetros) (Ehud G., 2007). Una de sus ramas más importantes es la nanotecnología de ADN, que se ocupa del diseño, estudio y aplicación de estructuras sintéticas basadas en el ADN. Esta técnica aprovecha las propiedades físicas y químicas del ADN en lugar de la información genética que contiene (Seeman, 1982). Una de las ventajas principales de esta tecnología es que se puede programar con facilidad la unión de las bases nitrogenadas del DNA.

Dos de sus hitos importantes ocurrieron en la década de 1980 cuando Seeman inició la construcción de pequeñas estructuras de ADN monocatenario en 2D (**Figura 1A**) y a principios de los 2000 cuando Rothemund desarrolló la técnica de origami de ADN, la cual consta en plegar un templado de ADN con múltiples pequeños oligos de acuerdo con sus bases nitrogenadas para obtener una forma deseada hasta en 3D (**Figura 1B**). Desde entonces esta rama se ha mantenido en un continuo crecimiento y diversificación con el fin de buscar nuevas estrategias para construir novedosas estructuras más complejas y estables. Algunos ejemplos de las nanoestructuras se encuentran en las **Figuras 1C - F**.

Estas nanoestructuras han sido utilizadas en la caracterización y análisis de funciones de proteínas, posicionamiento dirigido de partículas y materiales, transportadores, biosensores, biomarcadores de enfermedades infecciosas, suministradores de fármacos y materiales, entre otras cosas (Becker & Boch, 2021). Sin embargo, se han visto algunas desventajas en su aplicación: se degradan fácilmente y se necesitan ensamblar a temperaturas no fisiológicas ya que se calientan a 90 °C, además el ADN monocatenario típicamente no está disponible en células vivas por lo que su ensamble *in vivo* es complicado y su alcance aún es limitado (Praetorius, F., & Dietz, H., 2017).

Para resolver estos problemas desde hace algunos años se ha propuesto la incorporación de otros tipos de bloques de construcción a las nanoestructuras. Una de las propuestas más importantes son las proteínas, ya que contienen propiedades fisicoquímicas y estructurales que podrían aumentar la estabilidad, ampliar el potencial de aplicación de la nanotecnología de ADN y generar nuevas vías de investigación (Niemeyer, C. M., 2005). Aunque tal combinación presenta nuevos desafíos, como equilibrar el autoensamblaje de dos macromoléculas diferentes, aprovechar ventajosamente su combinación sinérgica generaría beneficios estratégicos para la fabricación de

nanoestructuras. Como resultado de esta combinación, las proteínas pueden alinear espacialmente el ADN en geometrías específicas y preservar la topología del ADN mediante el recubrimiento y la rigidez. Además, pueden establecer interacciones fuertes y específicas con el ssDNA y, en particular, con los dúplex de ADN (dsDNA). Esto abre la oportunidad de incorporar dsDNA en la nanotecnología de ADN actual, que a su vez solo se basa en ssDNA (Hernandez-Garcia, 2021).

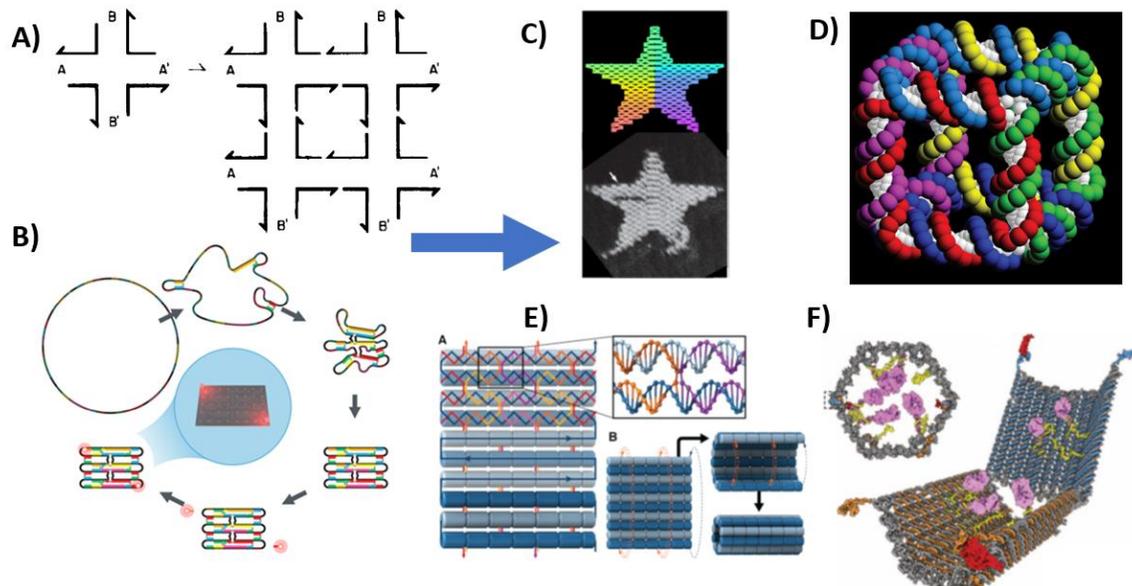


Figura 1. A) El concepto central de la nanotecnología de ADN estructural: combinar ADN ramificado con extremos cohesivos para crear nanoestructuras (Seeman, 1982); **B)** Esquema de la formación de origami de ADN basado en Rothenmud, 2006. (Hell *et. al.*, 2015) Un templado largo de ADN monocatenario es plegado en la conformación deseada por pequeñas secuencias de ADN llamadas grapa. Ejemplos de nanoestructuras más complejas: **C)** Diagrama de cruce de la estrella (arriba) y AFM de alta resolución (abajo, tomado por E. Winfree) (Rothenmund, 2006); **D)** Una molécula de ADN con la conectividad de un cubo (Chen & Seeman, 1991) (Seeman, 2003); **E)** Nanotubos de ADN origami (Berengut *et al.*, 2019); **F)** Nanorobot de ADN origami diseñado para abrirse en respuesta a proteínas específicas (Douglas *et al.*, 2012)

3. ANTECEDENTES

3.1 Nanoestructuras de ADN con proteínas

La construcción de nanoestructuras de ADN con proteínas ha mostrado como ventaja contra las nanoestructuras de ssDNA, no requerir concentraciones elevadas (y suprafiológicas) de cationes divalentes y poder formar estructuras altamente específicas sin hibridación a alta temperatura. Debido a estas ventajas, desde el comienzo de la década del 2010 se ha comenzado a experimentar con proteínas cada vez más complejas para realizar este tipo de nanoestructuras. El objetivo de experimentar con diferentes tipos de proteínas es poder ampliar las herramientas biotecnológicas para generar tamaños programables y simetrías novedosas con una interfaz definida rígida para una mayor estabilidad y aumentar los campos de aplicación de las nanoestructuras (Stephanopoulos, 2020). Las aplicaciones más esperadas para estas nanoestructuras se encuentran en los campos de la nanomedicina, la biología sintética, la biología estructural y la biofísica, los nanomateriales bioinspirados y la nanorobótica. Como ejemplos se encuentran el desarrollo de sistemas de administración de fármacos, el estudio de los mecanismos de ensamblaje de los virus, los nanocables para nanoelectrónica y como un ejemplo de aplicación potencial más avanzada se encuentra la fabricación de nanorobots (Hernandez-Garcia, 2021). En 2017, Praetorius F. y Dietz H. propusieron el uso de ADN bicatenario y proteínas efectoras TAL dimerizadas para fortalecer las nanoestructuras. Lo cual es un gran cambio de paradigma, tomando en cuenta que anteriormente sólo se ocupaba ADN monocatenario sin proteínas. El por qué se propuso utilizar dos proteínas dimerizadas se explica en cómo funciona este novedoso plegamiento. En primer lugar, se realiza la unión de las proteínas en dos sitios diferentes del templado de ADN y como estas dos proteínas están unidas entre sí en consecuencia contraen el ADN dándose así su plegamiento. Es decir, sin la dimerización de las proteínas no se plegaría el ADN bicatenario, puesto que utilizan la fuerza de la dimerización para mantenerse plegadas (Praetorius, F., & Dietz, H., 2017).

Las efectoras TAL(en español efectoras de tipo activador de la transcripción) son proteínas que son secretadas por patógenos bacterianos en las células vegetales, las cuales reconocen promotores específicos en el ADN e inducen la activación de ciertos genes de la planta, facilitando así la infección bacteriana (Mak *et al.*, 2013). Sin embargo, hace unos años se descubrió que contienen dominios de unión al ADN que se pueden diseñar para reconocer nucleótidos específicos y cuando se fusionan con un dominio nucleasa (FoKI) pueden inducir rupturas bicatenarias. Por lo que esta fusión se ha utilizado

en la edición genética con el nombre de TALEN (en español se llaman nucleasa de actividad similar a activador de transcripción) pero se han enfrentado con grandes obstáculos al momento de la aplicación, debido a la laboriosa tarea de producir múltiples proteínas que detecten secuencias diferentes de ADN. El mismo obstáculo sucedió en este artículo de Praetorius, F., & Dietz, H., 2017, ya que como se observa en la **Figura 2**, se tuvieron que producir 12 diferentes proteínas TAL dimerizadas para que reconocieran una secuencia de ADN diferente cada una, por lo que se menciona como desventaja de que se requiere producir múltiples dímeros de proteínas para poder reconocer y unir varios sitios de unión del ADN, lo cual lleva tiempo y es costoso.

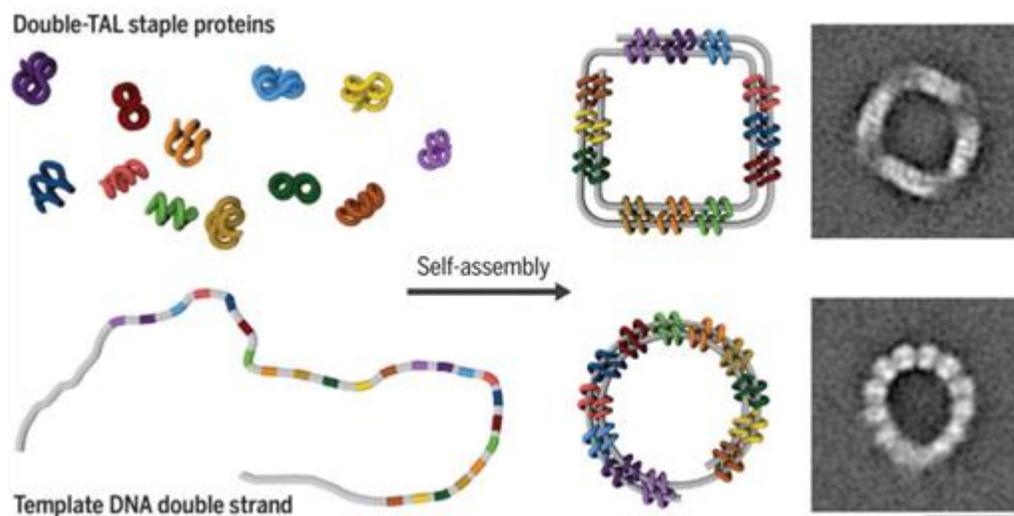


Figura 2. Autoensamblaje de nanoestructuras híbridas de ADN con proteínas diméricas TAL expresadas genéticamente (Praetorius, F., & Dietz, H., 2017).

Para resolver estos problemas, recientemente se descubrieron las proteínas CRISPR – Cas9 y CRISPR – Cas12a como potenciales editoras genéticas y mostraron tener una mayor sensibilidad y facilidad de manipulación. Desde entonces estas proteínas se han utilizado en diversos proyectos para mejorar las aplicaciones que ya tenían las herramientas de edición genética, además de explorar otros campos que no se habían tratado hasta ese entonces, como por ejemplo el de la bionanotecnología y la creación de bionanomateriales. En específico, en este caso, nos enfocaremos en el desarrollo de una nueva herramienta para la tecnología de ADN origami.

3.2 Sistema CRISPR – Cas9 y CRISPR – Cas12a

Los sistemas CRISPR-Cas (llamados así por las siglas en inglés Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) son sistemas inmunes adaptativos (adquiridos) de las células procariotas que almacenan en su memoria encuentros con ADN extraño con el fin de reconocer e inactivar secuencias afines (Koonin & Makarova, 2019). Entre estos sistemas se encuentran CRISPR-Cas9 y CRISPR-Cas12a, que se ha reconocido recientemente su utilidad como herramientas de edición genética con gran eficiencia, precisión y facilidad de programación. La aplicación de estos sistemas ya ha revolucionado varias áreas de investigación que van desde la biomedicina a la biotecnología o la biología sintética. Como por ejemplo se ha utilizado Cas9 para la corrección de mutaciones que causan enfermedades genéticas tales como la distrofia muscular de Duchenne (Long *et al.*, 2018). Cas12a se utilizó para el desarrollo de una plataforma de diagnóstico viral DETECTR (Broughton *et al.*, 2020). También se han obtenido imágenes del genoma combinando dCas con sondas fluorescentes para obtener imágenes genómicas (Chen *et al.*, 2013).

En este proyecto se propone utilizar los sistemas CRISPR-dCas9 y CRISPR-dCas12a, los cuales son las versiones catalíticamente inactivas que sólo se unen al ADN pero no lo cortan. Estos sistemas provienen de *Streptococcus pyogenes* (Sp) y de *Acidaminococcus sp.* (As), con un tamaño de ~158 kDa y ~152 kDa respectivamente. Ambos están formados por una proteína dCas (llamada así por sus siglas en inglés dead CRISPR-associated protein) y un ARN guía que contiene una secuencia CRISPR, la cual se utiliza para reconocer y unirse a secuencias específicas de ADN (Amitai & Sorek, 2016).

En la **Figura 3 A)** y **B)** se observa que las proteínas dCas comparten una forma general similar de una estructura bilobulada, formada por el lóbulo de reconocimiento REC y el lóbulo de actividad nucleasa NUC (el cual está inactivado). Cada lóbulo contiene diferentes dominios que les permiten realizar su actividad correspondiente. Sin embargo, el lóbulo NUC es diferente para dCas9 y dCas12a. En el inciso **A)** se observa que para dCas9 el lóbulo NUC está formado por dos dominios nucleasas, los cuales tienen las mutaciones que generan la inactivación catalítica: H840A, que se encuentra en el dominio HNH y D10A para el dominio RuvC. (Nishimasu *et al.*, 2014). En el **B)** se ve que para dCas12a el lóbulo NUC se encuentra estructurado por sólo un dominio nucleasa RuvC (dividido en partes discontinuas RuvC I-III), el cual contiene la mutación D908A que es responsable de la inactivación catalítica. Cabe destacar que ambas proteínas contienen la región PI (PAM Interacting) que interactúa con la secuencia PAM (Stella *et al.*, 2017). La secuencia de ADN

denominada PAM (motivo adyacente del protoespaciador) sirve como señal de unión para las proteínas dCas y se encuentra dentro del ADN no objetivo (Knight *et al.*, 2015) SpCas9 reconoce la secuencia PAM 5'-NGG-3' y con mucho menos especificidad la 5'-NAG-3' ("N" es cualquier nucleobase) (Nakade *et al.*, 2017). Y AsCpf1 reconoce la PAM 5'-TTTN-3' (Fonfara *et al.*, 2016).

El ARN guía de la dCas9 se compone de un CRISPR-ARN (crARN) y un crARN trans activado (tracrARN). Sin embargo, en este proyecto se utilizó un *single guide RNA* (sgARN) que está compuesto de crARN, un conector y tracrARN; y tiene una longitud de ~100 nt (Nishimasu *et al.*, 2014). El uso de sgARN es para simplificar los protocolos y hacer más eficiente el sistema. En el caso de dCas12a se utilizó un ARN guía que solo consiste en el crARN y tiene una longitud de ~44 nt (Fonfara *et al.*, 2016).

En la **Figura 3, inciso C)** se observa que el proceso de unión de los sistemas CRISPR-dCas9 y CRISPR-dCas12a al ADN bicatenario se divide en dos fases. En la primera fase, las proteínas dCas reconocen al ARN guía y cambian su conformación para el reconocimiento de la secuencia PAM (Sternberg *et al.*, 2014; Swarts *et al.*, 2017). En la segunda fase las proteínas escanean el ADN objetivo potencial desde el extremo 3' al 5' buscando la secuencia PAM apropiada y cuando la encuentran comienzan la hibridación ARN:ADN. (Wang *et al.*, 2016). Si el híbrido ARN:ADN tiene errores de complementariedad en los nucleótidos cercanos a la PAM (5-10 nucleótidos), la proteína dCas se separa del templado. En caso de las Cas9 y Cas12a catalíticamente activas, la tercera fase es el corte del ADN y ocurre de diferente manera, para Cas9 se producen extremos romos y en Cas12a extremos cohesivos (Zetsche, *et al.*, 2015; Swarts *et al.*, 2017).

Con todo lo anteriormente mencionado, se puede observar que existen diferencias relevantes entre las dos proteínas, las cuales se mencionan a modo de resumen en la **Tabla 1**. Una de las diferencias más importantes, y por la cual se escogió utilizar las dos proteínas en este proyecto en vez de una sola, es que cada proteína reconoce una secuencia PAM diferente, lo que, en teoría, si se uniera con un mismo templado de ADN, las probabilidades de su correcta unión aumentarían debido a que no habría competición de unión al mismo PAM. Al contrario, si se utilizara una sola proteína, por ejemplo dCas9, entonces las proteínas competirían por unirse a la misma PAM de dos secuencias diferentes, lo cual disminuiría la especificidad de unión.

Sin embargo, dado que la eficiencia de producción disminuye con el aumento del tamaño del plásmido y los de dCas9 y dCas12a son muy grandes (~10,000 pb c/u), la idea

ANTECEDENTES

de dimerizar las dos proteínas en un mismo plásmido fue descartada. En vez de eso, en este proyecto se decidió diseñar las dos proteínas por separado con un dominio de pequeño tamaño (~30 pb c/u) para no generar gran diferencia en el tamaño del plásmido en el momento de la transformación en *E. coli*. Estos pequeños dominios se podrían dimerizar por inducción química, para al final poder obtener las proteínas diméricas. Es así como se llegó al sistema de dimerización FKBP-Rapamicina-FRB.

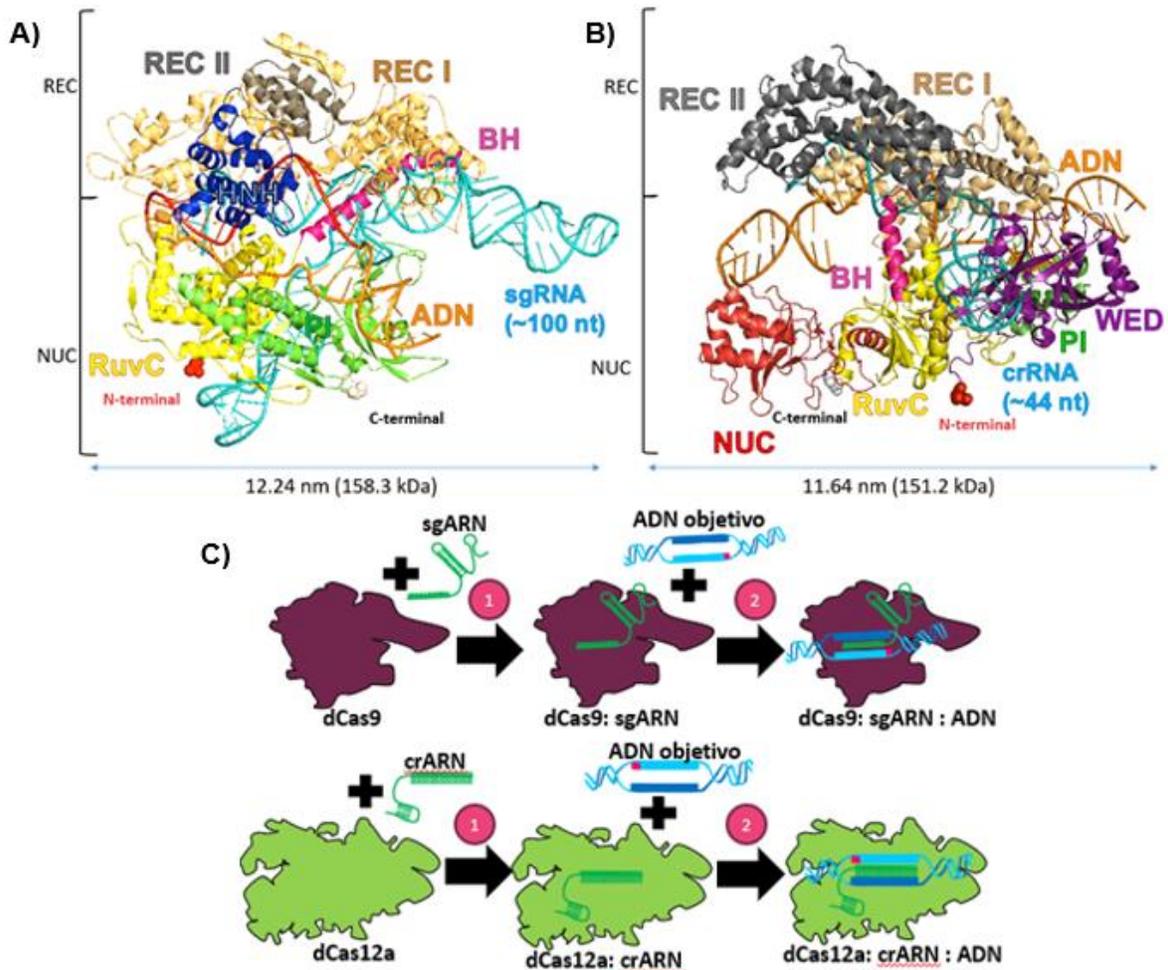
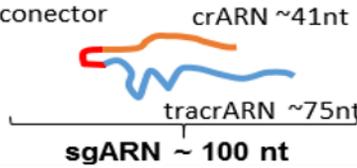


Figura 3. Estructuras de los complejos: **A)** SpCas9/ARN guía unido al ADN objetivo (PDB: 5F9R) y **B)** AsCas12a/crARN unido al ADN objetivo. (PDB: 5KK5). **C)** Mecanismo de unión de los complejos dCas9/sgARN y dCas12a/crARN con el ADN objetivo.

Tabla 1. Principales diferencias entre los sistemas CRISPR-Cas9 y Cas12a.

	CRISPR- Cas9	CRISPR- Cas12a
Tamaño de proteína	~1000 – 1600 aminoácidos	~ 1300 aminoácidos
ARN guía		
Secuencia PAM	5' - (SS) – NGG- 3' Rico en G, N es cualquier nucleótido	5' – TTTN – (SS)- 3' Rico en T, N es cualquier nucleótido
Secuencia semilla (SS)	~ 10 nt	~ 5 nt
Sitios nucleasa	Dos sitios nucleasa: Dominios HNH y RuvC	Un sitio nucleasa: dominio RuvC
Tipo de corte (Cuando está activa)	Extremos romos: 	Extremos Cohesivos 

3.3 Sistema de heterodimerización FKBP – Rapamicina – FRB

El sistema FKBP – Rapamicina – FRB, es un sistema de dimerización que se induce químicamente (CID, por sus siglas en inglés Chemically Induced Dimerization), el cual está conformado por un dimerizador químico, en este caso es la rapamicina que induce la dimerización de dos dominios: el dominio de unión a FK506 (FKBP) y el dominio de unión a rapamicina (FRB) FKBP12. Este sistema es altamente conocido en la investigación biotecnológica en una variedad de aplicaciones, como para dimerizar proteínas recombinantes, controlar la localización de proteínas, manipular las vías de señalización e inducir la activación de proteínas (Inobe & Nukina, 2016),

El sistema está unido por tres componentes: El primer componente FKBP12 (FK506 binding protein 12) es un dominio que actúa como un correceptor para el compuesto FK506 y Rapamicina. Tiene un peso molecular de 12 kDa, y su estructura secundaria está conformada por láminas beta principalmente. El segundo componente es el dominio de unión FRB (FKBP-Rapamycin-Binding domain, dominio de unión a FKBP-Rapamicina) y tiene un tamaño de 11.7 kDa. Su estructura secundaria está conformada por hélices alfa

principalmente. Su denominación refleja el hecho de que la rapamicina debe unirse primero a FKBP12 y después a FRB (Choi *et al.*, 1996). Y la rapamicina es el tercer componente, el cual es un compuesto que exhibe propiedades antifúngicas, antitumorales, e inmunosupresoras y es aislado de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* (Tong & Jiang, 2015). Este compuesto es una molécula hidrofóbica por lo que es insoluble en agua, su fórmula química es $C_{51}H_{79}NO_{13}$ y tiene un peso molecular de 914,2 g/mol.

En la **Figura 4** se observa la estructura cristalina del complejo ternario de FRB-rapamicina-FKBP12 y un acercamiento a la estructura química de la rapamicina. En cuanto a sus interacciones, FKBP12 y FRB se unen con la rapamicina del lado de su C terminal. Ambos dominios tienen amplias interacciones hidrofóbicas con la Rapamicina, además FKBP12 genera varios puentes de hidrógeno clave con la Rapamicina. Experimentalmente se ha demostrado que el complejo es estable solo en presencia de rapamicina, ya que los dominios interactúan fuertemente con este complejo y tienen pocas interacciones entre sí. Las interacciones que se han logrado observar entre dominios son un puente de hidrógeno y un puente salino, sin embargo son muy limitadas y poco estables (Chaurasia *et al.*, 2013).

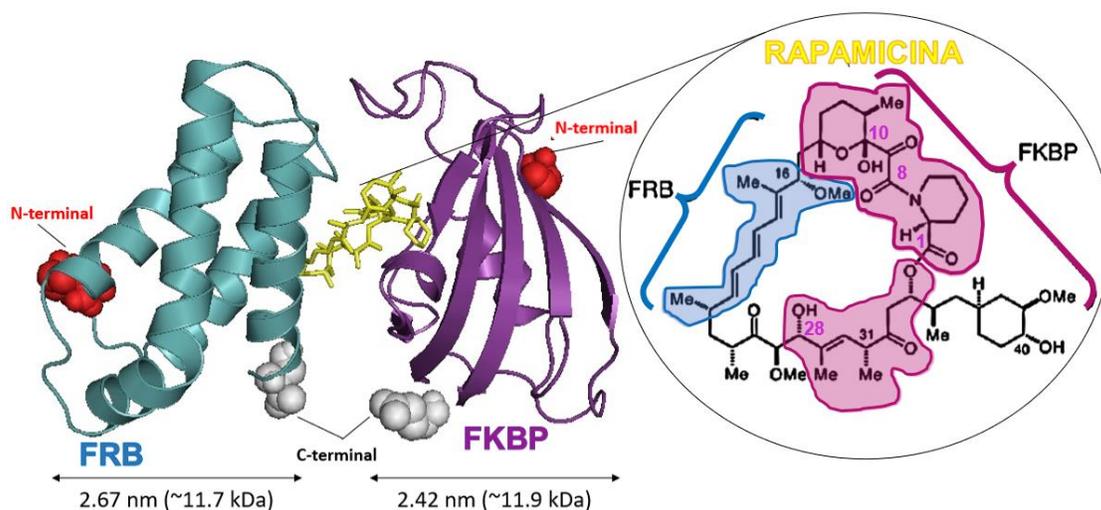


Figura 4. Estructura del complejo ternario FRB– Rapamicina– FKBP. (PDB: 1FAP. Método: Difracción por Rayos-X; Resolución: 2.7 Å) y estructura química de rapamicina con sus interacciones con FKBP y FRB (Lee, S. and Lee, H., 2016).

En la **Figura 5** se muestra el mecanismo de unión, el cual se puede dividir en dos caminos: el primero es la unión de Rapamicina a FRB, o, por el contrario, primero a FKBP12, para después unirse a la otra proteína. Comparando las constantes de

disociación, el camino más propenso es la unión con FKBP inicialmente, y luego a FRB (Banaszynski *et. al.*, 2005).

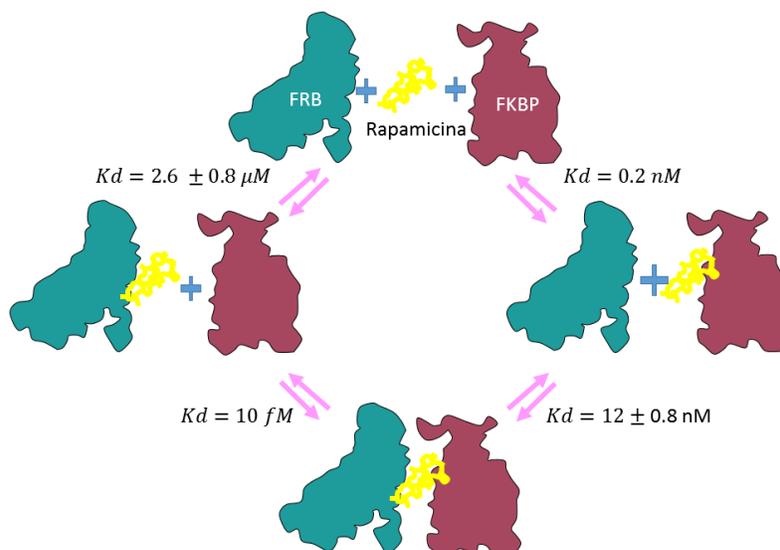


Figura 5. Mecanismo cinético de unión del complejo ternario FRB – Rapamicina – FKBP.

En la **figura 6**, se muestra un ejemplo destacable del uso de este sistema. Esta investigación es parte de nuestro grupo de investigación y se obtuvo una proteína dCas12a(FKBP) que dimeriza químicamente con un polipéptido tribloque C-S₁₀ (FRB) lo que desencadena el empaquetamiento de secuencias de ADN diana. Lo novedoso de este empaquetamiento es que se puede redirigir fácilmente hacia diferentes secuencias de ADN mediante un diseño simple del crRNA sin necesidad de la manipulación de los dominios de proteínas. La aplicación de este empaquetamiento de ADN guiado por CRISPR-dCas12a además de encapsular y proteger el material genético de la degradación, podría ser ayudar a desarrollar bionanomateriales programables con aplicaciones en biotecnología, así como andamios viromiméticos para mejorar nuestra comprensión del autoensamblaje viral (Calcines-Cruz *et al.*, 2021)

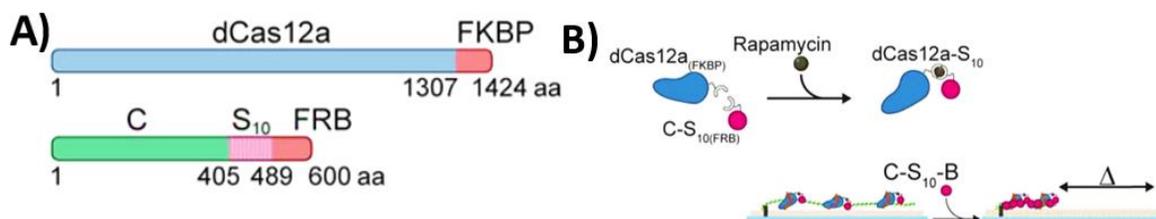


Figura 6. A) Representación esquemática de dCas12a(FKBP) y C-S10(FRB) y su dimerización mediante rapamicina para formar el complejo dCas12a-S10. **B)** Representación esquemática que demuestra que decorar el ADN con dCas12a-S10 acelera el empaquetamiento del ADN en relación con la decoración con dCas12a (FKBP) solo.

En base a lo anterior se puede observar que la fusión de dCas12a con FKBP y su unión al ADN es posible y que tiene muchas oportunidades de ser aplicada en otros campos de la investigación. Por lo que en este proyecto, se desea trabajar en conjunto con nuestro grupo de investigación para rescatar esta herramienta y extenderla a la fabricación de nanoestructuras de ADN bicatenario con dCas9 y dCas12a fusionadas a FKBP y FRB, ya que esta idea sigue sin ser explorada hasta el momento. En la **figura 7** se observa una representación esquemática de todos los pasos a realizar para poder llegar a la nanoestructura deseada. En el inciso **A)** se contempla el diseño, producción, purificación y ensayos de caracterización de las proteínas recombinantes dCas9– FKBP, dCas9– FRB, dCas12a– FKBP, dCas12a– FRB. Así como también se contempla la síntesis del templado de ADN y del diseño de los ARN guías. En el inciso **B)** se encuentran los ensayos de dimerización y de unión al ADN para los cuatro sistemas los que se podrían realizar con las proteínas de fusión. Y en el inciso **C)** se encuentran los ensayos de creación de nanoestructuras ya con el complejo formado.

Cabe destacar que el inciso **A)** y parte del inciso **B)** son los que se enfocará realizar en este proyecto para que en un futuro trabajo se realicen los siguientes pasos para llegar al inciso **C)** que es la creación de estas nanoestructuras. El lograr estas nuevas nanoestructuras de ADN bicatenario con las proteínas CRISPR-Cas9 y CRISPR-Cas12a podría generar nuevas herramientas de investigación y allanar el camino para aplicaciones únicas de interés en salud y biotecnología. Debido a que estas proteínas se pueden unir a diferentes secuencias de ADN, se podrían crear estructuras altamente personalizadas y bucles en el ADN genómico para estudiar la relación entre la arquitectura del genoma y expresión génica. También se podrían realizar nanoestructuras tridimensionales que podrían contener y liberar medicamentos, nanobiosensores o caracterización de proteínas.

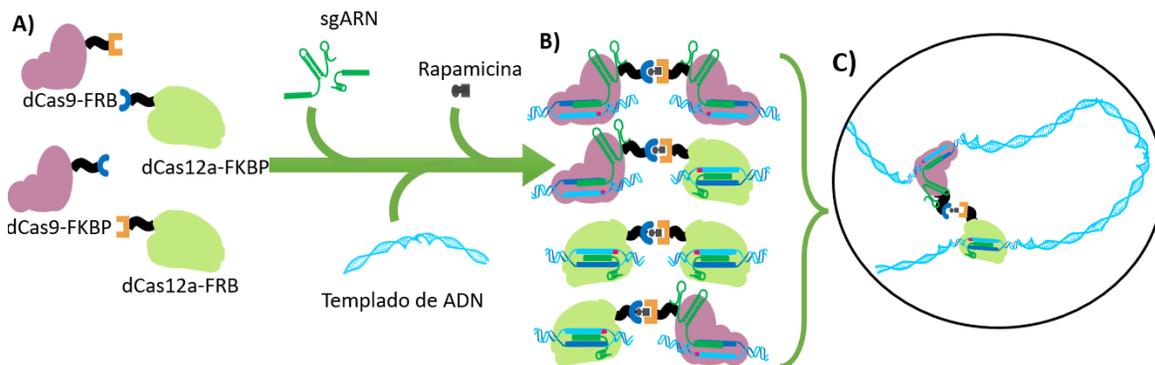


Figura 7. Representaciones esquemáticas de las proteínas de fusión así como su fusión con rapamicina y la unión al ADN. **A)** Representación de las proteínas dCas9- FKBP, dCas9 – FRB, dCas12a – FKBP, dCas12a – FRB. **B)** Representación del complejo de proteínas CRISPRs-dCas unido al molde de ADN **C)** Ejemplo de nanoestructura de dsADN con las proteínas CRISPR-dCas9 y CRISPR-dCas12a.

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4. JUSTIFICACIÓN

Las nanoestructuras de ADN origami se han aplicado en varios campos de investigación, como en la caracterización y análisis de funciones de proteínas, biosensores de ácidos nucleicos y proteínas, entre otras cosas. Pero han tenido limitaciones debido a que se degradan fácilmente y se ensamblan a temperaturas no fisiológicas. Por lo que en este proyecto, siendo una extensión del trabajo de Calcines-Cruz, *et al.*, 2021, se propone atender este problema mediante la realización de nanoestructuras con ADN bicatenario y las proteínas CRISPR-dCas9 y CRISPR-dCas12a dimerizadas químicamente con FKBP – rapamicina – FRB en sus diferentes combinaciones: dCas9– FKBP, dCas9– FRB, dCas12a– FKBP, dCas12a – FRB. Esta propuesta tiene como ventaja de que el ADN bicatenario es más estable, las proteínas producidas se podrían unir a cualquier ADN objetivo cambiando solo el ARN que las guía, además de que la dimerización sería muy específica y su diseño facilitaría la amplia producción de las proteínas recombinantes. Todo esto se traduciría en estructuras más estables que no requerirían hibridación a altas temperaturas, se facilitaría la formación de las nanoestructuras y se reduciría el tiempo y costo en la realización de estas. El lograr estas nuevas nanoestructuras de ADN bicatenario con las proteínas CRISPR-Cas9 y CRISPR-Cas12a podría generar nuevas herramientas de investigación y allanar el camino para aplicaciones únicas de interés en salud y biotecnología. Para avanzar en esto es necesario lograr la clonación y la producción de las proteínas correspondientes.

5. HIPÓTESIS

Si las proteínas dCas9 y dCas12a, que tienen la capacidad de unirse al ADN de forma específica se fusionan con el sistema FKBP-Rapamicina-FRB tendrán la capacidad de dimerizarse entre ellas además de mantener su conformación estructural lo que se traduciría en mantener su característica de unión al ADN agregando ARN guía que las dirija.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Diseñar, clonar y producir las proteínas CRISPR – dCas9 y dCas12a fusionadas a dominios de dimerización (FKBP y FRB).

6.2 Objetivos particulares

1. Diseñar y clonar las secuencias dCas9-FKBP, dCas9-FRB, dCas12a-FKBP y dCas12a-FRB en plásmidos de expresión recombinante.

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. Expresar las proteínas a partir de los plásmidos clonados.
3. Purificar las proteínas.
4. Caracterizar bioquímicamente las proteínas fusionadas mediante difracción circular, así como sus eventos de dimerización

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Vectores

Los plásmidos utilizados en este proyecto fueron proporcionados por el Dr. Ilya Finkelstein de la Universidad de Austin, Texas y Tom Well (Universidad de Stanford). Para la expresión de *S. pyogenes* dCas9 se utilizó el vector *pMJ806* de Jennifer Doudna (*Addgene plasmid # 39312*; *RRID:Addgene_39312*). El cual tiene las dos mutaciones necesarias en los dominios nucleasa para inactivar la proteína (H840A, en HNH y D10A en RuvC), una etiqueta de histidinas 6xHis, Maltose Binding Protein (MBP) y un sitio de reconocimiento para la proteasa TEV. Además, contiene resistencia para el antibiótico kanamicina (**Mapa del vector en Figura 39, Anexo 1**). Para dCas12a se utilizó el vector *His6-Twin Strep-SUMO-AsCpf1-3xFLAG* de Jennifer Doudna (*Addgene plasmid # 113430*; *RRID:Addgene_113430*). Con la mutación en el dominio nucleasa para inactivar la proteína (D908A en RuvC), una etiqueta de histidinas 6xHis / Twin Strep Tag y un sitio de reconocimiento para la proteasa SUMO. Además, contiene resistencia a la ampicilina (**Mapa del vector en Figura 40, Anexo 1**). Aparte se utilizó el vector *TW16-pGEX-2T-FKBP* para la expresión de FKBP12 (FKBP12 gene & protein; Uniprot #Q3V793) y el vector *TW16 pGEX-2T FRB* para la expresión del dominio FRB (Jie Chen. *Addgene plasmid # 68726*; *RRID: Addgene_68726*). Ambos vectores son derivados del plásmido pGEX-2T y poseen resistencia a Ampicilina (**Mapas del vector se encuentran en Figuras 41 y 42, Anexo 1**).

7.2 Cepas bacterianas

En primer lugar, se ocuparon las cepas competentes de *E. coli* DH5 α y DH10 β para clonar los plásmidos de los dominios FKBP/FRB y las proteínas CRISPR-dCas9/ CRISPR-dCas12a respectivamente. Después de su fusión, se utilizó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión de las proteínas recombinantes dCas9– FKBP, dCas9– FRB, dCas12a– FKBP y dCas12a– FRB mediante su inducción con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

7.3 Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos: triptona (Oxoid), cloruro de sodio (NaCl, Bio Basic Canada Inc.), extracto de levadura (Sigma), bacto.agar (Sigma), glicerol (Sigma), cloruro de potasio (KCL, Sigma), Tris-HCl (Sigma), IPTG (Sigma), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Sigma), fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄, Sigma), fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄, Sigma), ampicilina (Gold Biotechnology), kanamicina (Gold Biotechnology), cloruro de Magnesio (MgCl₂, Sigma), imidazol (Sigma), ácido 4- (2-hidroxiethyl) -1-piperazina-metanosulfónico (HEPES, Sigma) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Sigma).

7.4 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados son Luria Bertani (LB), LB-agar y TERRIFIC BROTH. La concentración stock de los antibióticos utilizados es de 50 mg/ml para Ampicilina y 100 mg/ml para Kanamicina. La preparación se ha hecho de acuerdo con los protocolos escritos en la página de “Cold Spring Harbor Protocols” 2022.

7.5 Buffers para la purificación de dCas9 – FKBP y dCas9 – FRB.

1. **Amortiguador de Lisis:** Tris-HCl 20mM, pH=8; NaCl 500mM; Imidazol 10mM; PMSF 1mM.
2. **Amortiguador de Lavado:** Tris-HCl 20mM, pH=8; NaCl 500mM; Imidazol 25mM.
3. **Amortiguador de Elución:** Tris-HCl 50mM, pH=8; NaCl 500mM; imidazol 250mM.
4. **Amortiguador de Diálisis:** HEPES-KOH 20mM, pH=7.5; KCl 150mM; EDTA 1mM; MgCl₂ 5mM; 10% glicerol; DTT 1mM.
5. **Amortiguador IEX A:** HEPES-KOH 20mM, pH=7.5; KCl 100mM.
6. **Amortiguador IEX B:** HEPES-KOH 20mM, pH=7.5; KCl 1M.
7. **Proteasa TEV:** 1.2 mg/ml
8. **Amortiguador SEC:** HEPES-KOH 20mM, pH=7.5; KCl 500mM; 10% glicerol.

7.6 Buffers para la purificación de dCas12a – FKBP y dCas12a – FRB.

1. **Amortiguador de Lisis:** Tris-HCl 20mM, pH=8; NaCl 1M; Imidazol 10Mm
2. **Amortiguador de Lavado:** Tris-HCl 20mM, pH=8; NaCl 1M; Imidazol 25mM.
3. **Amortiguador de Elución:** Tris-HCl 50mM, pH=8; NaCl 1M; Imidazol 250Mm; EDTA 1mM

4. **Amortiguador de Diálisis:** HEPES-KOH 20mM, pH=7.2; KCl 150mM; MgCl₂ 5mM; 10% glicerol; DTT 2mM.
5. **Amortiguador IEX A:** HEPES-KOH 20mM, pH=7.2; KCl 100mM.
6. **Amortiguador IEX B:** HEPES-KOH 20mM, pH=7.2; KCl 2M.
7. **Proteasa SUMO:** 1mg/ml
8. **Amortiguador SEC:** HEPES-KOH 20mM, pH=7.5; KCl 500mM; 10% glicerol.

7.7 RESUMEN DE LA METODOLOGÍA

En la **Figura 8** se muestra como el proyecto se dividió en las siguientes etapas: Primero se realizó el diseño de dCas9 y dCas12a fusionadas a FKBP y FRB. Luego se clonaron los plásmidos y se comprobó la secuencia. Después se transformaron las cepas de *E. coli* y se indujeron con IPTG para la expresión de las proteínas, posteriormente se realizó la purificación y caracterización de cada una de ellas por dicróismo circular y ensayo de unión a la Rapamicina por DLS. Posteriormente se realizó la obtención del ADN objetivo y del ARN guía para realizar el Ensayo de Unión al ADN (EMSA).

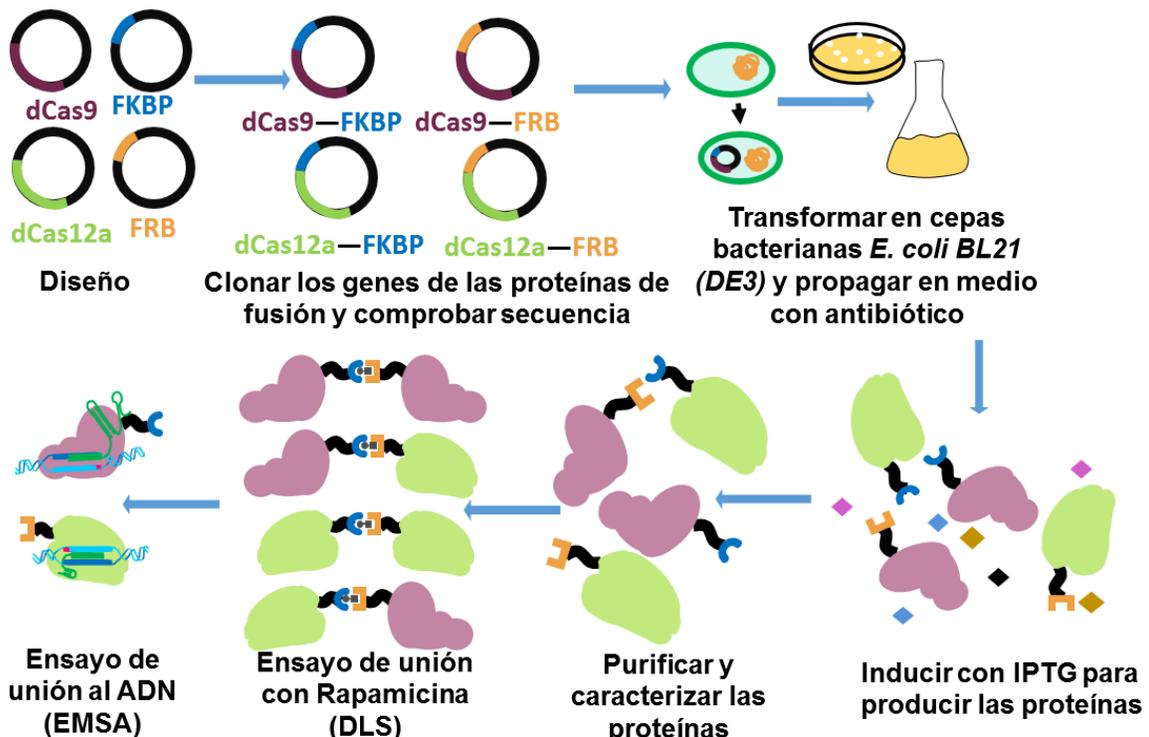


Figura 8. Diagrama del flujo de trabajo desarrollado en este proyecto.

7.8 Diseño de las proteínas de fusión recombinantes

Para el diseño de las proteínas CRISPR-dCas fusionadas a los dominios de unión FKBP o FRB, se consideró tener el siguiente orden de secuencia en el plásmido: **Proteína dCas9 o dCas12a – conector – dominio FKBP o FRB**. El “conector” o “linker” es una secuencia que une a las proteínas y da varias ventajas para la producción y construcción de proteínas de fusión estables, ya que permite la actividad biológica de las proteínas e incrementa su expresión. En este caso, siendo una extensión de su proyecto, se decidió utilizar el mismo conector que en el artículo de Calcines-Cruz, *et. al*, 2021 el cual cuenta con 9 aminoácidos, variando la secuencia con Alanina (A), Glicina (G), Serina (S) y Arginina (R): **AAGGSGRGG**. Debido a que en su artículo presentó una buena estabilidad en el caso de dCas12a – FKBP. Para el sitio de colocación del conector se tomaron en cuenta la estructura cristalográfica y las interacciones descritas en la literatura. En el caso de los dominios se encontró que la mejor vía de unión es por los sitios N-terminales de ambos dominios; ya que se encuentran más alejados y existe menor probabilidad de contacto con la Rapamicina (Choi et al., 1996). Para las proteínas dCas9 y dCas12a, el conector se puede colocar tanto en el C-terminal como en el N-terminal, ya que los sitios terminales están a la misma distancia uno del otro (Vojta et al., 2016), pero en este caso, la etiqueta de histidinas 6xHis se encuentra en el sitio N-terminal por lo que se decidió en este proyecto localizar el conector en el C-terminal para ambas proteínas.

Para incorporar la secuencia conectora sin tener otros aminoácidos de más entre las proteínas dCas y los dominios de dimerización, se utilizó la misma estrategia que en Calcines-Cruz, *et al.*, 2021 la cual es dividir la secuencia en dos partes: los primeros 7 aminoácidos (**AAGGSGR**) colocarlos en el plásmido de las proteínas CRISPR-Cas y los últimos 2 aminoácidos (**GG**) en los dominios FRB y FKBP (**Figura 9**). En ambos casos, al final de la parte de la secuencia conectora se debería de tener un sitio de unión de una enzima de restricción para poder digerir y obtener el plásmido final con las proteínas dCas unidas por un conector a los dominios de dimerización.

MATERIALES Y MÉTODOS

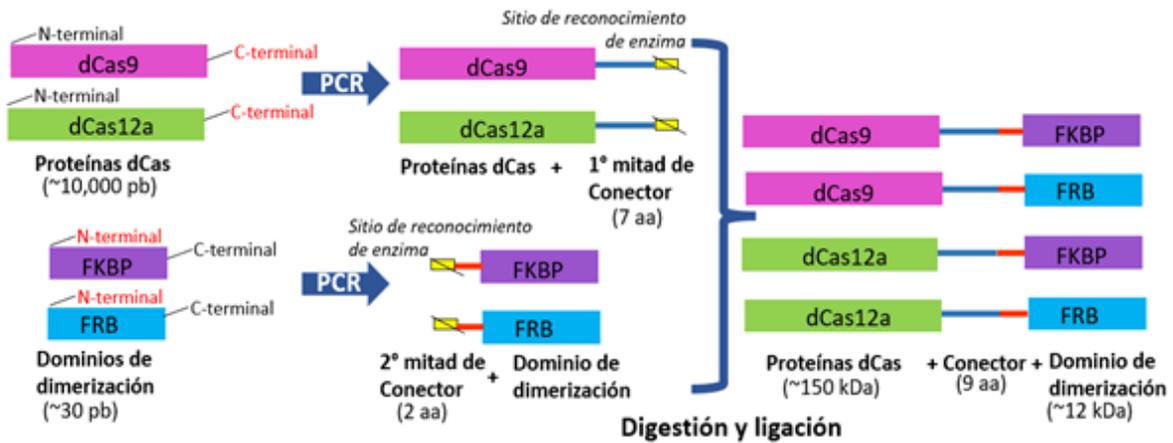


Figura 9. Esquema por bloques del diseño de las proteínas producidas.

Para obtener esto se diseñaron oligonucleótidos que funcionaran como cebadores en PCR con el fin de amplificar dos segmentos de ADN con las dos partes de la secuencia conectora. Después estas partes de la secuencia se unieron mediante una serie de digestiones y ligaciones para obtener el plásmido final.

Los oligos para dCas9 y dCas12a (**Figura 10. A**) se diseñaron con las siguientes modificaciones: quitar el codón de paro al final de las proteínas, colocar parte de la secuencia conectora y agregar un sitio de reconocimiento de una enzima de restricción. Estas enzimas fueron KpnI (GGTACC) y NotI (GCGGCCGC) para dCas9; y XbaI (TCTAGA) y NotI (GCGGCCGC) para dCas12a. (**Revisar oligonucleótidos en Tabla 8, Anexo 1**) Para FRB o FKBP (**Figura 10. B**) se consideró el mismo sitio de reconocimiento de la enzima de restricción NotI, se agregó la otra parte del conector (GG) y un codón de paro al final para la hora de la amplificación. (**Revisar oligonucleótidos en Tabla 9 en Anexo 1**)

MATERIALES Y MÉTODOS

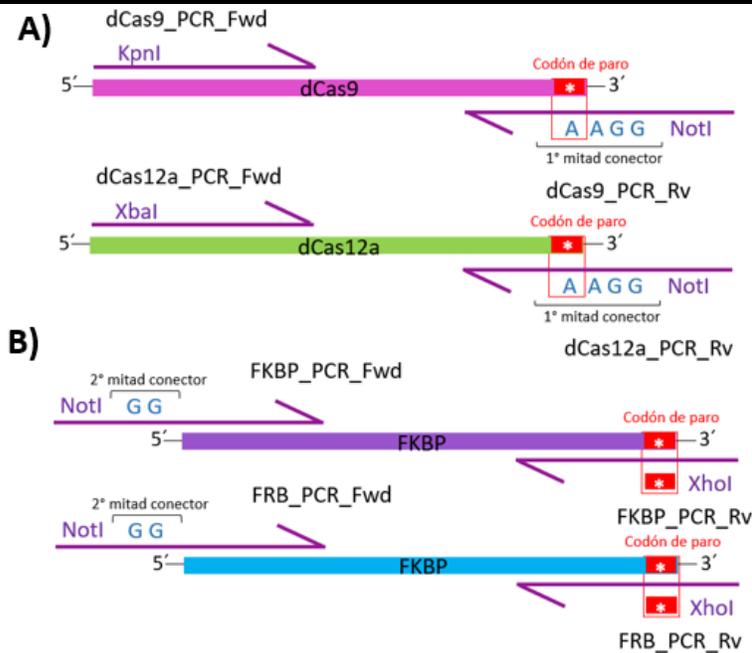


Figura 10A. Diseño de los oligos para: **A)** las proteínas dCas9 y dCas12a **B)** Para los dominios FKBP y FRB

7.9 Clonación de los plásmidos de las proteínas de fusión recombinantes

Después del diseño, para obtener un plásmido de ADN recombinante con las secuencias deseadas se realizó la clonación mediante técnicas de digestión y ligación, basándose en la metodología de Calcines-Cruz, *et al*, 2021 para dCas12a- FKBP. Las enzimas de restricción utilizadas fueron KpnI, NotI, XbaI, XhoI. Estas enzimas fueron adquiridas de New England Biolabs. Los protocolos para las digestiones se calcularon con la herramienta NEBCloner- Double Digest Finder. La digestión fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa. Los vectores y los insertos fueron purificados por medio de un kit de extracción de ácidos nucleicos a partir de gel de agarosa, cuantificados por absorción UV (nanodrop) y guardados a -20°C para su posterior ligación. Para la ligación se ocupó la ligasa T4 de NEB y se siguió el protocolo que recomienda la empresa. La relación entre inserto y vector fue de 3:1. Las ligaciones se comprobaron también mediante electroforesis en gel de agarosa.

A continuación, se muestran los diagramas de estrategia de clonación para obtener los plásmidos de ADN recombinante: dCas9-linker-FKBP, dCas9-linker – FRB, dCas12a-linker-FKBP y dCas12a-linker-FRB (**Figura 11 y 12**). Como observación, la planeación es similar para la clonación de cada una, únicamente varían los oligos y las enzimas de restricción.

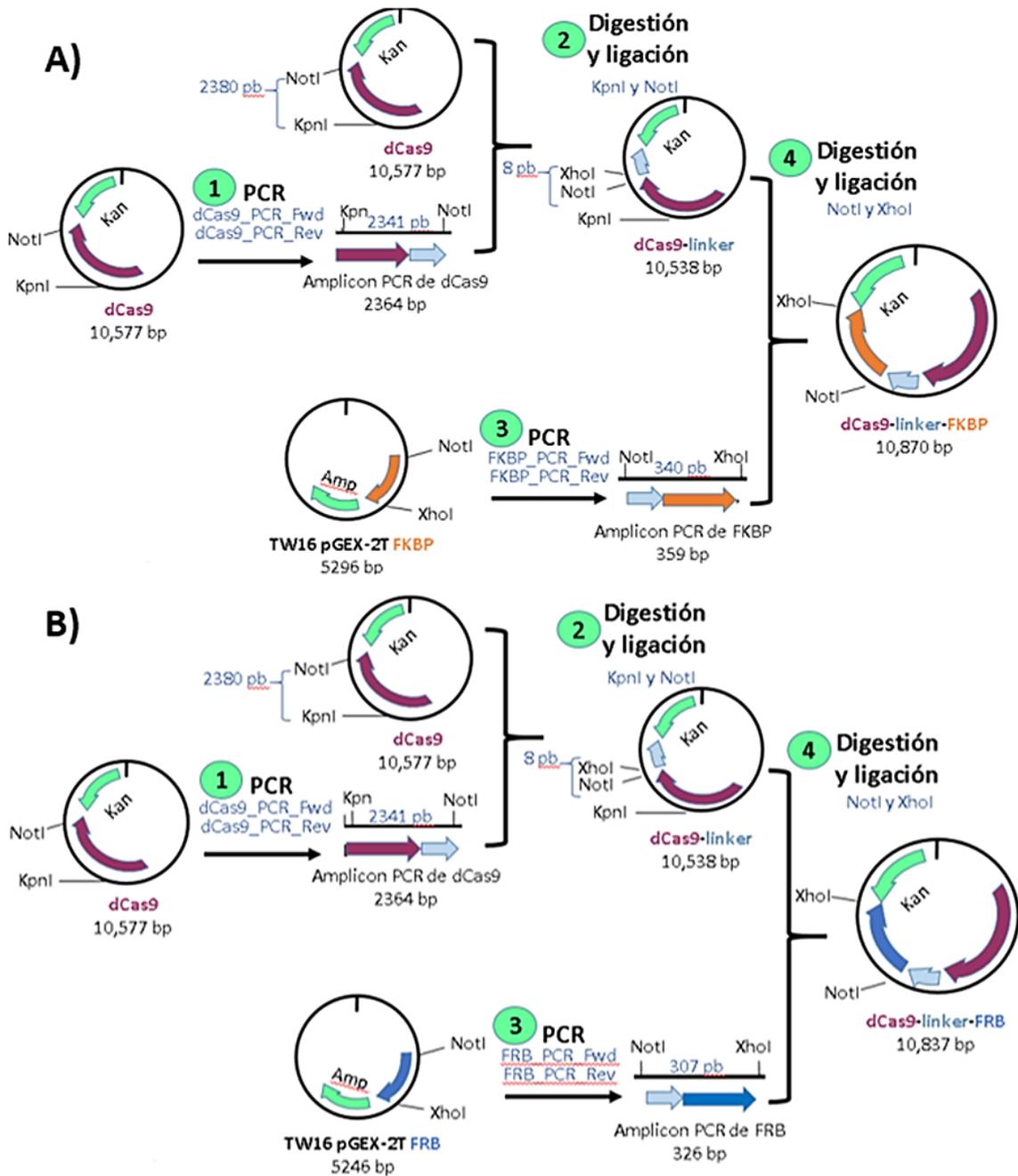


Figura 11. Planeación de clonación de las proteínas de fusión **A)** dCas9 – linker – FKBP. **B)** dCas9 – linker – FRB.

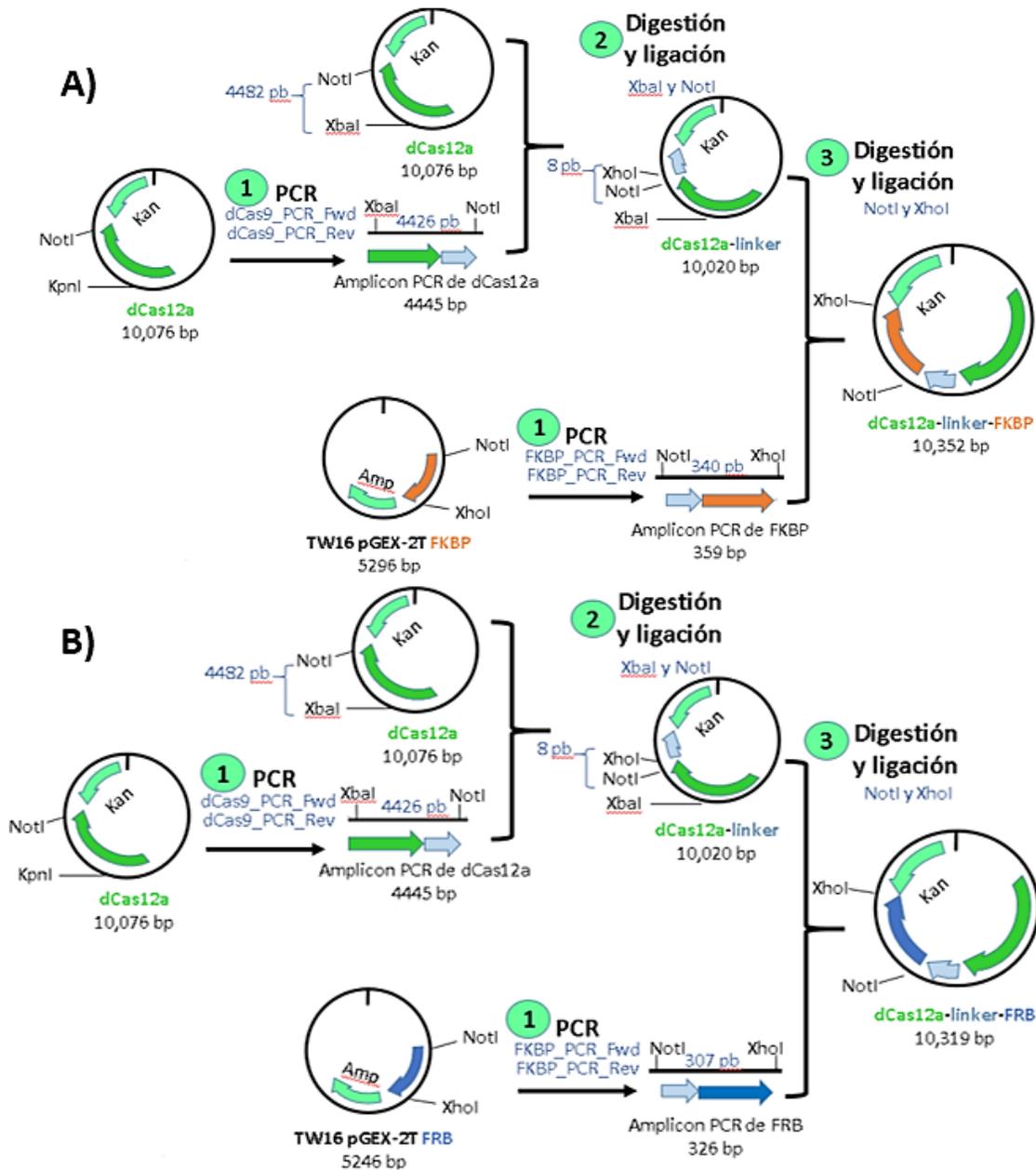


Figura 12. Planeación de clonación de las proteínas de fusión **A)** dCas12a – linker – FKBP. **B)** dCas12a con FRB.

7.10 Verificación de la secuencia

Para la comprobación de secuencia se realizaron dos métodos diferentes. El primer método fue la PCR directamente en las colonias seleccionadas realizada después de la transformación. Las PCR de colonia se hicieron con la DNA polimerasa Phire Green Hot Start (Thermofisher, USA). Este método determinó si las colonias bacterianas transformadas mostraban una amplificación de secuencia equivalente al tamaño de la

MATERIALES Y MÉTODOS

secuencia de las proteínas dCas más el conector y el dominio de dimerización. Al reconocer estas colonias, se realizó en ellas la segunda metodología la cual fue la secuenciación. Para este método, se purificaron los plásmidos con “*Plasmid DNA Miniprep Kit*” de Thermo Fisher y se mandaron a secuenciar con el método Sanger a la compañía Laragen.

7.11 Producción de las proteínas de fusión

La producción de las proteínas de fusión se basó en los protocolos de las proteínas dCas9 y dCas12a, con las recomendaciones de *Finkelstein, 2018* y de *Mohanraju, P. et. al. 2018*, respectivamente. De igual forma se utilizó el protocolo de purificación de dCas12a – FKBP en Calcines- Cruz *et al., 2021*.

Se realizó la transformación de las cepas bacterianas mediante choque térmico a 45 °C durante 45 segundos tomando 50 uL de células competentes de *E. Coli BL21* y 10 ng de DNA plasmídico (*dCas9–FKBP*, *dCas9–FRB*, *dCas12a–FKBP*, *dCas12a–FRB*). Después se creció selectivamente en medio LB con 100 µg/ml de antibiótico (37°C, toda la noche). Al día siguiente se realizó otro crecimiento selectivo toda la noche con agitación constante, pero en esta ocasión en el medio de cultivo necesario para cada proteína (LB para dCas9 y TB para dCas12a) y la temperatura de 37°C para dCas12a y 30°C para dCas9.

Al alcanzar el valor de 0.6-0.8 OD600, el cual corresponde a la fase exponencial del crecimiento bacteriano, los cultivos se enfriaron a 18°C para dCas9 y 12°C para dCas12a y se les adicionó IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubaron por ~18 h para dCas9 y ~24 h para dCas12a a 18°C para dCas9 y 12°C para dCas12a. Al finalizar el tiempo de inducción, el cultivo se centrifugó (a 6000 RFC para dCas9 y 6800g para dCas12a) durante 15 min, 4°C. Se decantó el sobrenadante y se obtuvo el pellet. El pellet fue resuspendido para transferirlo a un tubo de 50 mL y se realizó una segunda centrifugación con las mismas condiciones ya mencionadas para recuperar el pellet. Cada tubo se bañó en nitrógeno líquido y fue almacenado a -80°C. Este pellet fue almacenado para mantenerlo en almacenamiento por hasta dos semanas en el caso de necesitar hacer una pausa antes de la purificación.

7.12 Verificación de la producción de proteína

Las colonias positivas se cultivaron y se indujeron con IPTG para la expresión de las proteínas. Para saber si en esta expresión se obtuvieron las proteínas de fusión se les

aplicó el método de Western blot. Esta técnica ayuda a identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas, además de que nos ayuda a tener una idea de la concentración, así como la composición y el tamaño de las proteínas. Para esta técnica se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS- PAGE) al 7.5 % (100 V, 2 horas). Posteriormente, se realizó una electrotransferencia en una membrana de nitrocelulosa (400 mA, 1 hora) y se marcaron las proteínas de fusión con el anticuerpo monoclonal Anti-Hisx6 Tag de ThermoFisher (1:5000, 1 hora a 4°C) el cual se une específicamente a la etiqueta de histidinas 6xHis que tiene las proteínas de fusión y el anticuerpo policlonal de conejo anti- IgG de ratón con HRP (1:5000, 1 hora a 4°C), el cual se une específicamente al anticuerpo primario y reacciona con el luminol para producir una señal quimioluminiscente. El resultado se registró en el fotodocumentador Azure Biosystems 500. Además, para hacer la comparación de valores teóricos contra experimentales, se calculó el peso molecular de cada proteína de fusión con el programa Protparam (Wilkins, M. R., et. al., 2005) y también se comparó con las proteínas dCas9 y dCas12a producidas por nuestra colaboradora Arroyo Rabasa, 2021.

7.13 Purificación de las proteínas de fusión

Un pellet bacteriano resuspendido en 30 mL del amortiguador de lisis se sonicó usando intervalos de 5 segundos con una amplitud de 30 con intervalos de 25 segundos sin sonicación durante 6 minutos, manteniendo siempre la temperatura entre 5 y 20°C. El lisado celular se centrifugó a 30000 g a 30 min por 4°C. Luego este sobrenadante se filtró con una membrana de tamaño de poro de 0.22 µm y se le realizaron varias técnicas para obtener a las proteínas. Estas técnicas se muestran en la **Figura 13**, La primera fue la cromatografía de afinidad por Ni-NTA, la cual separa a las proteínas de fusión de las demás mediante su unión de la etiqueta de histidinas 6xHis al Ni-NTA. Después se realizó una diálisis en membrana semipermeable para separar eliminar sales e impurezas por presión osmótica y al mismo tiempo se realizó el corte de las etiquetas de histidinas 6xHis con la proteasa SUMO o TEV debido a que ya no se necesitaban en el proceso. Posteriormente las proteínas se sometieron a una cromatografía de intercambio iónico, para separarlas por cargas y se realizó una serie de ultrafiltraciones y cromatografía de exclusión por tamaño para separarlas por tamaño.

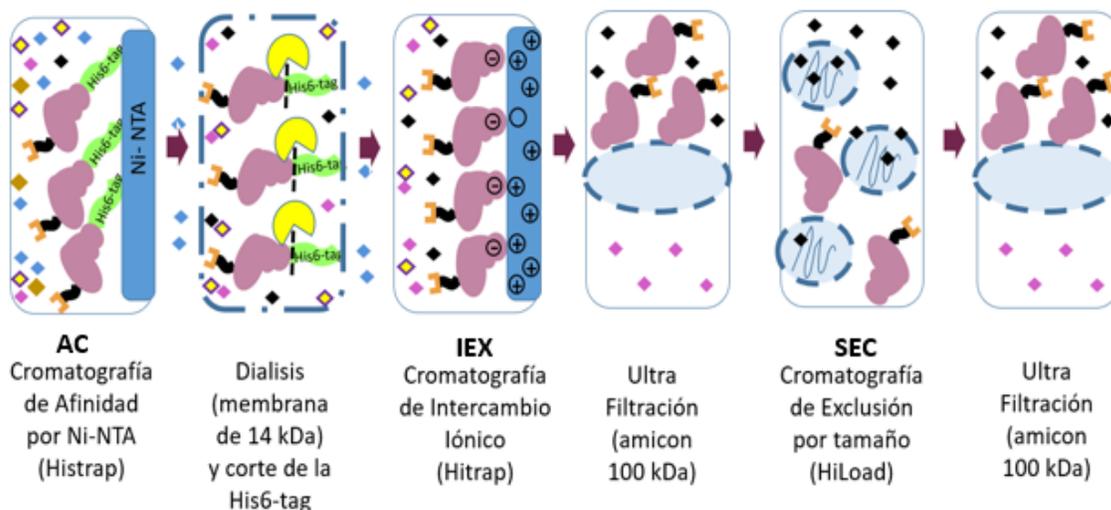


Figura 13. Resumen de pasos de purificación de las proteínas recombinantes.

Para la cromatografía de afinidad se utilizó una columna de níquel-NTA (ácido nitrotriacético) de Thermo Fisher. El protocolo que se siguió es el que está descrito en el manual de uso de la compañía. Los amortiguadores utilizados en esta etapa fueron los de Lavado y Elución. El flujo utilizado en todo el proceso fue de 2 ml/min y cuando se colocó la muestra cambió a 1 ml/min. El volumen de sobrenadante que se obtiene en este paso, denominado “Sobrenadante” y el volumen de lavado, denominado “Lavado” se recolectaron en un tubo nuevo de 50 mL y se guardaron a 4°C. Al igual que el volumen en el que se obtiene la muestra final denominado “Elución”.

Después de la cromatografía, se realizó la diálisis y corte de etiqueta de histidinas 6xHis con la proteasa TEV o SUMO toda la noche (16 horas aproximadamente) a 4°C en constante agitación. La elección de proteasa depende de la proteína a dializar, TEV es para las proteínas de fusión de dCas9 y SUMO es para las proteínas de fusión de dCas12a. Para esto se ocupó la membrana MWCO 14 kDa con el amortiguador de diálisis.

Después se utilizó la columna de intercambio catiónico de ThermoFisher. El protocolo por seguir fue proporcionado por el manual de usuario de la compañía. El flujo utilizado en todo el proceso fue de 2 mL/min y cuando se colocó la muestra cambió a: 1 mL/min. Lo que salió de la columna (flowthrough y wash) se recolectó y se guardó a 4°C. Los amortiguadores utilizados en esta etapa fueron IEX A y IEX B. Se realizó un gradiente de sales en el equipo HPLC con el amortiguador IEXB (de 0 a 100% en 6 volúmenes de columna, gradiente lineal) y se recolectaron las muestras en porciones de 1mL para su uso posterior. La elección de fracciones se realizó mediante la comparación de los valores máximos de absorbancia

tomando así, sólo las muestras que tienen mayor absorbancia y por ende mayor concentración de proteína. Después con las fracciones ya elegidas se tomó su relación A260 nm/A280 nm para cada proteína.

Para concentrar la muestra se decidió utilizar unidades de filtración por centrifuga (amicon) de 100 kDa debido a que nuestras proteínas son más grandes que esa cantidad por lo que se podría terminar de eliminar impurezas al mismo tiempo de realizar su concentración. Y se centrifugó 5000g por 15 minutos. Después los ~200 µL obtenidos de la concentración se inyectaron en la columna de filtración en gel. Para equilibrar y lavar la columna se utilizó el amortiguador SEC con el flujo de 1.6 ml/min y la muestra se corrió a 0.5 ml/min. Se recolectó la muestra y se volvió a pasar por el amicon para obtener una concentración de 2 mg/ml. Se hicieron alícuotas de 15 µL cada una. Las alícuotas resultantes se bañaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C.

Para calcular el porcentaje de pureza de las proteínas se tomo una alícuota de cada paso importante en la purificación, se realizó un SDS-PAGE 7.5% y se analizó con el programa GelAnalyzer 19.1 el cual cuantificó la intensidad de las bandas a en cada carril. Tomando en cuenta que una proteína 100% purificada es aquella que se encuentra totalmente sola en un carril y no tiene contaminantes, se realizó una división de la banda de la proteína de interés entre todas las bandas en el carril para calcular el porcentaje de pureza en la muestra:

$$1) \quad \frac{\text{Valor de intensidad de la proteína recombinante}}{\text{Suma de todos los valores de intensidad en el carril}} \times 100 = \% \text{ de Pureza}$$

7.14 Ensayos de caracterización de las proteínas de fusión recombinantes

Dicroísmo Circular

Los espectros de dicroísmo circular se utilizaron para analizar el plegamiento de las proteínas de fusión y revisar si existen cambios conformacionales. Para este proceso se ocupó una solución de 50 mM de buffer de Fosfatos (pH= 7.4) con DTT 1mM y 100 mM NaF como el blanco. Para obtener la muestra objetivo se utilizó 200 µg/mL de la proteína de fusión (volumen total de 300 µL). Los espectros se realizaron con la celda de cuarzo de 0.1 cm de paso de luz a 20°C. Se seleccionó un intervalo de longitud de onda de 190-260 nm. Cada escaneo fue un promedio de 5 acumulaciones a 20 nm min⁻¹. Los espectros de DC se registraron con el espectropolarímetro JASCO J-1500 del Laboratorio de Espectroscopía y Polarimetría. Para analizar los resultados se utilizó el programa Spectra

Manager y se restó el valor de elipticidad del blanco para obtener los resultados finales y compararlos con los valores teóricos. En la **Figura 14** se observan los espectros teóricos de las estructuras secundarias “puras”. Cabe señalar que los valores teóricos fueron calculados con los archivos pdb de las proteínas Cas9 (5F9R) y Cas12a (5KK5), mediante una aplicación para la generación de espectros de dicroísmo circular a partir de coordenadas atómicas de proteínas llamado PDBMD2CD (Drew, E. D., & Janes, R. W., 2020). Además como dato adicional, los resultados se compararon con los resultados experimentales de las proteínas puras dCas9 y dCas12a producidas por Arroyo Rabasa, 2021 y la proteína dCas12a-FKBP de Calcines-Cruz *et al.* 2021.

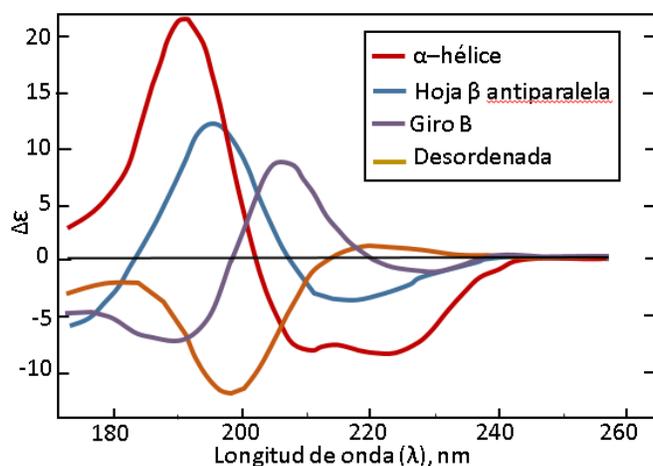


Figura 14. Espectros de dicroísmo circular de estructuras secundarias “puras”. (Brahms & Brahms, 1980)

Ensayos de unión de Rapamicina por DLS

En este trabajo se utilizó la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) para observar las interacciones de las proteínas de fusión con la rapamicina a través del incremento del tamaño de los dímeros formados. El tamaño (diámetro hidrodinámico) y distribución de tamaño de las proteínas en interacción, fue determinado con el equipo Nano Zetasizer Malvern, modelo ZEN 3600. La muestra de cada proteína tenía una concentración de 0.1 mg/ml disueltos en 2 ml de agua desionizada y la rapamicina tenía una concentración de 0.3 mg/mL, es decir una relación 1:3. Las muestras antes de ser evaluadas fueron filtradas en disco millipore de 0.22 μm . Y se utilizó el buffer de ensayo (20 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM DTT). Cada muestra se midió en cinco ciclos de diez repeticiones cada uno.

7.15 Obtención del ADN objetivo y ARN guía

Para los ensayos de unión a DNA (EMSA), se requirió obtener un templado de ADN objetivo y los ARN guías de las proteínas de fusión. En la **Figura 15** se observa el templado de ADN objetivo, el cual se produjo mediante un corte de enzimas de restricción de un plásmido de 10,933 pb, para obtener una secuencia de 2,119 pb que tiene un sitio de reconocimiento PAM para dCas9 – FKBP y otro sitio de reconocimiento PAM para dCas12a – FRB con una distancia de 2,032 pb entre cada una. La secuencia objetivo que debe de reconocer el ARN guía debe estar inmediatamente sucedida por la secuencia PAM. Después se purificó por extracción de DNA en agarosa y se realizó otra electroforesis en gel agarosa 1% para verificar el tamaño.



Figura 15. Esquema de obtención del templado de ADN objetivo desde el plásmido dCas9-FKBP con un sitio de unión para dCas9 y dCas12a.

Para el ARN guía, primero se diseñó tomando en cuenta las secuencias de reconocimiento de dCas9 y dCas12a en el ADN objetivo se le agregaron las regiones constantes del ARN guía de ambas proteínas recombinantes. Después se realizó una PCR para obtener los templados de ADN equivalentes a la secuencia de ARN guía. Y para finalizar se realizaron transcripciones in vitro para obtener los ARN guías de todas las proteínas de fusión. Para corroborar su producción se realizó un gel con UREA al 8M y al 20% de acrilamida. La transcripción in vitro se realizó con el kit: “HiScribe® T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit” de New England Biolabs. El protocolo seguido fue proporcionado por la misma compañía en su manual de instrucciones y se muestra un esquema de este en la **Figura 16**.

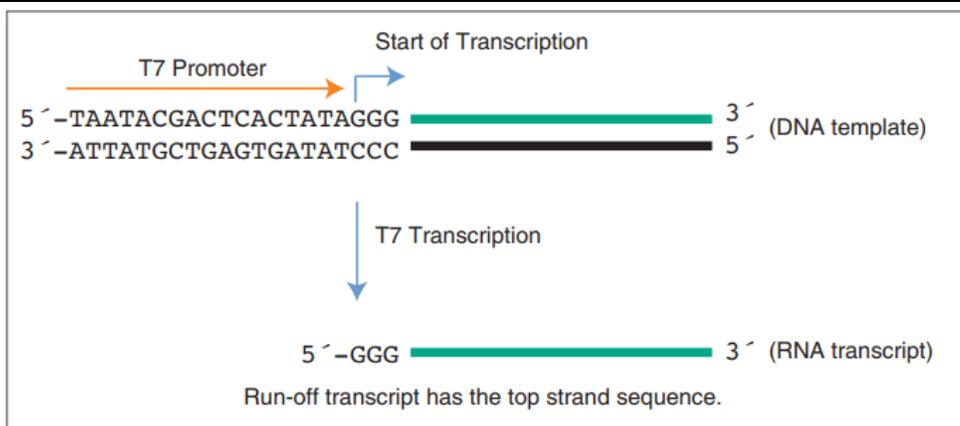


Figura 16. Transcripción por ARN Polimerasa T7.

7.16 Ensayos de unión con el ADN por EMSA

Para verificar la unión de las proteínas de fusión al templado de ADN se utilizó el ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA, electrophoresis mobility shift assay). La preparación del ensayo se llevó a cabo como indica Cadena-Nava (Cadena-Nava et al., 2012). Se combinaron las soluciones, de tal manera que se tuviera una muestra de proteína libre, otra de ácido nucleico libre y finalmente una mezcla estequiométrica de ambos. Las muestras se realizaron con una concentración de 20 mM de HEPES, 100mM KCl, 5mM MgCl, 1mM DTT y se sometieron a una electroforesis en condiciones nativas en un gel de agarosa al 1% y TBE 0.5x como amortiguador de electroforesis. Después de la electroforesis, el gel obtenido se tiñó durante una hora con SYBR SAFE (dilución 1:10,000 en TBE), para posteriormente observar los ácidos nucleicos y las proteínas respectivamente. Los gels fueron capturados en el fotodocumentador Azure Biosystems 500.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Diseño de las proteínas de fusión

En la **Figura 17** se muestra la verificación del tamaño de los amplicones para la adición de la secuencia conectora. En el inciso **A)**, se observa que los tamaños de los amplicones de PCR se encuentran entre 2,000 – 2,500 pb para dCas9 – linker y 4,000-5,000 pb para dCas12a – linker. Lo cual coincide con lo esperado comparándolo con el tamaño calculado de la secuencia de dCas9 más el linker de 7 aminoácidos que es de 2,364 pb y el tamaño de dCas12a más el linker de 4,438 pb. De igual forma, en el inciso **B)** se muestra los amplicones de PCR de FKBP- linker y FRB – linker con un tamaño entre 250 y

500 pb. Lo cual también coincide comparándolo con el tamaño de la secuencia calculada de los dominios más el linker de 2 aminoácidos y el codón de paro: 359 pb para FKBP-linker y 326 pb para FRB – linker.

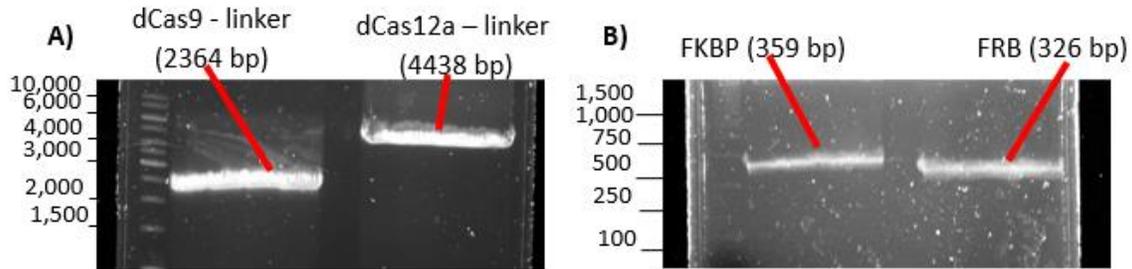


Figura 17. Geles de agarosa 1% con los amplicones de PCR mencionados a continuación: **A)** Amplicones de PCR con la secuencia dCas9 – linker y dCas12a – linker. **B)** Amplicones de PCR con la secuencia FKBP y FRB.

8.2 Clonación de los plásmidos de las proteínas de fusión

La clonación de los plásmidos con la secuencia de las proteínas de fusión deseadas se consiguió mediante una serie de digestiones y ligaciones. Estos pasos se realizaron con el fin de obtener las siguientes características deseadas: una etiqueta de histidinas 6xHis al principio de la secuencia (que nos ayudará en la purificación más adelante), la secuencia de una proteína dCas seguida de una secuencia conectora, un dominio de dimerización y al final un codón de paro, el cual indica el término de la traducción del mRNA y por lo tanto de la expresión de la proteína.

A continuación, en la **Tabla 2** se muestra la primera digestión realizada en cada proceso de clonación. Esta primera digestión tiene el propósito de cortar el plásmido de dCas y el amplicón de PCR dCas – linker, para después poder hacer la ligación de ambos.

Para verificar la primera digestión se realizó una electroforesis en gel de agarosa para verificar los tamaños de los vectores y de los restantes de los plásmidos de dCas9 y dCas12a. Como se puede ver en la **Figura 18**, comparando los tamaños con la **Tabla 2**, se puede notar que son los mismos tamaños esperados.

Tabla 2. Resumen de primera digestión para dCas9.

	Enzima de restricción1	Enzima de restricción 2	Tamaño de la secuencia cortada (pb)	
dCas9	Kpn1	Not 1	Vector	8197
			Restante	2380
Amplicon dCas9 (PCR)	Kpn1	Not 1	Inserto	2341
			Restante	23
dCas12a	Xba1	Not1	Vector	5594
			Restante	4482
Amplicon dCas12a (PCR)	Xba1	Not1	Inserto	4426
			Restante	12

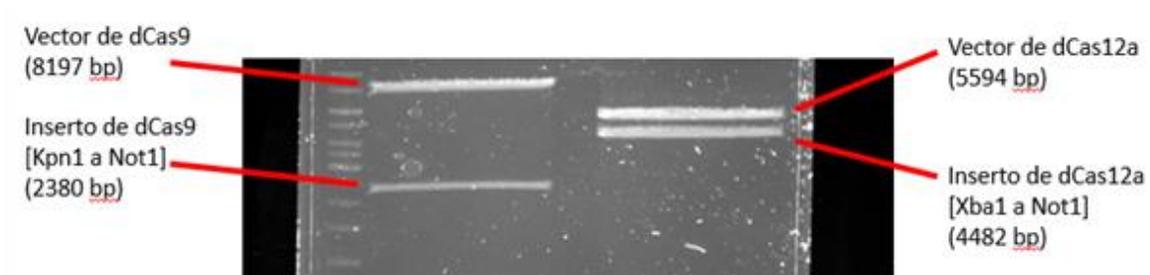


Figura 18. Gel de agarosa 1% que demuestra las digestiones de los plásmidos dCas9 y dCas12a.

Luego de la primera digestión, se realizó la primera ligación para obtener el plásmido dCas9 – linker y dCas12a – linker. Y después se procedió a realizar la segunda digestión, la cual consiste en cortar los plásmidos de dCas – linker y los amplicones de PCR de FKBP – linker y FRB – linker para realizar la segunda ligación. Debido a que es muy baja la diferencia entre los vectores, los plásmidos originales de dCas y los plásmidos de dCas9 – linker y dCas12a – linker, no se realizó una electroforesis en gel de agarosa en esta etapa. Sin embargo, se muestran los cálculos de la segunda ligación en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Segunda ligación para la obtención de las proteínas de fusión dCas – linker – dominio.

Sistema de Cas-dominio		Tamaño de la secuencia (pb)		Tamaño del plásmido dCas – dominio (pb)
dCas9-FKBP	dCas9- linker	Vector	10530	10870
	FKBP	Inserto	340	
dCas9-FRB	dCas9- linker	Vector	10530	10837
	FRB	Inserto	307	
dCas12a-FKBP	dCas12a- linker	Vector	10012	10352
	FKBP	Inserto	340	
dCas12a-FRB	dCas12a- linker	Vector	10012	10319
	FRB	Inserto	307	

8.3 Verificación de las secuencias clonadas

Para comprobar el tamaño de los plásmidos obtenidos en la clonación, se decidió mejor realizar la PCR de colonias con los oligos forward PCR_dCas9_Fwd / PCR_dCas12a_Fwd y los oligos reverse PCR_FKBP_Rv/ PCR_FRB_Rv dependiendo de que secuencia se tratara: dCas9-FKBP, dCas9-FRB, dCas12a-FKBP, dCas12a-FRB. Con estos oligos, la PCR amplificaría la parte final de la secuencia de las proteínas dCas más el conector y el dominio FKBP o FRB. Lo cual es lo que nos interesa visualizar que tiene el plásmido correctamente. A continuación, se muestra el tamaño de la secuencia amplificada en la **Tabla 4** y los resultados en la **Figura 19**.

Analizando los geles de agarosa en la **Figura 19**, de las proteínas de fusión **A)** dCas9 – FKBP, **B)** dCas9 – FRB, **C)** dCas12a – FKBP y **D)** dCas12a – FRB, se puede observar que algunas colonias no presentaron una secuencia amplificada y otras colonias si. Aquellas colonias que si tienen una secuencia amplificada, se compararon en su tamaño de pares de bases con el teórico calculado en la **Tabla 4**. Y se concluyó que todos los tamaños de secuencia están en el rango deseado para todas las proteínas de fusión dCas9 – FKBP, dCas9 – FRB, dCas12a – FKBP, dCas12a – FRB.

RESULTADOS

Tabla 4. Tamaño de la secuencia amplificada en las PCR de colonias

Plásmido	Oligos Utilizados	Tamaño de la secuencia amplificada
dCas9 – FKBP	PCR_dCas9_Fwd PCR_FKPBP_Rv	2703 pb
dCas9 – FRB	PCR_dCas9_Fwd PCR_FRB_Rv	2670 pb
dCas12a – FKBP	PCR_dCas12a_Fwd PCR_FKPBP_Rv	4784 pb
dCas12a – FRB	PCR_dCas12a_Fwd PCR_FRB_Rv	4751 pb

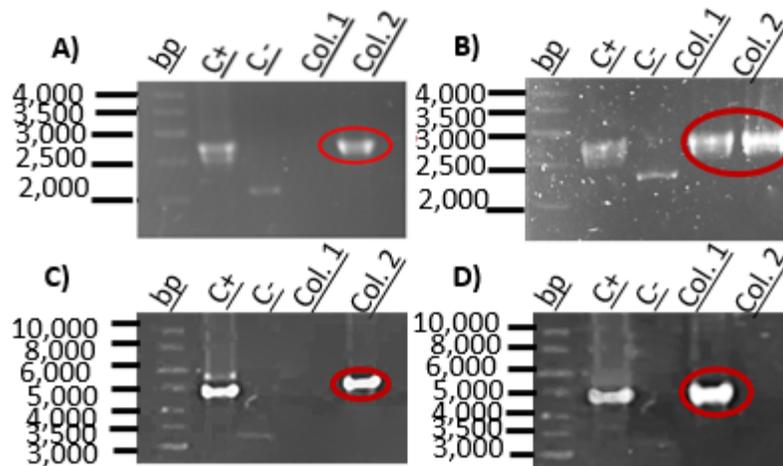


Figura 19. Geles de agarosa al 1% de las PCR de colonias de las proteínas de fusión: **A)** dCas9 – FKBP, **B)** dCas9 – FRB, **C)** dCas12a – FKBP (Tomado de Calcines-Cruz et al, 2021), **D)** dCas12a – FRB. Donde C+ es la colonia control, C- es la colonia blanco, la cual no tiene la secuencia, C1 y C2 son algunas de las colonias probadas para revisar la secuencia amplificada.

Aquellas colonias que demostraron tener la secuencia amplificada se marcaron y seleccionaron para secuenciar. Cada una de las colonias seleccionadas se mandó a secuenciar en Laragen con el método Sanger para comprobar la clonación de los plásmidos dCas9-FKBP, dCas9-FRB, dCas12a-FKBP, dCas12a-FRB. Con el programa SnapGene se visualizó la secuencia diseño y se comparó con los resultados de la secuenciación de Laragen. Esto con el fin de observar que la secuencia fuera idéntica y sin inserciones o

deleciones. En todos los casos la secuencia se comprobó ser idéntica a la que habíamos diseñado. Por lo que se puede concluir que se verificó mediante PCR de colonias y secuenciación la parte más importante de la secuencia de diseño, la cual tiene el final de la proteína dCas más el conector y el dominio de dimerización (**Véase secuencia completa con cromatograma para cada caso y su alineamiento en las Figuras 43-50, Anexo I**).

8.4 Verificación de la producción de proteína

Luego de realizar la producción de acuerdo con el protocolo mencionado en métodos, se caracterizaron molecularmente a las proteínas para verificar su identidad. Para esto se hizo un SDS-PAGE y se realizó un ensayo Western blot. En la **Figura 20**, se muestra el SDS-PAGE, en el cual la muestra “antes de inducción” representa la cepa antes de inducir la expresión de las proteínas. Esta muestra se utilizó como el control negativo. Otros controles que se realizaron fueron las muestras “dCas9 inducido” y “dCas12a inducido” las cuales son la inducción en las cepas de las proteínas inactivas dCas9 y dCas12a sin el diseño con el conector y los dominios de dimerización. Estos controles se hicieron gracias a Arroyo Rabasa, 2021. para comparar los tamaños de las proteínas de fusión con las proteínas inactivas. En teoría, las proteínas de fusión deben de ser un poco más grandes que las proteínas inactivas, debido al aumento en su tamaño por tener el dominio de dimerización FKBP o FRB. Lo cual se alcanza a observar ligeramente en el SDS-PAGE 7.5%, sin embargo, el cambio no es muy notorio ya que los dominios de dimerización FKBP y FRB son muy pequeños, lo que hace que la diferencia de tamaños sea muy poca.

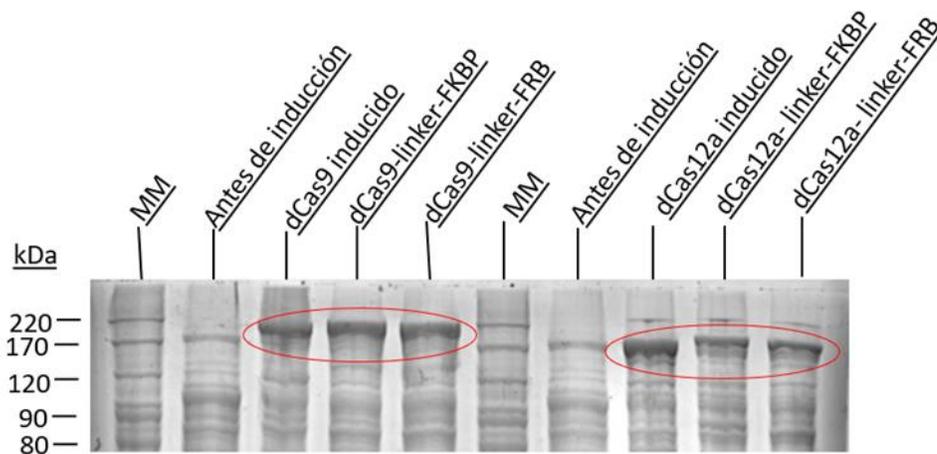


Figura 20. Comprobación de expresión de las proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE 7.5%. Donde las muestras “MM” son los Marcadores Moleculares y “antes de inducción” representa la cepa antes de inducir la expresión de las proteínas.

Tabla 5. Peso molecular de las proteínas recombinantes obtenidas.*

Proteína	Peso Molecular (Kda)	Proteína	Peso Molecular (Kda)
dCas9 inducido	201.61	dCas12a inducido	170.21
dCas9 – FKBP	214.17	dCas12a – FKBP	180.05
dCas9 – FRB	213.99	dCas12a – FRB	179.87

*El cálculo del peso molecular se realizó con el programa Protparam (Wilkins, M. R., et. al., 2005).

Al ser una inducción, las proteínas de fusión se sobreexpresan en la cepa bacteriana, teniendo así mayor cantidad de esta en la muestra y pudiéndose observar como una banda más gruesa respecto a las demás en el SDS-PAGE (**Figura 20**). Teniendo esto en cuenta, las bandas más gruesas del SDS-PAGE rondan entre los 170 a los 220 Kda. Para las muestras de las proteínas con dCas9 se observa una ligera subida de las bandas, lo cual podría significar un mayor tamaño de estas proteínas. A diferencia, de las proteínas con dCas12a que muestran un menor tamaño de ellas. Sin embargo la diferencia no es muy notoria, lo cual se puede deber a que el gel no se corrió el tiempo suficiente y se necesitaría de mayor tiempo para ver una diferencia más notable entre las proteínas. A pesar de esto, al comparar estos resultados con los pesos moleculares teóricos de la **Tabla 5** tiene sentido. Ya que las proteínas de fusión con dCas9 rondan los 215 KDa y las proteínas de fusión con dCas12a rondan los 180 KDa, es decir, son un poco más pequeñas.

El siguiente resultado a analizar, es el resultado del Western blot en la **Figura 21**, el cual demuestra 6 carriles que representan a las proteínas de fusión con dCas9 y con dCas12a, además de los controles dCas9 y dCas12a. Tomando en cuenta que los plásmidos de dCas9 y dCas12a tienen una etiqueta de histidinas 6xHis a lado de la proteína dCas, y que el anticuerpo primario seleccionado reconoce estas Histidinas, es lógico visualizar estas bandas cuando las proteínas no tienen el diseño con el conector y los dominios FKBP y FRB. Ahora bien, en el diseño de las proteínas de fusión se respetó la presencia de la etiqueta de histidinas 6xHis, ya que esta nos podría ayudar a purificar las proteínas después de su expresión. Por lo que también es lógico observar la presencia de esta etiqueta de histidinas 6xHis en cada muestra del Western blot. La única diferencia que se podría rescatar, radica en los tamaños de las proteínas de fusión comparados con los tamaños de las proteínas inactivas. Siendo que las proteínas de fusión son más grandes

teóricamente, en los resultados se observan las bandas que las representan ligeramente más arriba.

Cabe señalar que, en vez de observarse solo una banda en cada carril, se observan dos y esto se cree que fue debido a la manera en que se realizó el Western blot ya que fue corto el tiempo que se propuso para la electrotransferencia del gel de poliacrilamida al papel de nitrocelulosa por lo que no se transfirió totalmente toda la proteína deseada, haciendo que las bandas no se notaran con la intensidad deseada y dieran la ligera ilusión de que ser 2 bandas en vez de una. Recordemos que la cantidad de proteína recombinante después de la inducción aumenta considerablemente y para la realización de este ensayo, se realizó una inducción aparte con mayor tiempo de sobreexpresión para no tener problemas en cantidades. Son un artefacto de la transferencia, ya que la transferencia a la membrana se hace lentamente (debido a su tamaño) y el sándwich se desensambla repetidamente para evitar la desecación, lo que causó el deslizamiento del gel sobre la membrana.

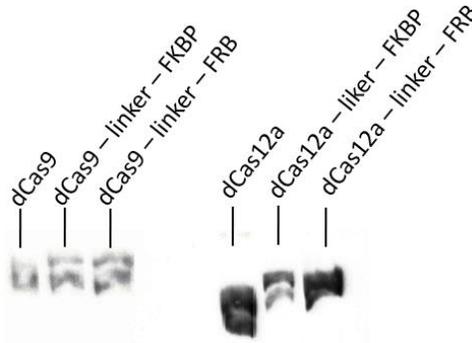


Figura 21. Ensayo de Western blot de las proteínas dCas9, dCas9 – FKBP, dCas9– FRB, dCas12a – FKBP (tomado de Calcines-Cruz *et al.*, 2021) y dCas12a – FRB.

Repasando los resultados anteriores, en el SDS-PAGE se observa que se sobreexpresaron proteínas en el rango de tamaño esperado de 160 KDa a 220 KDa y en el Western blot se demostró que existen proteínas sobreexpresadas con una etiqueta de histidinas 6xHis y mayor tamaño en las muestras de las proteínas de fusión, lo cual era algo que también esperábamos observar. Por lo que tomando en cuenta estas conclusiones, se puede creer que las proteínas sobreexpresadas probablemente sean las que nosotros deseamos obtener. Ya que tienen un mayor tamaño, tienen una etiqueta de histidinas 6xHis y tienen la secuencia verificada del conector más el dominio de dimerización.

8.5 Purificación de las proteínas de fusión

Para obtener el mayor nivel posible de proteína producida altamente pura se combinaron diferentes técnicas: la cromatografía de afinidad de Ni-NTA (AC), diálisis y corte, cromatografía de intercambio iónico (IEX) y la cromatografía de exclusión de tamaño (SEC). En la cromatografía de afinidad de Ni – NTA (AC) las proteínas de fusión se separaron de las demás debido a que tienen una afinidad con la resina de níquel, ya que contienen una etiqueta de histidinas 6xHis en el extremo N-terminal que genera un enlace de coordinación con la resina Ni-NTA.

Como siguiente paso se dializó la muestra para eliminar sales e impurezas por presión osmótica y al mismo tiempo se realizó el corte de las etiquetas de histidinas 6xHis debido a que ya no se utilizarían en el proceso, con las proteasas SUMO (para las proteínas de fusión con dCas9) y TEV (para las proteínas de fusión con dCas12a).

Siguiendo con la purificación, la cromatografía por intercambio iónico (IEX) separó las proteínas de interés por su carga iónica. Para esto se utilizó una columna con matriz negativa y se cargaron positivamente las proteínas con el buffer IEXA dCas9 a pH= 7.5 para las proteínas de fusión con dCas9, las cuales tienen como punto isoeléctrico pH=9.0 para dCas9 – FKBP y pH =8.97 dCas9 – FRB; y el buffer IEXA dCas12a a pH= 7.2 para las proteínas de fusión con dCas12a, con punto isoeléctrico pH=8.23 para dCas12a – FKBP y pH=8.13 dCas12a – FRB. Como paso final se sometieron a una cromatografía por exclusión de tamaño molecular (SEC) para separar las proteínas de fusión de las impurezas restantes. A continuación, se detalla cada una de las proteínas purificadas con los resultados obtenidos en la **Figura 22**. En esta figura se observan los SDS-PAGE con cada paso importante de purificación de las proteínas de fusión. Conforme avanzamos de carril (de izquierda a derecha) se logra visualizar como se aísla progresivamente la banda correspondiente a las proteínas de fusión hasta quedar sola en el carril SEC lo cual indica una purificación exitosa. Además, se puede observar una ligera disminución del peso de las proteínas de fusión después de la diálisis, esto sucedió por el corte de la etiqueta de histidinas 6xHis. Lo cual se explica en la **Tabla 6** con el peso molecular calculado de las proteínas antes y después de la técnica de Diálisis.

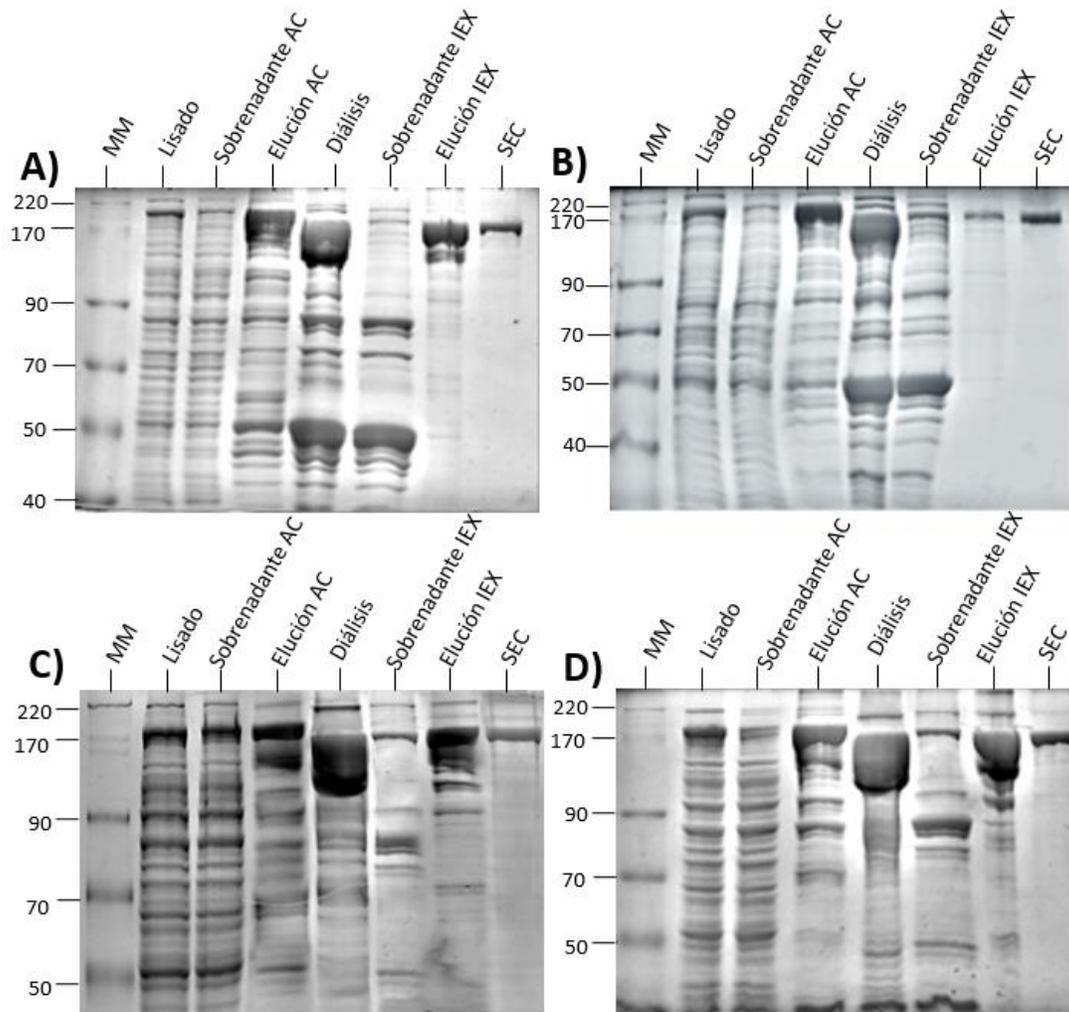


Figura 22. SDS-PAGE 7.5% de las proteínas **A)** dCas9 – FKBP; **B)** dCas9 – FRB; **C)** dCas12a – FKBP; **D)** dCas12a – FRB. Carriles de muestras: MM – marcador de peso, Lisado – muestra de la proteína recombinante producida, Sobrenadante AC – muestra pasada por la columna de Ni-NTA, Elución AC – muestra eluida de la columna de Ni-NTA, Dialysis – muestra después de la diálisis, Sobrenadante IEX – muestra pasada por la columna de intercambio iónico, Elución IEX – muestra eluida de la columna de intercambio iónico, SEC – muestra eluida de la columna de exclusión molecular.

Tabla 6. Peso molecular de las proteínas recombinantes obtenidas antes y después de la técnica de Diálisis.

Proteínas de fusión	Peso antes de corte (kDa)	Peso después de corte (kDa)	Proteínas de fusión	Peso antes de corte (kDa)	Peso antes de corte (kDa)
dCas9 – FKBP	214.17	171.28	dCas12a – FKBP	180.05	163.91
dCas9 – FRB	213.99	171.10	dCas12a – FRB	179.87	163.73

En el caso de la cromatografía por intercambio iónico y la cromatografía SEC, la elección de fracciones se realizó mediante la comparación de los valores máximos de absorbancia observados en el HPLC, tomando así, sólo las muestras que tienen mayor absorbancia y por ende mayor concentración de proteína. Las fracciones de las orillas se descartaron debido a la sospecha de la presencia de contaminantes.

Para la cromatografía de intercambio iónico (IEX) el HPLC arrojó valores de absorbancia significativos a partir de la elución 12 a la 19 para dCas9 – FKBP y sólo se escogió de la 14 a la 16 para evitar la presencia de contaminantes. Y para dCas12a – FRB los valores de absorbancia significativos fueron de la 12 a la 21 y se escogió de la 14 a la 19 (**Figura 23**). Después, con las fracciones ya elegidas y mezcladas se tomó su relación 260 nm/280 nm y salió un valor ~0.6 para cada proteína.

Para la cromatografía de exclusión por tamaño, los valores medidos de absorbancia significativos para dCas9 – FKBP se demuestran a partir de la elución 11 a la 14 y sólo se escogieron la 12 y 13. Y en el caso de dCas12a – FRB los valores de absorción significativos fueron de 7 a 11 y se escogió de 8 a 10 (**Figura 24**)

RESULTADOS

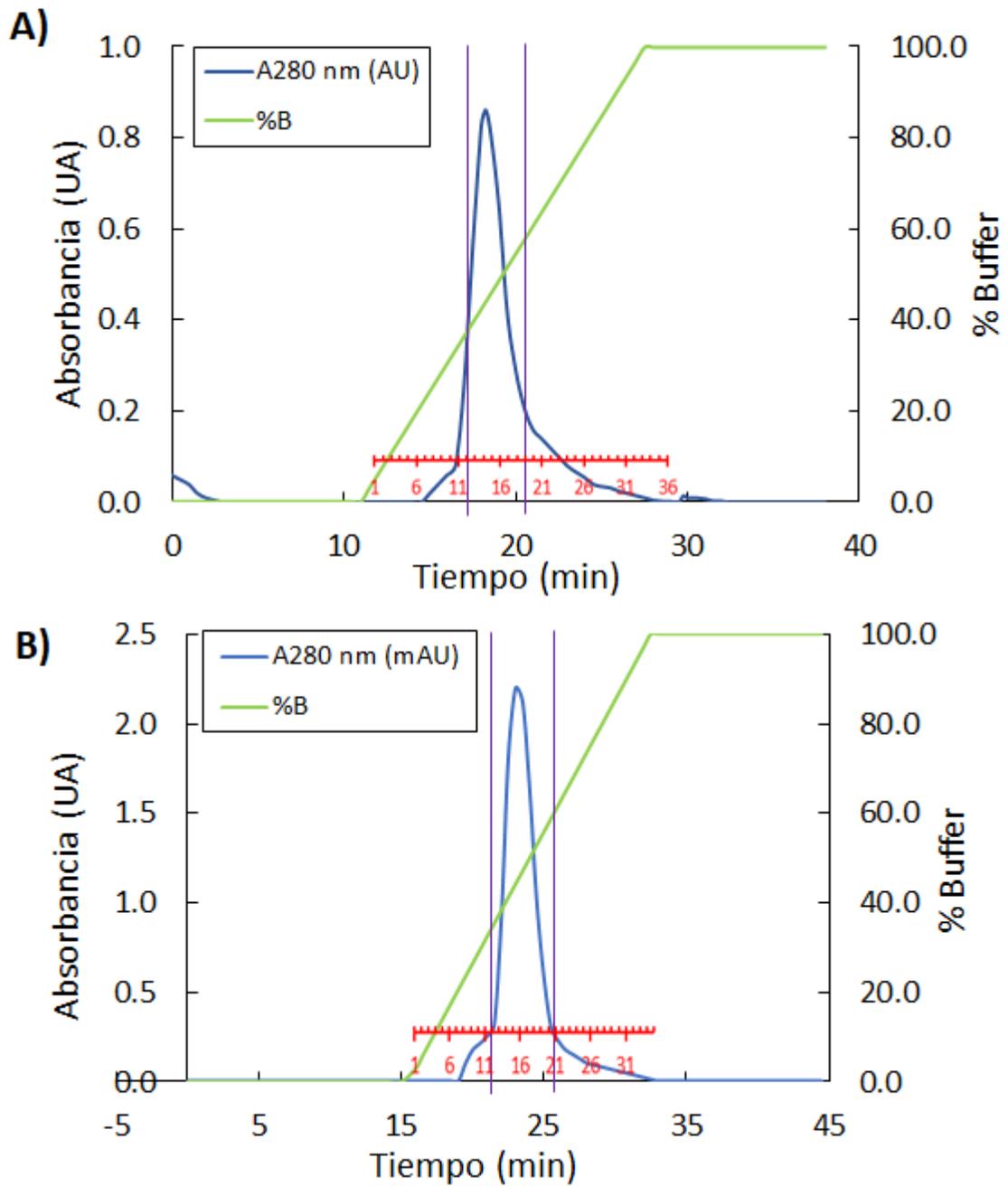


Figura 23. Gráfica de fracciones cromatografía de intercambio iónico (IEX) de la proteína **A)** dCas9 – FKBP **B)** dCas12a – FRB.

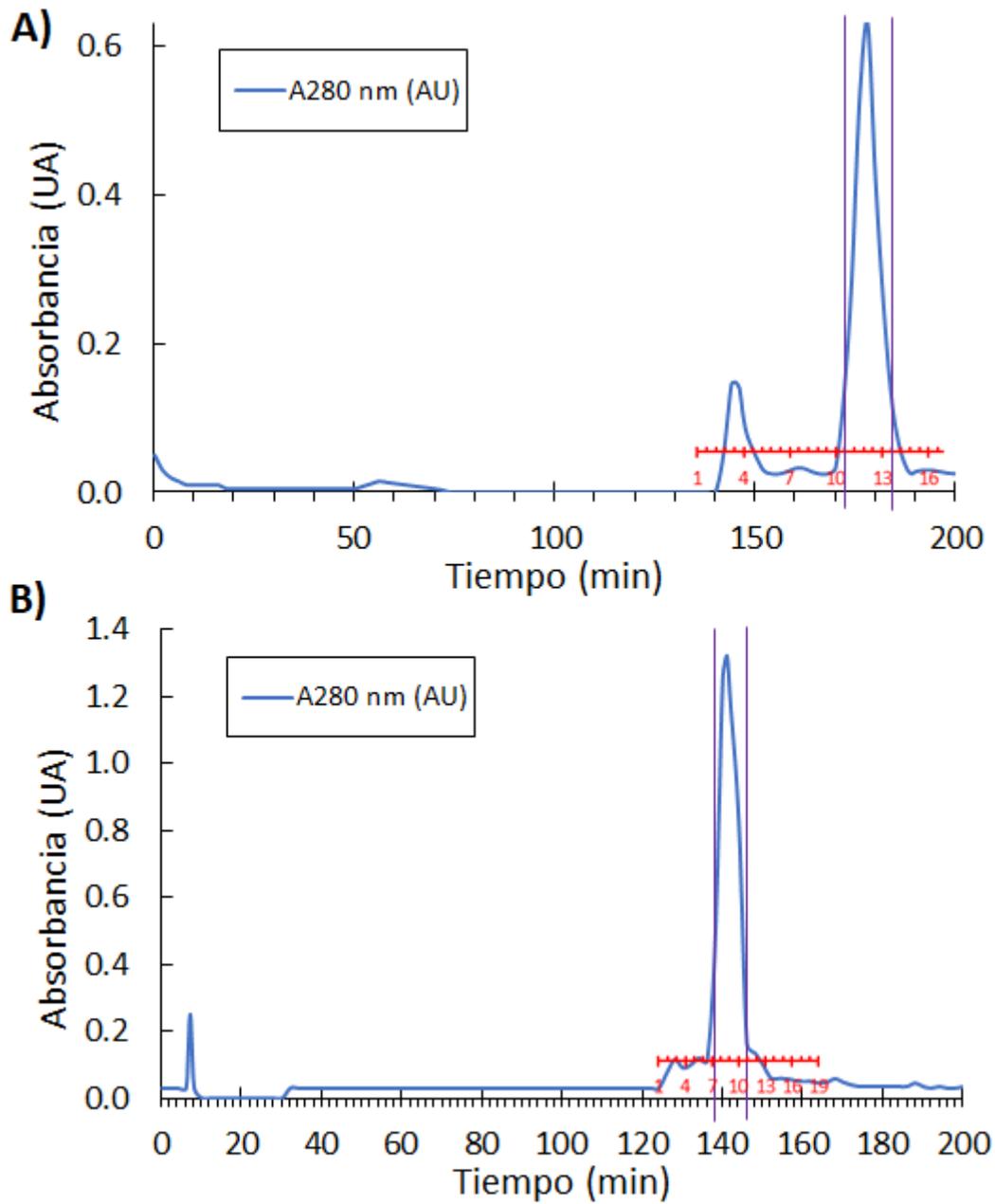


Figura 24. Gráfica de fracciones cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) de la proteína **A)** dCas9 – FKBP **B)** dCas12a – FRB.

RESULTADOS

Después de todo el proceso de purificación, se muestra la **Figura 25** con el gel de poliacrilamida de las proteínas purificadas y su análisis cuantitativo en la **Tabla 7**:

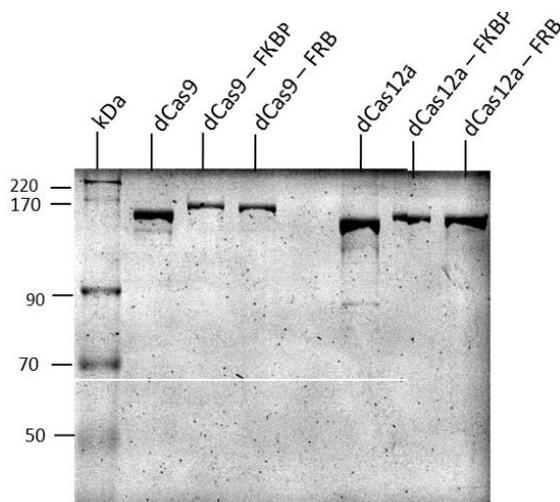


Figura 25. SDS-PAGE 7.5% de las proteínas purificadas.

Tabla 7. Análisis cuantitativo de la purificación de las proteínas.

	Proteína total (mg)	Concentración (mg/mL)	Pureza (%)
dCas9	4.8776	2.68	91
dCas9-FKBP	1.55	1.61	93
dCas9-FRB	2.11	2.24	92
dCas12a	6.14854	2.11	94
dCas12a-FKBP	6.05	2.1	93
dCas12a-FRB	5.76	1.85	91

Como se muestra en la **Tabla 7**, después de la purificación se obtuvieron 1.55 mg de dCas9- FKBP, 2.11 mg de dCas9- FRB, 6.05 mg de dCas12a – FKBP y 5.76 mg de dCas12a- FRB por cada litro de volumen de fermentación. Lográndose un porcentaje de pureza del del ~90% (93% para dCas9 – FKBP, 92% para dCas9– FRB, 93% para dCas12a y del 91% para dCas12a) y una concentración de 1.61 a 2.68 mg/mL. Con estos porcentajes de purificación se puede afirmar que las proteínas dCas9 – FKBP, dCas9 – FRB, dCas12a – FKBP y dCas12a – FRB tienen un porcentaje deseable para trabajar con ellas. Sin embargo, cabe mencionar que existe una gran pérdida de proteína a través de las diferentes cromatografías, lo cual podría ser un aspecto para mejorar en futuros

RESULTADOS

proyectos. En la **Figura 26** se muestra un análisis gráfico de los resultados de la purificación.

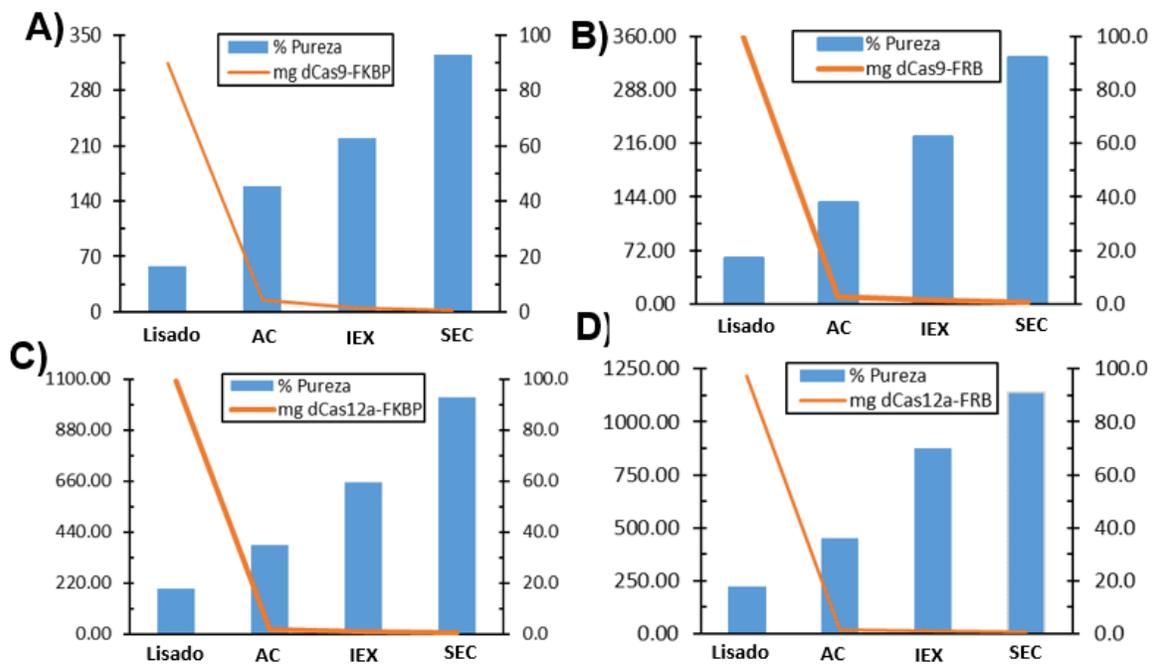


Figura 26. Gráficas del análisis de purificación de las proteínas de fusión: **A)** dCas9 – FKBP. **B)** dCas9 – FRB **C)** dCas12a – FKBP y **D)** dCas12a – FRB. Donde la columna azul representa el % de pureza obtenido en cada etapa de la purificación. Y los datos en naranja los mg de la proteína obtenidos en cada etapa del proceso.

Como se puede observar en la **Figura 26** la mayor pérdida en todos los casos se dio en el primer paso de purificación el cual fue la cromatografía de afinidad con Ni-NTA, ya que en esta etapa se perdió alrededor del 98 al 95% de cada proteína deseada, obteniendo así solo del 1 al 4% después de la cromatografía. Un ejemplo de esto es con la proteína dCas12a – FKBP que pasó de 1092.44 mg de proteína a 18.01 mg al salir de la cromatografía. El por qué sucedió esta pérdida puede ser debido a que la columna de Ni-NTA era demasiado pequeña para la gran cantidad de proteína que se tenía en la muestra, por lo que la columna se terminaba sobresaturando y dejando pasar libremente las proteínas deseadas en los lavados. Una forma en la que se podría atender este conflicto sería realizar cromatografías de afinidad en serie, para que así se pueda recoger mayor cantidad de proteína al final y con un mayor porcentaje de purificación. También se podría proponer utilizar una columna de Ni-NTA más grande para evitar la sobresaturación de la muestra.

8.6 Ensayos de caracterización de las proteínas

Después de purificar las proteínas de fusión, se caracterizó su estructura secundaria para verificar que se obtuvieron las estructuras deseadas. Esto se hizo mediante la técnica de dicroísmo circular, de la cual se obtuvieron gráficas de curvas con valores de elipticidad para diferentes longitudes de onda y se compararon los valores experimentales con los teóricos. De igual forma se tomaron los valores de dCas12a experimental y dCas12a – FKBP de la tesis de Calcines-Cruz *et al*, 2021 para comparar con dCas12a- FRB experimental. En la teoría, las curvas para dCas9 y dCas12a presentan un máximo de 194 nm, y dos mínimos a 210 y 221 nm (Mavridis & Janes, 2016), los cuales indican una estructura rica en hélices alfa. El dominio de dimerización FKBP tiene una estructura secundaria de lámina plegada β y el dominio FRB tiene una estructura de hélice α . En las curvas experimentales para las proteínas de fusión purificadas, se observa la misma tendencia que su contraparte teórica dCas, con un máximo en 196 nm para las proteínas de fusión con dCas9 y 197 nm para las de dCas12a, y un mínimo de 210 nm y 224 nm en ambos casos. A continuación, se muestran los resultados en la **Figura 27**.

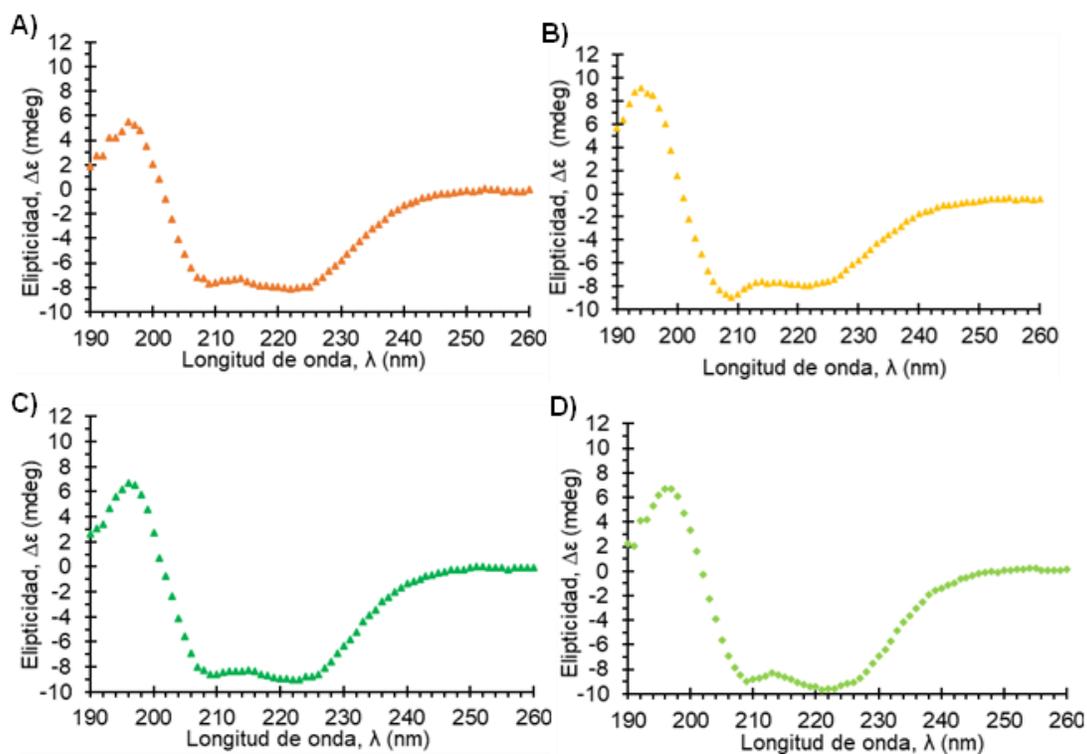


Figura 27. Espectros de dicroísmo circular de las proteínas de fusión: **A)** dCas9 – FKBP; **B)** dCas9 – FRB; **C)** dCas12a – FKBP (tomadas de Calcines Cruz et al., 2021); **D)** dCas12a – FRB.

En la **Figura 28** se puede observar los resultados teóricos de Cas9 y Cas12a comparados con los valores experimentales de las proteínas inactivas dCas9 y dCas12a tomados de nuestra colaboradora Arroyo Rabasa, 2021. Los valores teóricos fueron calculados con los archivos pdb de las proteínas Cas9 (5F9R) y Cas12a (5KK5), mediante una aplicación para la generación de espectros de dicroísmo circular a partir de coordenadas atómicas de proteínas llamado PDBMD2CD (Drew, E. D., & Janes, R. W., 2020). En esta comparación se puede observar un ligero desplazamiento de los puntos máximos y mínimos entre el espectro calculado y el experimental, estas diferencias pueden ser debido a que el espectro calculado es un resultado teórico y puede tener cierto grado de error.

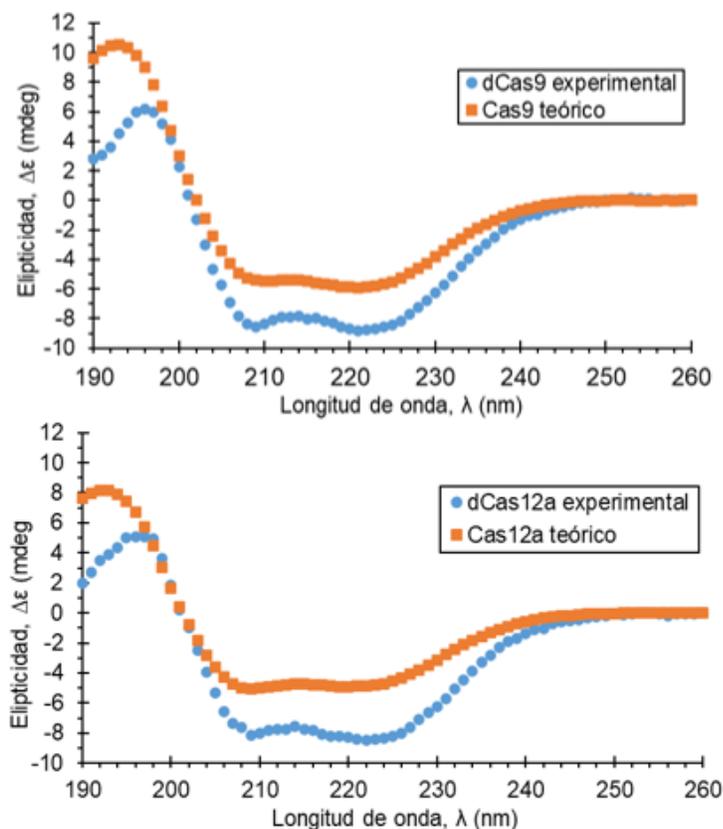


Figura 28. Espectro de dicroísmo circular de la proteína dCas9 y dCas12a comparado con Cas9 y Cas12a teórico (Arroyo Rabasa, 2021).

RESULTADOS

En la **Figura 29 y 30**, al comparar los resultados de las proteínas recombinantes con los espectros experimentales de dCas9 y dCas12a (Arroyo Rabasa, 2021)., se observa que el punto máximo fue muy similar para las proteínas de dCas9 de 196 nm a 195 nm, y en el caso de las proteínas con dCas12a no hubo ninguna diferencia quedándose así en 197 nm. Los puntos mínimos se mantuvieron casi similares en 209 nm y 222 nm. Además, se visualiza una disminución en la $\Delta\epsilon$ de los puntos máximos y mínimos de las proteínas recombinantes con FKBP, contrario al aumento en los máximos y mínimos de las proteínas con FRB. Esto puede ser debido a la estructura secundaria de las proteínas FKBP y FRB. Como se había mencionado anteriormente, FKBP tiene una estructura secundaria de lámina β y FRB tiene una estructura de hélice α . Por lo que en el caso de las proteínas con FRB al ser hélice α la estructura predominante, en el espectro se puede observar la tendencia a aumentar los máximos y mínimos característicos de la estructura hélice α . Al contrario de las proteínas recombinantes con FKBP, donde al tener una estructura de lámina plegada β , se disminuye la señal característica de hélice α . En resumen, ambas gráficas comparativas demuestran la tendencia de las proteínas recombinantes a tener una estructura secundaria de hélice α , lo cual demuestra que se tiene la estructura deseada.

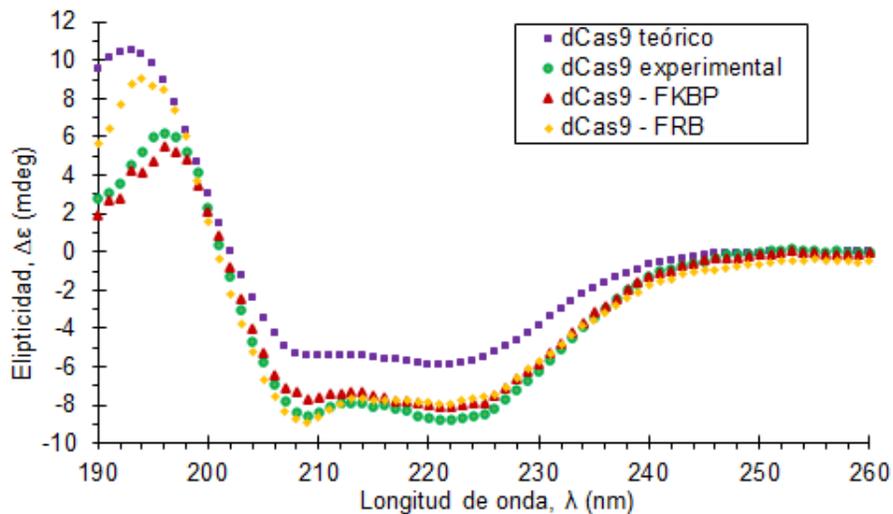


Figura 29. Comparación de espectros de dicroísmo circular de las proteínas recombinantes dCas9 – FKBP y dCas9 – FRB, comparados con la proteína dCas9 experimental (Arroyo Rabasa, 2021)., y el valor teórico de la proteína Cas9.

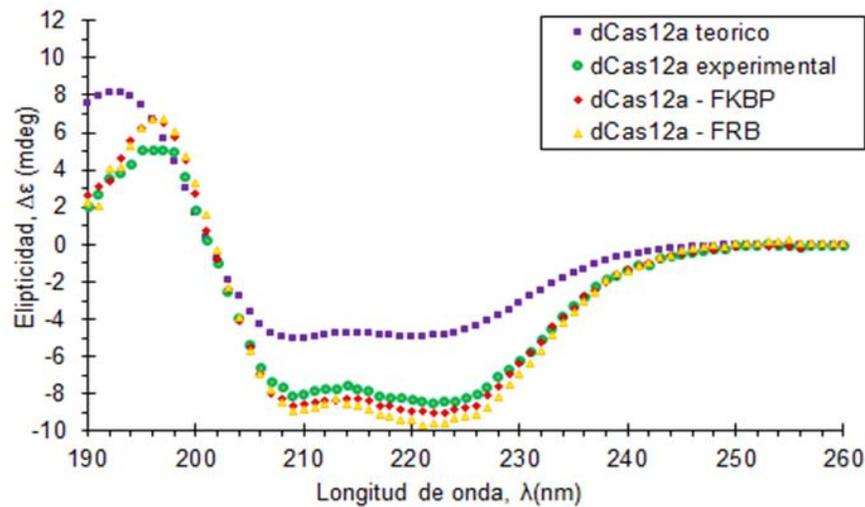


Figura 30. Comparación de espectros de dicroísmo circular de las proteínas recombinantes dCas12a – FKBP (Calcines-Cruz *et al.* 2021) y dCas12a – FRB, comparados con la proteína dCas12a experimental (Arroyo Rabasa, 2021)., y el valor teórico de la proteína Cas12a.

Para observar las interacciones de las proteínas de fusión con la rapamicina se realizaron ensayos de unión en DLS para observar el incremento del tamaño de las partículas al momento en el que se dimerizan. Al comienzo se realizaron controles para medir que efectivamente no existe interacción alguna entre los monómeros con la rapamicina. Los resultados se muestran a continuación en las **Figura 31**. En esta figura se puede observar la tendencia de las proteínas recombinantes a mantenerse en el diámetro hidrodinámico promedio de 11.7 nm sin rapamicina y no hay un incremento significativo de diámetro con rapamicina. Lo cual significa que no hay una dimerización de las proteínas recombinantes cuando estas son aisladas unas de otras y en presencia de rapamicina. Después de realizar los controles, se realizó el análisis de los dímeros con la rapamicina y sin la rapamicina (**Figura 32**).

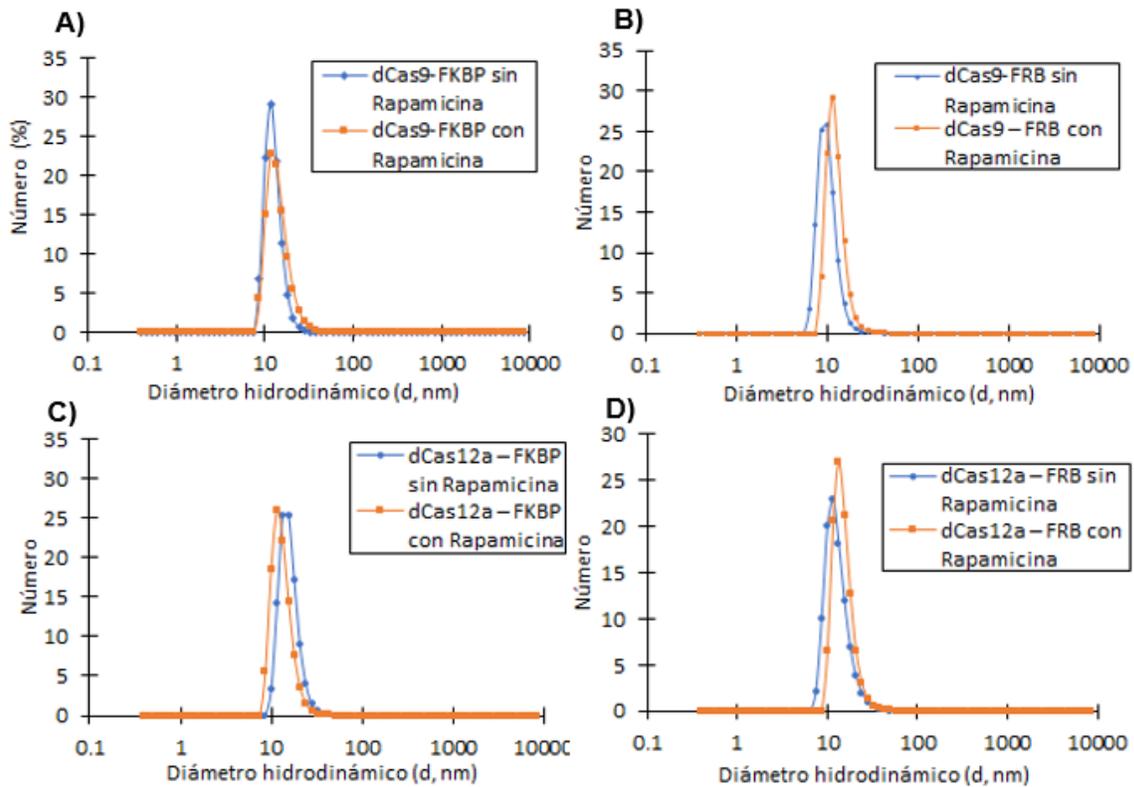


Figura 31. Distribución de tamaño por intensidad de: **A)** dCas9 – FKBP con y sin Rapamicina; **B)** dCas9 – FRB con y sin Rapamicina; **C)** dCas12a – FKBP con y sin Rapamicina; **D)** dCas12a – FRB con y sin Rapamicina.

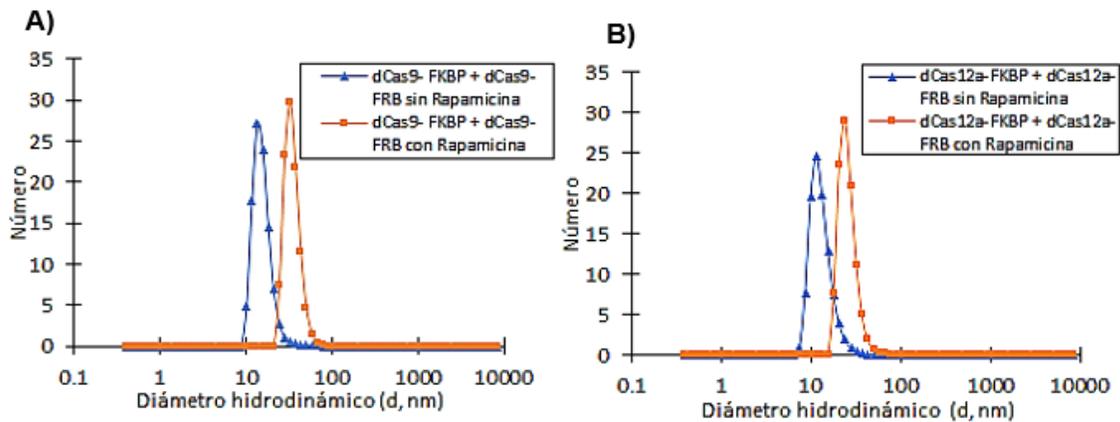


Figura 32. Distribución de tamaño por intensidad de: **A)** dCas9 – FKBP con dCas9 – FRB, con y sin Rapamicina; **B)** dCas12a – FKBP con dCas12a – FRB, con y sin Rapamicina.

En la **Figura 32**, cuando la muestra no tiene rapamicina se observa un diámetro hidrodinámico de 13.5 nm en el caso de las proteínas de fusión con dCas9 y 11.7 nm con las proteínas de dCas12a. Cuando se agrega la rapamicina es cuando se observa un

aumento de diámetro hidrodinámico de 28.2 nm en el caso de las proteínas con dCas9 y 24.4 nm para las proteínas con dCas12a. Por lo que en este experimento se demuestra que las proteínas no dimerizan entre si al menos de estar en presencia de rapamicina y con la contraparte del sistema, ya sea FKBP con FRB o viceversa.

8.7 Obtención del ADN objetivo y ARN guía

El templado de ADN se produjo mediante un corte con enzimas de restricción de un plásmido de 10,933 pb para obtener una secuencia de 2119 pb, la cual tiene un sitio de reconocimiento PAM para dCas9 – FKBP y otro sitio de reconocimiento PAM para dCas12a – FRB con una distancia de 2032 pb entre cada una. Esta secuencia se observa en la **Figura 33**. Después se purificó por extracción de DNA en agarosa y se corrió otro gel para verificar el tamaño. Este gel se muestra en la **Figura 35**.

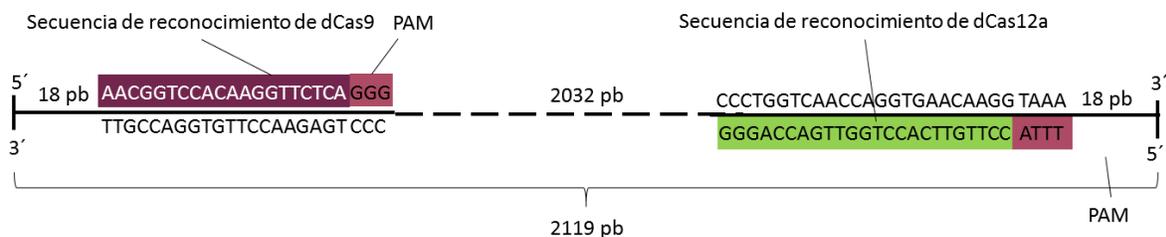


Figura 33. Templado de ADN con un sitio de unión para dCas9 y dCas12a.

En el caso del ARN guía, primero se diseñó tomando en consideración el templado de ADN obtenido. Debido a que después de la secuencia PAM que está en el templado, se encuentra la secuencia de reconocimiento para dCas9 y dCas12a. Esta secuencia se llama secuencia objetivo y es muy importante para que las proteínas dCas se unan al templado de ADN. Tomando esto en cuenta, a la secuencia objetivo se le agregó las regiones constantes del ARN guía para dCas9 o dCas12a y se diseñaron los oligos pertinentes para poder obtener esta secuencia mediante una PCR (**Revisar oligonucleótidos en Tabla 10 y 11, Anexo 1**) Al realizar la PCR se obtuvieron templados de ADN equivalentes a la secuencia de ARN guía. Al final a estos templados de ADN equivalente se les realizó la transcripción in vitro para obtener el ARN guía deseado (**Figura 34**).

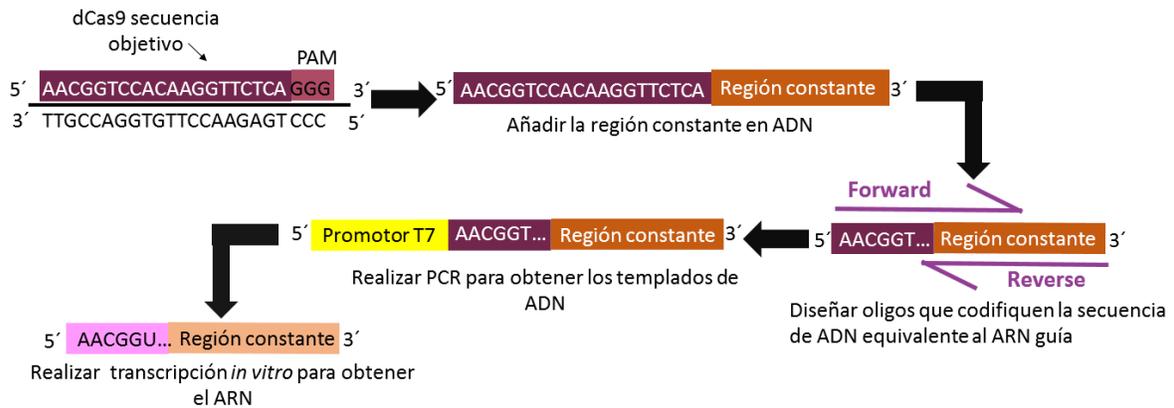


Figura 34. Ejemplo metodológico del diseño del ARN guía para dCas9.

En la **Figura 36**, se muestra el gel de UREA-PAGE de los ARN guía, con peso de ~110 nt para ARNg (dCas9) y de ~40 nt para ARNg (dCas12a). Estos resultados muestran una pequeña variación en el peso esperado de los ARNs producidos, 102 nt para ARNg (dCas9) y de 44 nt para ARNg (dCas12a). Esto se le atribuye al hecho de que la corrida fue hecha con un marcador de peso para DNA y no para ARN; por lo que a pesar de tener una ligera desviación en el tamaño se puede afirmar que se obtuvieron los ARN guías diseñados.

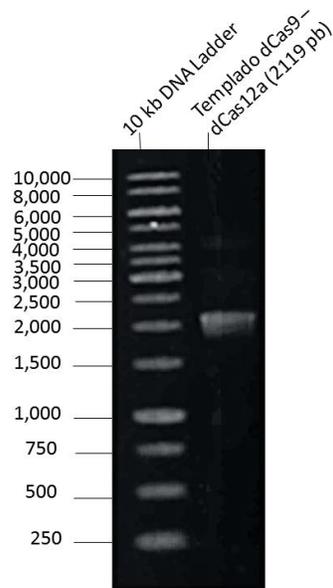


Figura 35. Gel de agarosa 1%, del Templado de ADN con un sitio de unión para dCas9 y dCas12a.

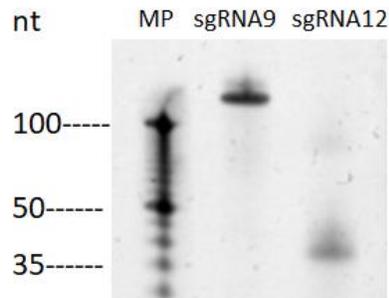


Figura 36. Gel UREA- PAGE, comprobación de transcripción de sgRNA.

8.8 Ensayos de unión con DNA (EMSA)

Finalmente, se realizó un ensayo EMSA con las proteínas dCas9 – FKBP y dCas12a – FRB para probar la unión de los dímeros con la rapamicina y con el ADN. En este ensayo se juntaron las proteínas de fusión con una relación de 1:1 de proteína. Se mezclaron los dímeros con el buffer y después se agregó la rapamicina. Cabe destacar que la cantidad de rapamicina fue variando desde 30 μ M, 1 μ M hasta 100 μ M. Al final se agregó el templado de ADN con una relación 1:3 a cada muestra. Los resultados se muestran en la **Figura 37 y 38**.

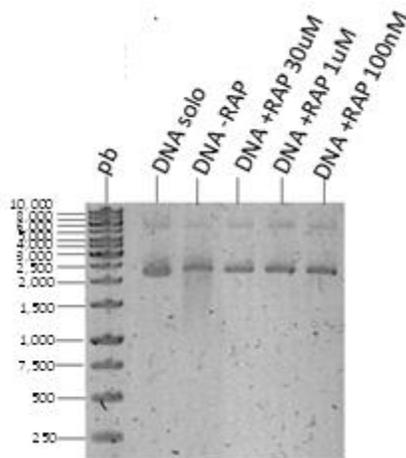


Figura 37. Gel de agarosa 1% del Templado de ADN en prueba con Rapamicina y las proteínas dCas9 – FKBP y dCas12a – FRB. Donde DNA solo significa el templado de ADN sin muestra, DNA – RAP significa el ADN con las proteínas de fusión pero sin rapamicina, DNA + RAP significa el templado de ADN más las proteínas de fusión y una concentración de Rapamicina de 30 μ M, 1 μ M y 100 nM.

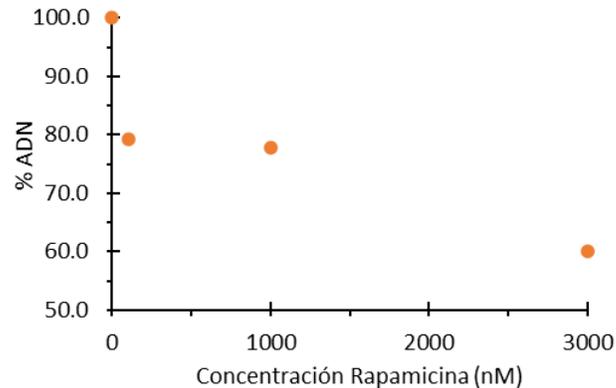


Figura 38. Análisis gráfico del porcentaje de ADN presente en las muestras de EMSA aumentando la concentración de Rapamicina.

Al analizar la **Figura 37**, se observa que en el carril de “DNA solo” se encuentra una ligera banda contaminante a las 6,000 pb, esta banda se encontrará como constante en todas las muestras debido a que el DNA ya venía contaminado de origen. Quitando eso de lado, la banda que representa el templado de ADN se encuentra alrededor de las 2,000 pb y esta banda sufre un ligero desplazamiento cuando se le agrega las proteínas de fusión. Se cree que este desplazamiento se debe a la unión de las proteínas de fusión con el templado de ADN. Sin embargo, al agregar la rapamicina en las siguientes muestras no se observa algún cambio significativo en la banda ni siquiera un desplazamiento a pesar de haber variado la cantidad de Rapamicina en cada muestra y haber mantenido las cantidades de templado de ADN y proteínas de fusión. Este problema pudo haber sido por varias razones, entre ellas que al agregar primero la Rapamicina a las proteínas de fusión, estas proteínas se hayan unido entre sí y al momento de agregar el templado de ADN su unión a este se haya complicado, ya que dCas9 se trataría de unir a una sección mientras que dCas12a se trataría de unir a otra. Haciendo que el dímero luchara por unirse a dos secuencias constantemente, terminando así en una unión inestable. También se cree que el tamaño del templado de ADN no era el adecuado, ya que al ser más grande que 2,000 pb había una gran distancia entre las secuencias de unión y esto complicaría aún más la estabilidad de unión al dímero. Por lo que se propone que para ver un gran desplazamiento del ADN en presencia de rapamicina, se tendría que realizar con un templado de ADN más pequeño e ir variando las porciones de templado al igual que de rapamicina. O también puede ser que la técnica empleada no haya sido la correcta, por lo que se propone verificar por ensayos de AFM o cortinas de ADN.

En la **Figura 38**, se observa un análisis cuantitativo de la cantidad de templado de ADN en las muestras de acuerdo con el aumento de cantidad de rapamicina. La primera muestra que tiene el 100% de templado es la de "ADN – Rap" , la segunda sería la de 100 nM, seguido de 1 uM y al final la de 30 uM de rapamicina. Este análisis nos demuestra que la cantidad de templado de ADN disminuyó conforme se aumentaba la cantidad de rapamicina. Sin embargo, en el gel no es observable el desplazamiento del ADN ya que era muy poca la cantidad que se desplazaba o que se desnaturalizaba, porque también puede ser una posibilidad. Estos resultados no son concluyentes y al existir varios factores que podrían haber alterado el experimento, se propone repetirlo de nuevo pero cambiando las variantes ya mencionadas o intentar otra técnica más favorecedora.

9. CONCLUSIONES

En conclusión, el diseño de las proteínas de fusión dCas9–FKBP, dCas9–FRB y dCas12a–FRB que se propuso al inicio de este proyecto fue desarrollado exitosamente. Lo cual aumenta la cantidad de herramientas similares a dCas12a–FKBP (Calcines-Cruz *et al.* 2021) Desde la comprobación de secuencia de las proteínas de fusión, la producción y purificación de cada una de ellas se logró de forma satisfactoria. Obteniendo así una purificación mayor al 90% en cada una y con rendimiento entre a 1.61 – 2.24 mg/L. Sin embargo, en cada parte del proceso se perdió gran cantidad de la proteína deseada, por lo cual una mejora en el método podría ser buscar maneras diferentes de realizar las cromatografías, sobre todo el primer paso de la purificación, el cual fue la cromatografía de afinidad con Ni-NTA. Puesto que la cromatografía casi no eliminó impurezas y fue la técnica en la que se perdió la mayor cantidad de proteína.

Los resultados de caracterización con dicroísmo circular verificaron que la estructura secundaria de cada una de las proteínas de fusión es la deseada, debido a que su estructura predominante fue hélice α , la cual es característica de las proteínas dCas9 y dCas12a (Swarts & Jinek 2018). Además de que coinciden los puntos mínimos y máximos de las gráficas experimentales con las teóricas. Lo cual sugiere que se mantuvieron las estructuras iniciales de las proteínas dCas (junto con sus características) además que se agregaron las características de los dominios de fusión FKBP y FRB.

También se verificó que se mantuviera la propiedad de dimerización de las proteínas de fusión mediante DLS. Esta técnica midió la actividad de unión de las proteínas recombinantes, demostrando que sin rapamicina no aumentaban su tamaño, y que al agregar la rapamicina las proteínas de fusión con FKBP y FRB duplicaron su tamaño de partícula. Verificando así que existe una unión entre dímeros solo en presencia de la rapamicina.

Sobre el diseño y obtención de los ARN guía, se puede afirmar que se obtuvieron los ARN guías diseñados gracias al método utilizado en este proyecto, el cual es una forma más económica, simple y efectiva para producirlos *in vitro* en comparación con la compra comercial de los ARN guía directamente. Además de que te da la oportunidad de variar la secuencia objetivo y dirigirlos a cualquier sitio específico sobre el templado de ADN.

10. PERSPECTIVAS Y AVANCES

En este proyecto faltó la realización de los ensayos DLS entre las proteínas de fusión dCas9 – FKBP y dCas12a –FRB; dCas9 – FRB y dCas12a –FKBP por falta de tiempo. Al igual que faltó agregar la unión de los dímeros con la rapamicina y el templado de ADN, ya que los experimentos realizados no demostraron los resultados que se esperaban. Sin embargo, el siguiente paso que se propone realizar es los ensayos de DLS faltantes, así como la realización de diferentes experimentos EMSA variando sus condiciones (cambiar las distancias entre proteínas conjugadas, modificar concentración de: ADN, proteína recombinante, ARNg, sales, temperatura, tiempo de reacción), al igual que se propone variar el tamaño del templado de ADN a uno más pequeño ya que el templado usado era muy grande y era imperceptible el cambio. Todos estos cambios se proponen para observar que factor influye en la eficiencia de unión de las proteínas con el ADN y la Rapamicina. También se propone realizar otros experimentos como el de AFM y de cortinas de ADN con las proteínas recombinantes para poder verificar si existe interacción molecular entre ellas. De acuerdo con lo anterior, a continuación, se exponen algunos avances que se han realizado.

Los ensayos de DLS se realizaron también para la fusión de proteínas dCas9-FKBP + dCas12a- FRB, dCas9-FRB + dCas12a- FKBP y los resultados fueron positivos. Demostrando así que también tienen el mismo comportamiento de duplicar el tamaño de partícula al agregar la rapamicina solo cuando está en presencia de los dímeros.

Los ensayos EMSA se realizaron con las proteínas dCas9 y dCas12a purificadas, es decir sin tener los dominios FKBP y FRB, utilizando otro templado más pequeño para verificar la unión al ADN. Demostrando resultados positivos en su unión (Arroyo Rabasa, 2021). Por lo que se intuye que se podría ensayar la unión de las proteínas recombinantes al ADN con un templado más corto para verificar su interacción.

Además, cabe agregar que la proteína dCas12a – FKBP de nuestro colaborador Calcines-Cruz fue utilizada para la realización de ensayos de unión a cortinas de ADN con un tamaño de 48.5 kbp y múltiples sitios de unión a dCas12a, demostrando así que la unión de las proteínas de fusión al ADN es posible (Calcines-Cruz *et al.*, 2021).

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Dey, S., Fan, C., Gothelf, K., Li, J., Lin, C., & Liu, L. et al. (2021). DNA origami. *Nature Reviews Methods Primers*, 1(1).
2. Ehud Gazit. (2007). Introduction: Nanobiotechnology and Bionanotechnology. *Plenty of Room for Biology at the Bottom*, 1–15.
3. Becker, S., & Boch, J. (2021). TALE and TALEN genome editing technologies. *Gene And Genome Editing*, 2, 100007.
4. Seeman, N. (1982). Nucleic acid junctions and lattices. *Journal Of Theoretical Biology*, 99(2), 237-247.
5. Niemeyer, C. M. (2005). DNA-Protein Nanostructures. *Nanobiotechnology*, 1(3), 227–243.
6. Hernandez-Garcia, A. (2021). Strategies to Build Hybrid Protein–DNA Nanostructures. *Nanomaterials*, 11(5), 1332.
7. Hell, S., Sahl, S., Bates, M., Zhuang, X., Heintzmann, R., & Booth, M. et al. (2015). The 2015 super-resolution microscopy roadmap. *Journal Of Physics D: Applied Physics*, 48(44), 443001.
8. Stephanopoulos, N. (2020). Hybrid Nanostructures from the Self-Assembly of Proteins and DNA. *Chem*, 6(2), 364-405.
9. Praetorius, F., & Dietz, H. (2017). Self-assembly of genetically encoded DNA-protein hybrid nanoscale shapes. *Science*, 355(6331), eaam5488.
10. Mak, A., Bradley, P., Bogdanove, A., & Stoddard, B. (2013). TAL effectors: function, structure, engineering and applications. *Current Opinion In Structural Biology*, 23(1), 93-99.
11. Koonin, E., & Makarova, K. (2019). Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1772), 20180087.
12. Long, C., Li, H., Tiburcy, M., Rodriguez-Caycedo, C., Kyrychenko, V., & Zhou, H. et al. (2018). Correction of diverse muscular dystrophy mutations in human engineered heart muscle by single-site genome editing. *Science Advances*, 4(1).
13. Broughton, J., Deng, X., Yu, G., Fasching, C., Servellita, V., & Singh, J. et al. (2020). CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature Biotechnology*, 38(7), 870-874.
14. Chen, T., Wardill, T., Sun, Y., Pulver, S., Renninger, S., & Baohan, A. et al. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458), 295-300.

15. Amitai, G., & Sorek, R. (2016). CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nature Reviews Microbiology*, 14(2), 67-76.
16. Nishimasu, H., Ran, F., Hsu, P., Konermann, S., Shehata, S., & Dohmae, N. et al. (2014). Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*, 156(5), 935-949.
17. Stella, S., Alcón, P. & Montoya, G. (2017). Structure of the Cpf1 endonuclease R-loop complex after target DNA cleavage. *Nature* 546, 559–563.
18. Knight, S., Xie, L., Deng, W., Guglielmi, B., Witkowsky, L., & Bosanac, L. et al. (2015). Dynamics of CRISPR-Cas9 genome interrogation in living cells. *Science*, 350(6262), 823-826.
19. Nakade, S., Yamamoto, T., & Sakuma, T. (2017). Cas9, Cpf1 and C2c1/2/3—What's next?. *Bioengineered*, 8(3), 265-273.
20. Fonfara, I., Richter, H., Bratovič, M., Le Rhun, A., & Charpentier, E. (2016). The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*, 532(7600), 517-521.
21. Sternberg, S., Redding, S., Jinek, M. et al. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507, 62–67.
22. Swarts, D., van der Oost, J., & Jinek, M. (2017). Structural Basis for Guide RNA Processing and Seed-Dependent DNA Targeting by CRISPR-Cas12a. *Molecular Cell*, 66(2), 221-233.
23. Wang, H., La Russa, M., & Qi, L. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annual Review Of Biochemistry*, 85(1), 227-264.
24. Zetsche, B., Gootenberg, J., Abudayyeh, O., Slaymaker, I., Makarova, K., & Essletzbichler, P. et al. (2015). Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell*, 163(3), 759-771.
25. Inobe, T., & Nukina, N. (2016). Rapamycin-induced oligomer formation system of FRB–FKBP fusion proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(1), 40–46.
26. Choi, J., Chen, J., Schreiber, S., & Clardy, J. (1996). Structure of the FKBP12–Rapamycin Complex Interacting with Binding Domain of Human FRAP. *Science*, 273(5272), 239-242.
27. Tong, M., & Jiang, Y. (2015). FK506-Binding Proteins and Their Diverse Functions. *Current Molecular Pharmacology*, 9(1), 48-65.

28. Chaurasia, S., Pieraccini, S., De Gonda, R., Conti, S., & Sironi, M. (2013). Molecular insights into the stabilization of protein–protein interactions with small molecule: The FKBP12–rapamycin–FRB case study. *Chemical Physics Letters*, 587, 68-74.
29. Calcines-Cruz, C. Finkelstein, I., & Hernández-García, A. (2021) CRISPR-Guided Programmable Self – Assembly of Artificial Virus-Like Nucleocapsids. *NanoLetters*, 21(7), 2752-2757.
30. Arroyo Rabasa, L. A. (2021). Biosíntesis y purificación de proteínas CRISPR-dCas y su posicionamiento sobre templados de ADN con control nanométrico. *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Química, U.N.A.M., México.
31. Lee, S. and Lee, H. (2016). *ACS Central Science*, 2(8), pp.506-516.
32. 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.
33. Addgene: Protocols (2020). *Addgene*. Retrieved October 28, 2020, from <https://www.addgene.org/>
34. Cold Spring Harbor Protocols (2022). Retrieved 18 June 2022, from <http://cshprotocols.cshlp.org/>
35. Chen, X., Zaro, J. L., & Shen, W.-C. (2013). Fusion protein linkers: Property, design and functionality. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(10), 1357–1369.
36. Vojta, A., Dobrinić, P., Tadić, V., Bočkor, L., Korać, P., Julg, B., Klasić, M., & Zoldoš, V. (2016). Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 44(12), 5615–5628.
37. New England Biolabs. (2020). *Reagents For the Life sciences Industry | NEB*. Retrieved October 28, 2020, from <https://international.neb.com/>
38. Mohanraju, P., Oost, J., Jinek, M., & Swarts, D. (2018). Heterologous Expression and Purification of the CRISPR-Cas12a/Cpf1 Protein. *Bioprotocol*, 8(9).
39. Finkelstein, I. (2022). The Finkelstein Lab. *Finkelsteinlab.org*. Retrieved 18 June 2018, from <https://finkelsteinlab.org/>
40. Brahms, S., & Brahms, J. (1980). Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *Journal Of Molecular Biology*, 138(2), 149-178.
41. Cadena-Nava, R., Comas-Garcia, M., Garmann, R., Rao, A., Knobler, C., & Gelbart, W. (2011). Self-Assembly of Viral Capsid Protein and RNA Molecules of Different Sizes:

Requirement for a Specific High Protein/RNA Mass Ratio. *Journal Of Virology*, 86(6), 3318-3326.

42. Mavridis, L., & Janes, R. (2016). PDB2CD: a web-based application for the generation of circular dichroism spectra from protein atomic coordinates. *Bioinformatics*, 33(1), 56-63.

43. Drew, E. D., & Janes, R. W. (2020). PDBMD2CD: providing predicted protein circular dichroism spectra from multiple molecular dynamics-generated protein structures. *Nucleic Acids Research*, 48(1), 17–24.

44. Swarts, D. C., & Jinek, M. (2018). Cas9 versus Cas12a/Cpf1: Structure-function comparisons and implications for genome editing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 9(5), e1481.

12. ANEXO 1

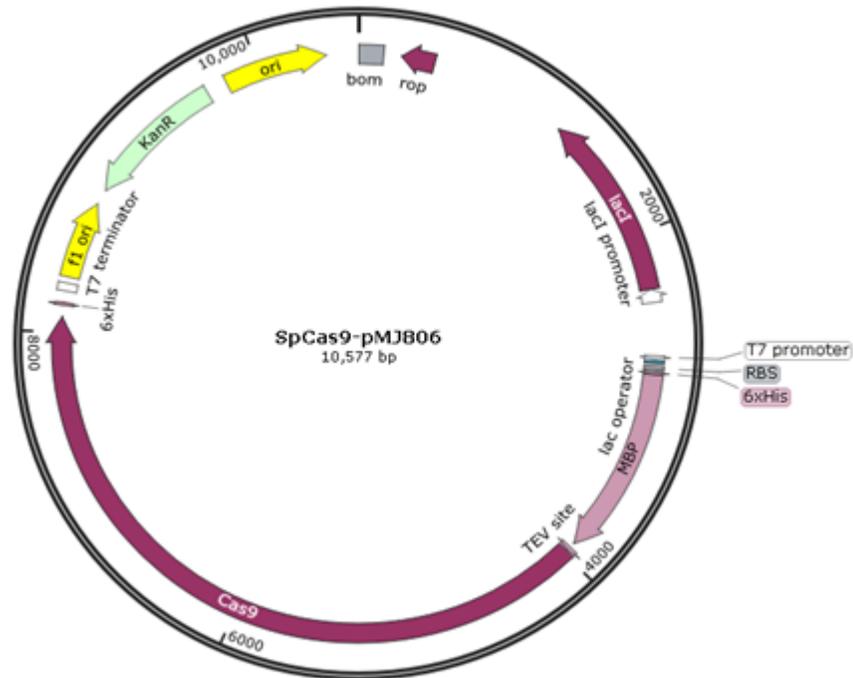


Figura 39. Mapa secuencial del plásmido SpCas9-pMJ806 (dCas9).

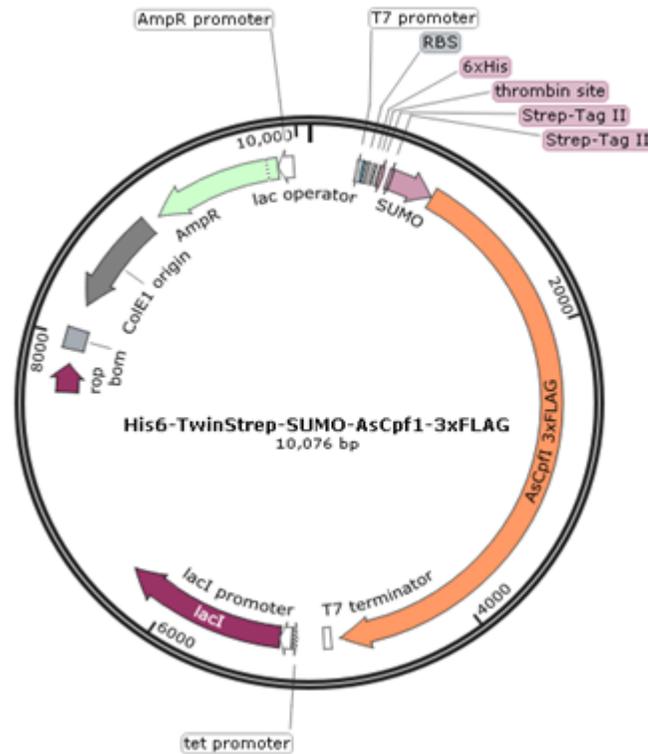


Figura 40. Mapa secuencial del plásmido His6-TwinStrep-SUMO-AsCpf1-3xFLAG (dCas12a)

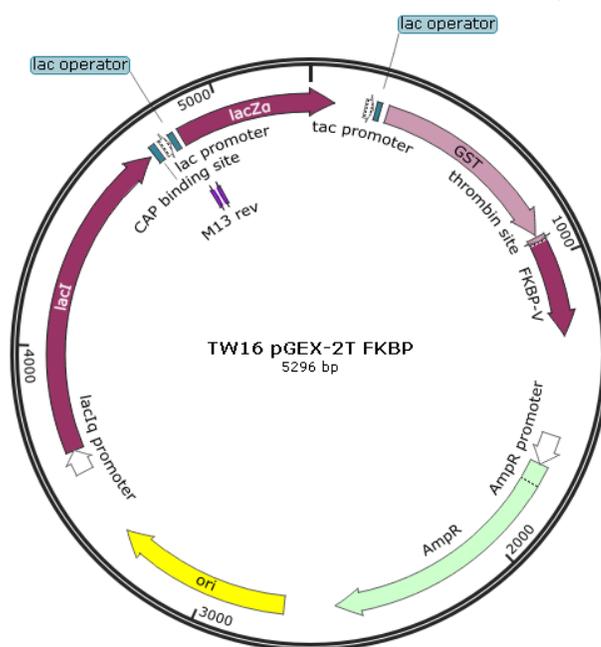


Figura 41. Mapa secuencial del plásmido TW16-pGEX-2T-FKBP (FKBP12)

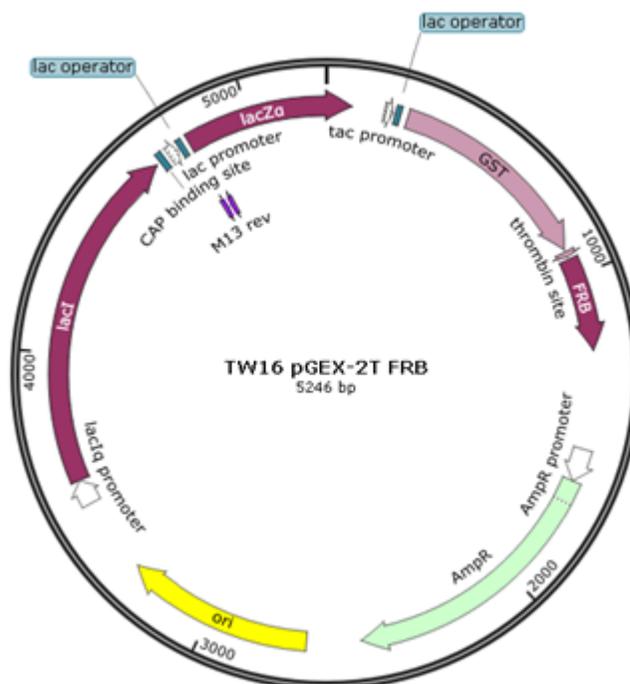


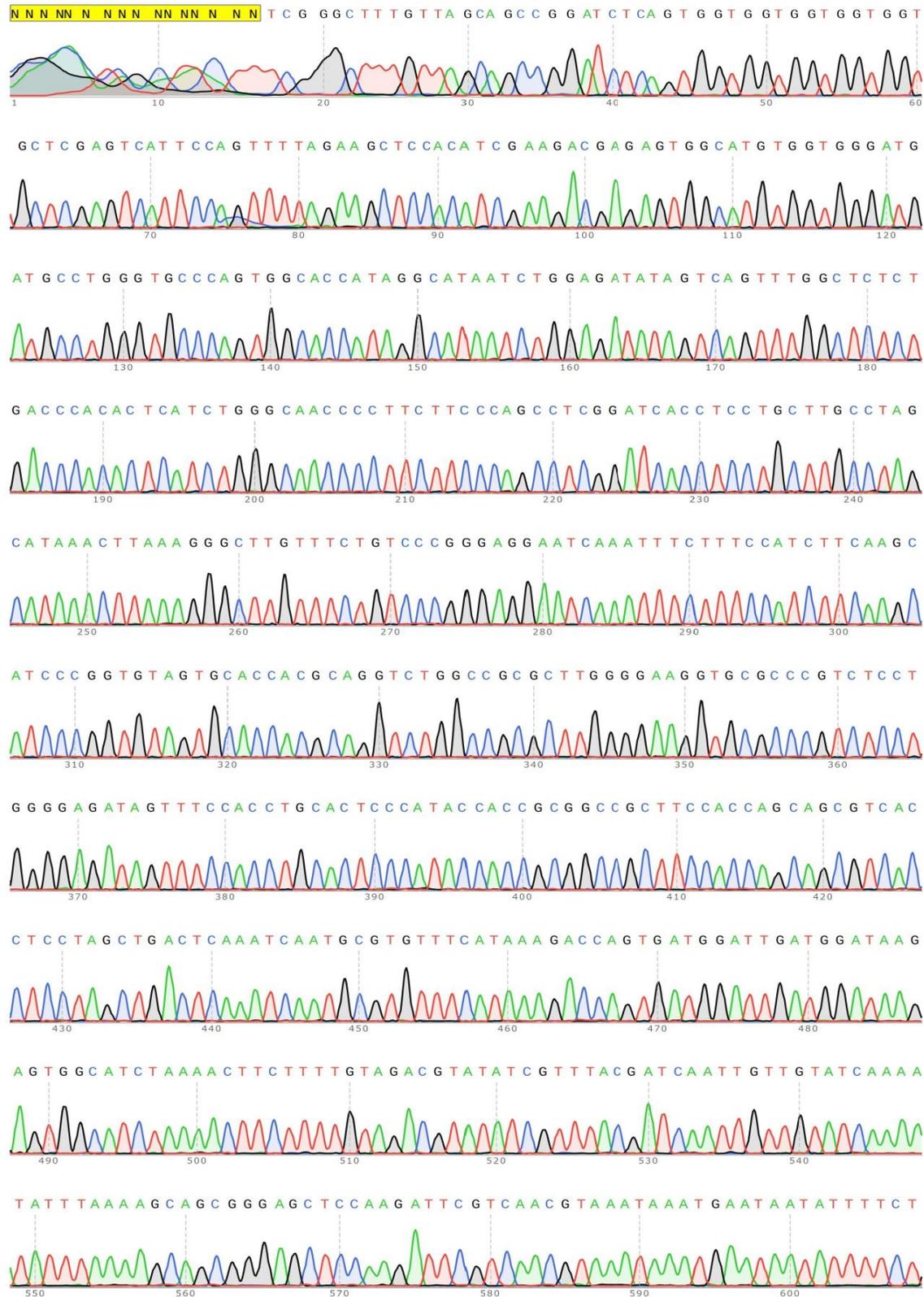
Figura 42. Mapa secuencial del plásmido TW16 pGEX-2T FRB (FRB)

Tabla 8. Oligonucleótidos usados en la PCR para dCas9 y dCas12a

Nombre		Secuencia 5' - 3'
dCas9_ PCR	Fwd	TCATTAGGTACCTACCATGATTTGC
	Rev	ATAGAAGCGGCCGC TTCCACCAGCAGCGTCACCTCCTAGCTGACTCAAAT C
dCas12 a_PCR	Fwd	TTCCCCTCTAGA AATAATTTTGT TTA ACTTTAAG
	Rev	ATAGAAGCGGCCGC TTCCACCAGCAGCATTGCGCAGTTCCTGAATATATG

Tabla 9. Oligonucleótidos usados en la PCR para dCas9 y dCas12a

Nombre		Secuencia 5' - 3'
FKBP_ PCR	Fwd	AGTAGAGCGGCCGCGGTGGTATGGGAGTGCAGGTGGAAAC
	Rev	AGTAGACTCGAGTCATTCCAGTTTTAGAAGCTCCAC
FRB_ PCR	Fwd	AGTAGAGCGGCCGCGGTGGTCGAGTGGCCATCCTCTGG
	Rev	AGTAGACTCGAGCTACTGCTTTGAGATTCGTCCG



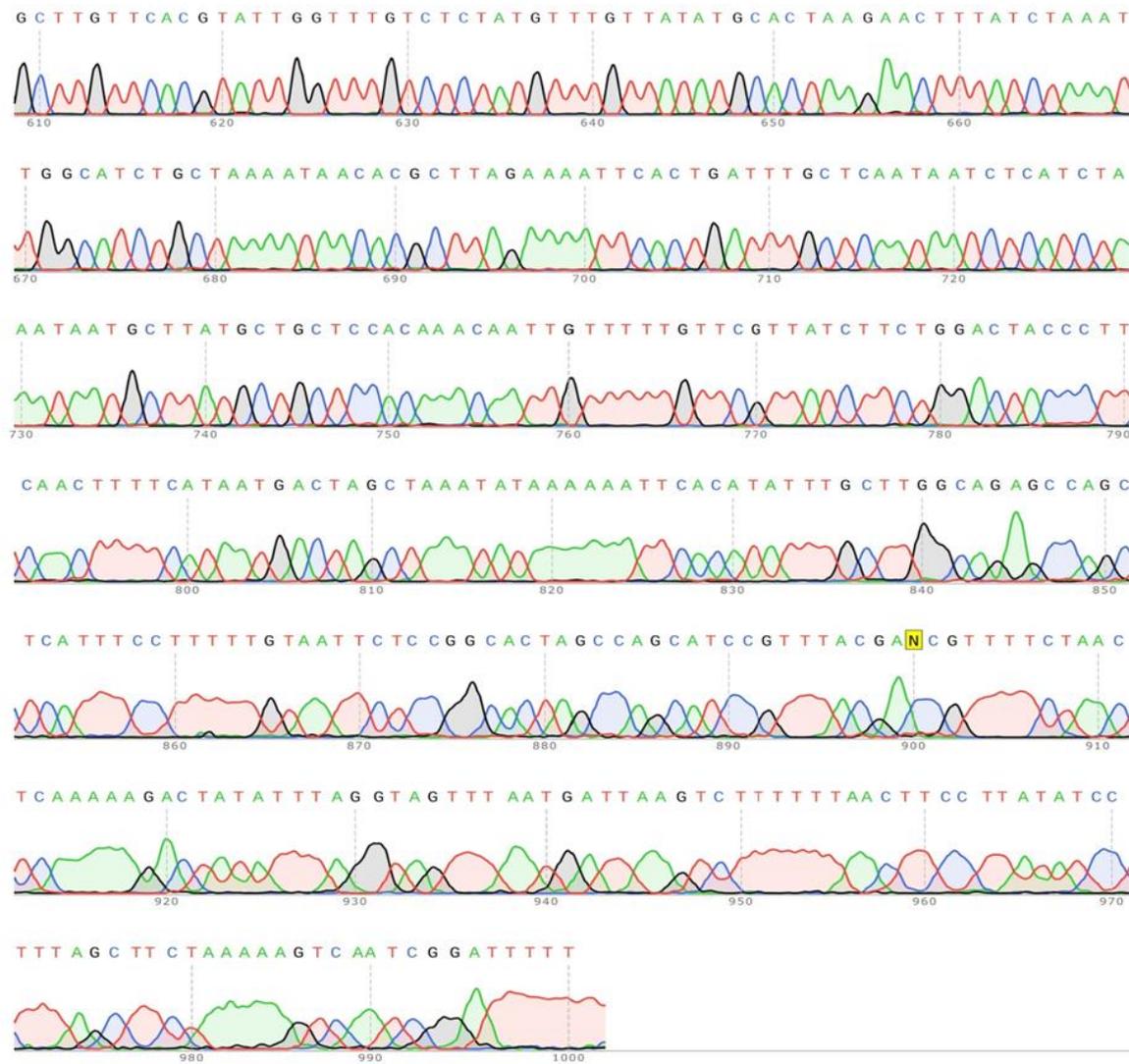


Figura 43. Secuenciación del segmento de dCas9 – FKBP (~1000 pares de base).

GAAAGAAGTTCCTTTGAAAAAATCCGATTGACTTTTTAGAAAGCTAAAGGATATAAGGAAGTTAAAAA
 CTTTCTTCAAGGAAACTTTTTAGGCTAACTGAAAAATCTTCGATTTCTATATTCCTTCAATTTTT
 TTTTAGGCTAACTGAAAAATCTTCGATTTCTATATTCCTTCAATTTTT
 1170 1175 1180 1185 1190
 E R S S F E K N P I D F L E A K G Y K E V K K
 Cas9

7560

GACTTAATCATTAACCTAACCTAAATATAGTCTTTTTGAGTTAGAAAACGGTCGTAAACGGATGCTGGCTA
 CTGAATTAGTAATTTGATGGATTTATATCAGAAAAACTCAATCTTTGCCAGCATTTGCCACGACCGAT
 CTGAATTAGTAATTTGATGGATTTATATCAGAAAAACTCAATCTTTGCNAGCATTTGCCTACGACCGAT
 1195 1200 1205 1210 1215
 D L I I K L P K Y S L F E L E N G R K R M L A
 Cas9

7630

GTGCCGAGAAATTACAAAAAGGAAATGAGCTGGCTCTGCCAAGCAAATATGTGAATTTTTATATTTAGC
 CACGGCTCTTAATGTTTTCTTTACTCGACCGAGACGGTTCGTTTATACACTTAAAAAATATAAATCG
 CACGGCTCTTAATGTTTTCTTTACTCGACCGAGACGGTTCGTTTATACACTTAAAAAATATAAATCG
 1220 1225 1230 1235
 S A G E L Q K G N E L A L P S K Y V N F L Y L A
 Cas9

7700

TAGTCATTATGAAAAGTTGAAAGGGTAGTCCAGAAGATAACGAACAAAAACAATTTGTTGTGGAGCAGCAT
 ATCAGTAATACTTTTCAACTTCCCATCAGGCTTCTATTGCTTGTTTTGTTAACAAACACCTCGTCGTA
 ATCAGTAATACTTTTCAACTTCCCATCAGGCTTCTATTGCTTGTTTTGTTAACAAACACCTCGTCGTA
 1240 1245 1250 1255 1260
 S H Y E K L K G S P E D N E Q K Q L F V E Q H
 Cas9

7770

AAGCATTATTTAGATGAGATTATTGAGCAAATCAGTGAATTTTCTAAGCGTGTTATTTTAGCAGATGCCA
 TTCGTAATAAATCTACTCTAATAACTCGTTTAGTCACTTAAAAGATTTCGCACAATAAATCGTCTACGGT
 TTCGTAATAAATCTACTCTAATAACTCGTTTAGTCACTTAAAAGATTTCGCACAATAAATCGTCTACGGT
 1265 1270 1275 1280 1285
 K H Y L D E I I E Q I S E F S K R V I L A D A
 Cas9

7840

ATTTAGATAAAGTTCCTTAGTGATATAACAAACATAGAGACAAACCAATACGTGAACAAGCAGAAAATAT
 TAAATCTATTTCAAGAATCACGTATATTGTTTGTATCTCTGTTTGGTTATGCACTTGTTCGTCTTTATA
 TAAATCTATTTCAAGAATCACGTATATTGTTTGTATCTCTGTTTGGTTATGCACTTGTTCGTCTTTATA
 1290 1295 1300 1305
 N L D K V L S A Y N K H R D K P I R E Q A E N I
 Cas9

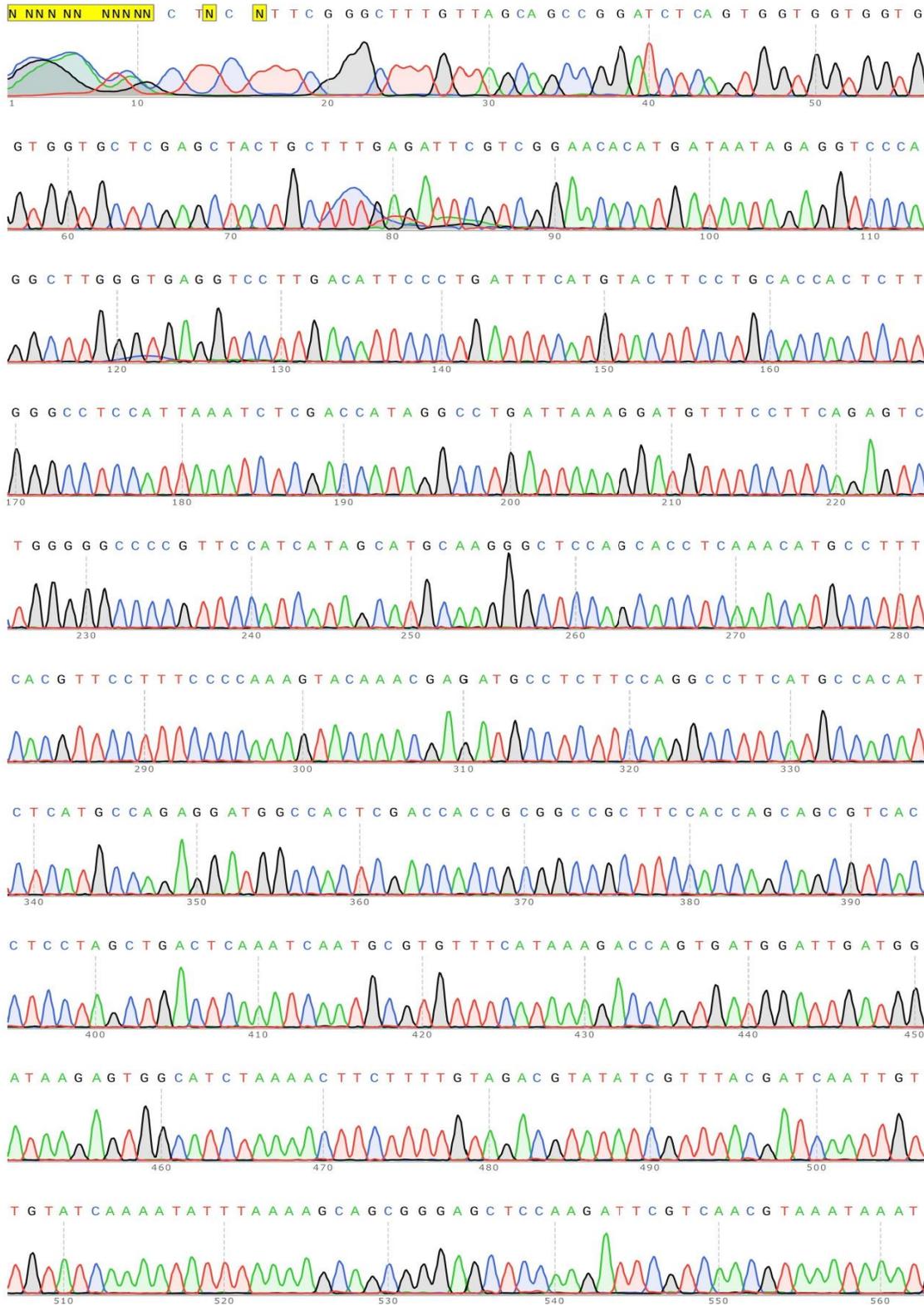
7910

TATTCATTTATTTACGTTGACGAATCTTGGAGCTCCCGCTGCTTTTAAATATTTTGATACAACAATTGAT
 ATAAGTAAATAAATGCAACTGCTTAGAACCTCGAGGGCGACGAAAATTTATAAAACTATGTTGTTAACTA
 ATAAGTAAATAAATGCAACTGCTTAGAACCTCGAGGGCGACGAAAATTTATAAAACTATGTTGTTAACTA
 1310 1315 1320 1325 1330
 I H L F T L T N L G A P A A F K Y F D T T I D
 Cas9

7980

CGTAAACGATATACGCTACAAAAAAGTTTTAGATGCCACTTATCCATCAATCCATCACTGGTCTTT
 GCATTTGCTATATGCAGATGTTTTCTCAAAAATCTACGGTGAGAATAGGTAGTTAGGTAGTGACCCAGAAA
 GCATTTGCTATATGCAGATGTTTTCTCAAAAATCTACGGTGAGAATAGGTAGTTAGGTAGTGACCCAGAAA
 1335 1340 1345 1350 1355
 R K R Y T S T K E V L D A T L I H Q S I T G L
 Cas9

8050



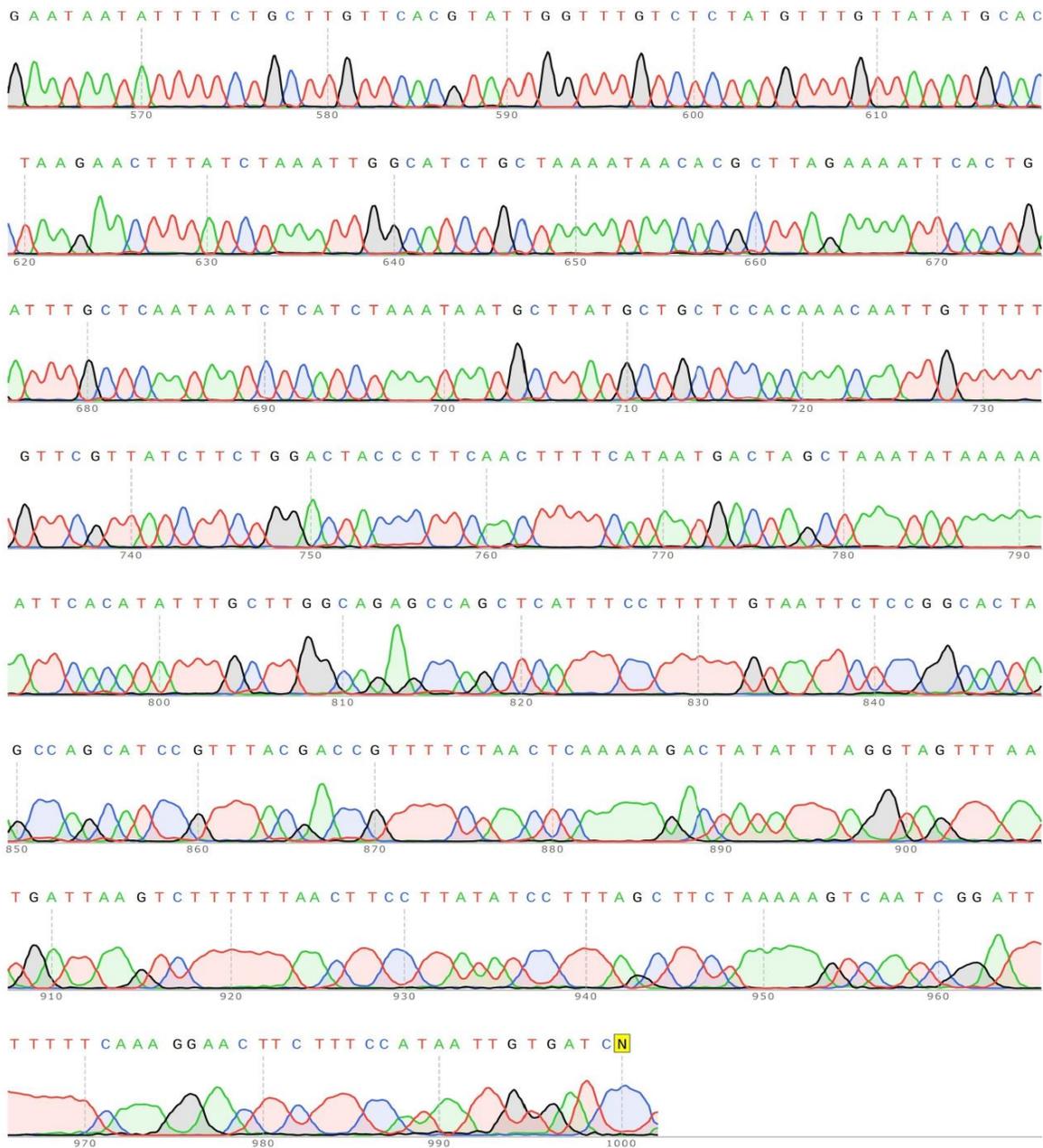


Figura 45. Secuenciación del segmento de dCas9 – FRB (~1000 pares de base).

AGGGATCACAAATTATGGAAAGAAGTTCCTTTGAAAAAATCCGATTGACTTTTTAGAAGCTAAAG
 TCCCTAGTGTTAATACCTTTCTTCAAGGAAACTTTTTTTAGGCTAACTGAAAAATCTTCGATTTCC
 1165 1170 1175 1180 1185
 G I T I M E R S S F E K N P I D F L E A K
 Cas9

GATATAAGGAAGTAAAAAGACTTAATCATTAACTACCTAAATATAGTCTTTTTGAGTTAGAA
 CTATATTCCTCAATTTTTCTGAATTAGTAATTTGATGGATTTATATCAGAAAACTCAATCTT
 1190 1195 1200 1205
 G Y K E V K K D L I I K L P K Y S L F E L E
 Cas9

AACGGTCGTAACCGGATGCTGGCTAGTGCCGGAGAATTACAAAAAGGAAATGAGCTGGCTCTGCC
 TTGCCAGCATTGGCTACGACCGATCACGGCCTCTTAATGTTTTTCCTTTACTCGACCGAGACGG
 1210 1215 1220 1225
 N G R K R M L A S A G E L Q K G N E L A L P
 Cas9

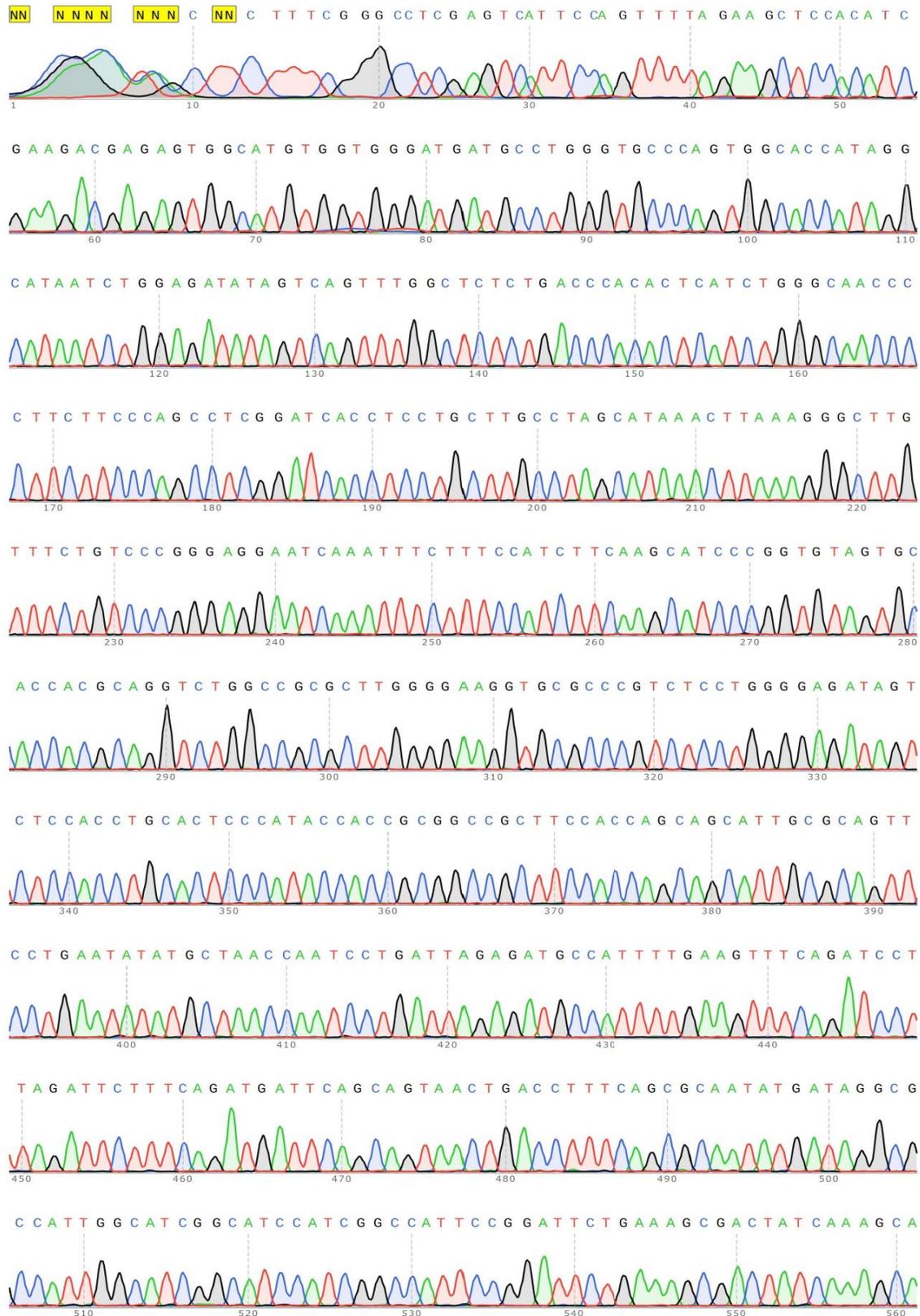
AAGCAAATATGTGAATTTTTATATTTAGCTAGTCATTATGAAAAGTTGAAGGGTAGTCCAGAAG
 TTCGTTTATACACTTAAAAAATAAAATCGATCAGTAATACTTTTCAACTTCCCATCAGGTCTTC
 1230 1235 1240 1245 1250
 S K Y V N F L Y L A S H Y E K L K G S P E
 Cas9

ATAACGAACAAAAACAATTGTTTGTGGAGCAGCATAAGCATTATTTAGATGAGATTATTGAGCAA
 TATTGCTTGTTTTTGTTAAACAAACCTCGTCTGTTTCGTAATAAATCTACTCTAATAACTCGTT
 1255 1260 1265 1270
 D N E Q K Q L F V E Q H K H Y L D E I I E Q
 Cas9

ATCAGTGAAATTTTCTAAGCGTGTTATTTTAGCAGATGCCAATTTAGATAAAGTTCTTAGTGCATA
 TAGTCACTTAAAAGATTCGCACAATAAAATCGTCTACGGTTAAATCTATTTCAAGAATCACGTAT
 1275 1280 1285 1290
 I S E F S K R V I L A D A N L D K V L S A Y
 Cas9

TAACAAACATAGAGACAAACCAATACGTGAACAAGCAGAAAAATATTATTCATTTATTTACGTTGA
 ATTGTTTGTATCTCTGTTTGTTATGCACTTGTTCTGTTTATAATAAGTAAATAAATGCAACT
 1295 1300 1305 1310 1315
 N K H R D K P I R E Q A E N I I H L F T L
 Cas9

CGAATCTTGGAGCTCCCGCTGCTTTTAAATATTTTGATACAACAATTGATCGTAAACGATATACG
 GCTTAGAACCTCGAGGGCGACGAAAATTTATAAACTATGTTGTTAACTAGCATTGCTATATGC
 1320 1325 1330 1335
 T N L G A P A A F K Y F D T T I D R K R Y T
 Cas9



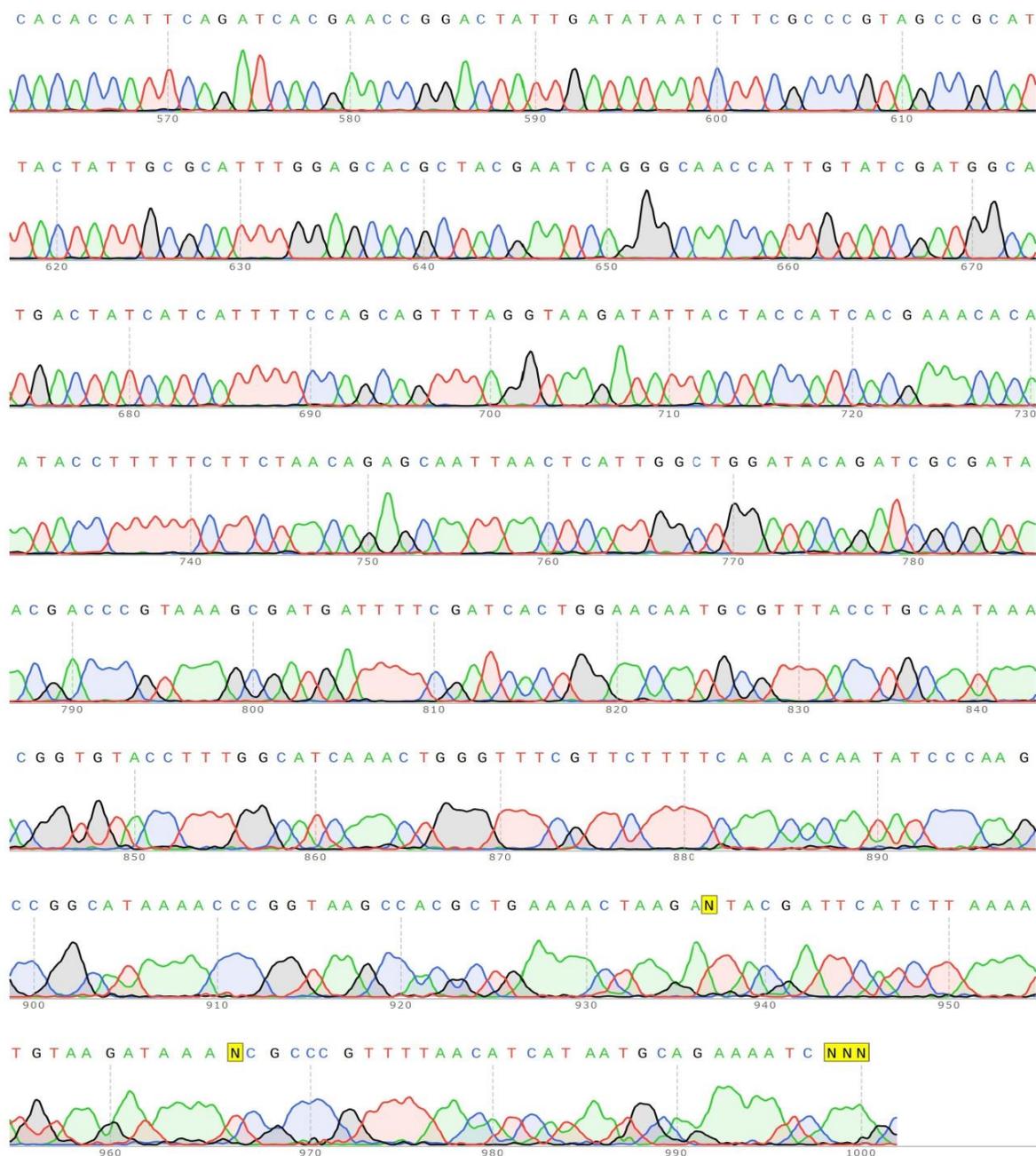
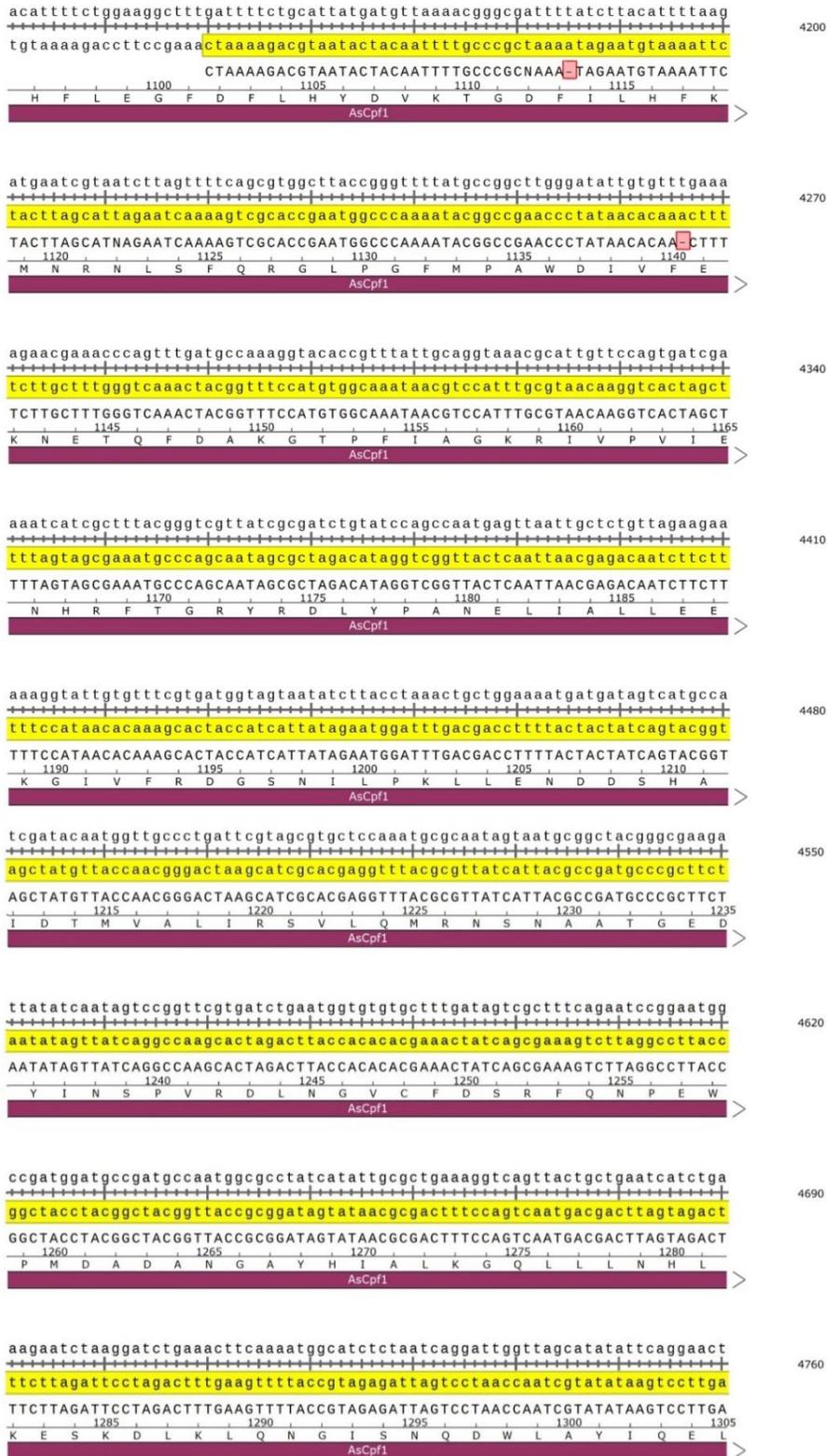


Figura 47. Secuenciación del segmento de dCas12a – FKBP (~1000 pares de base).



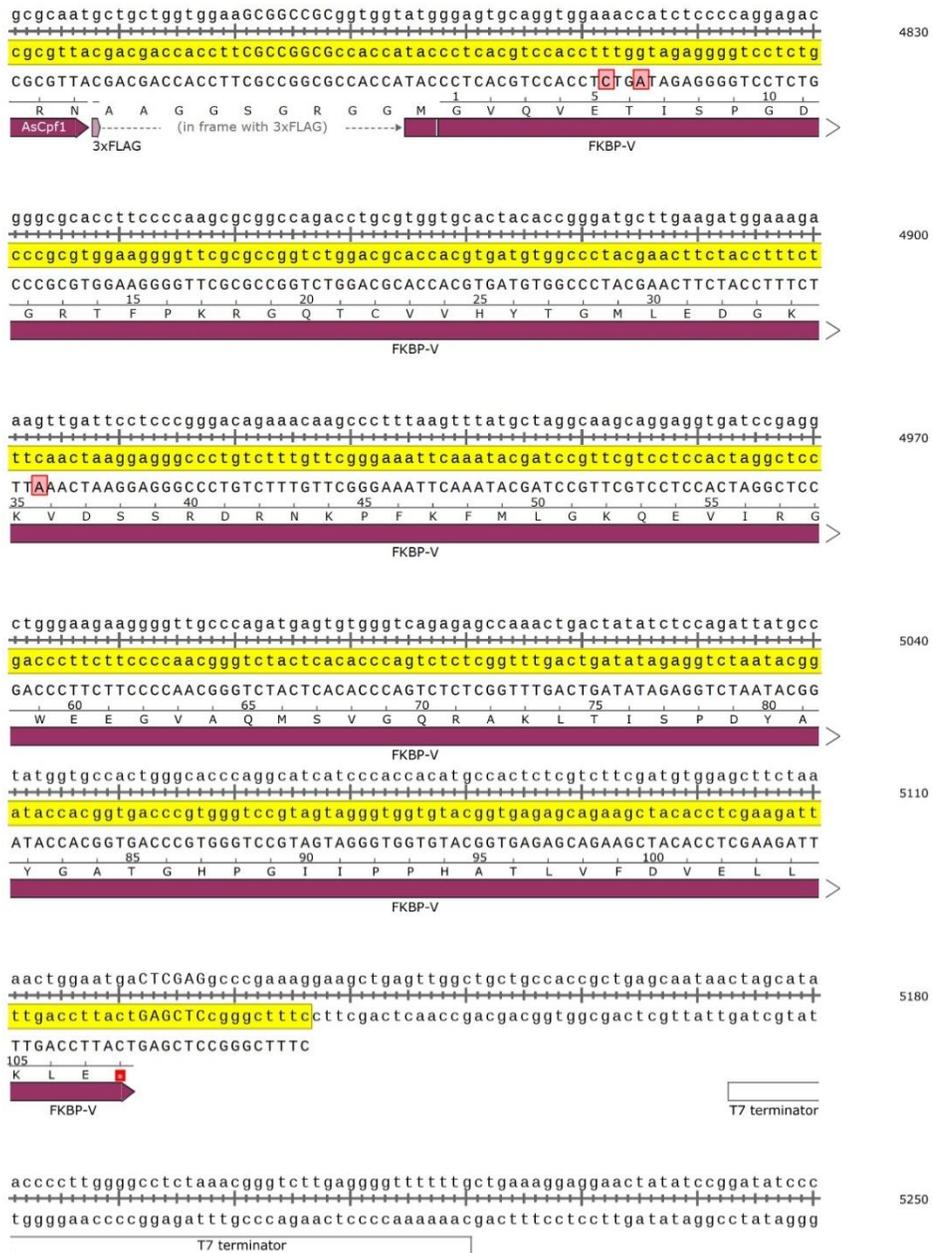
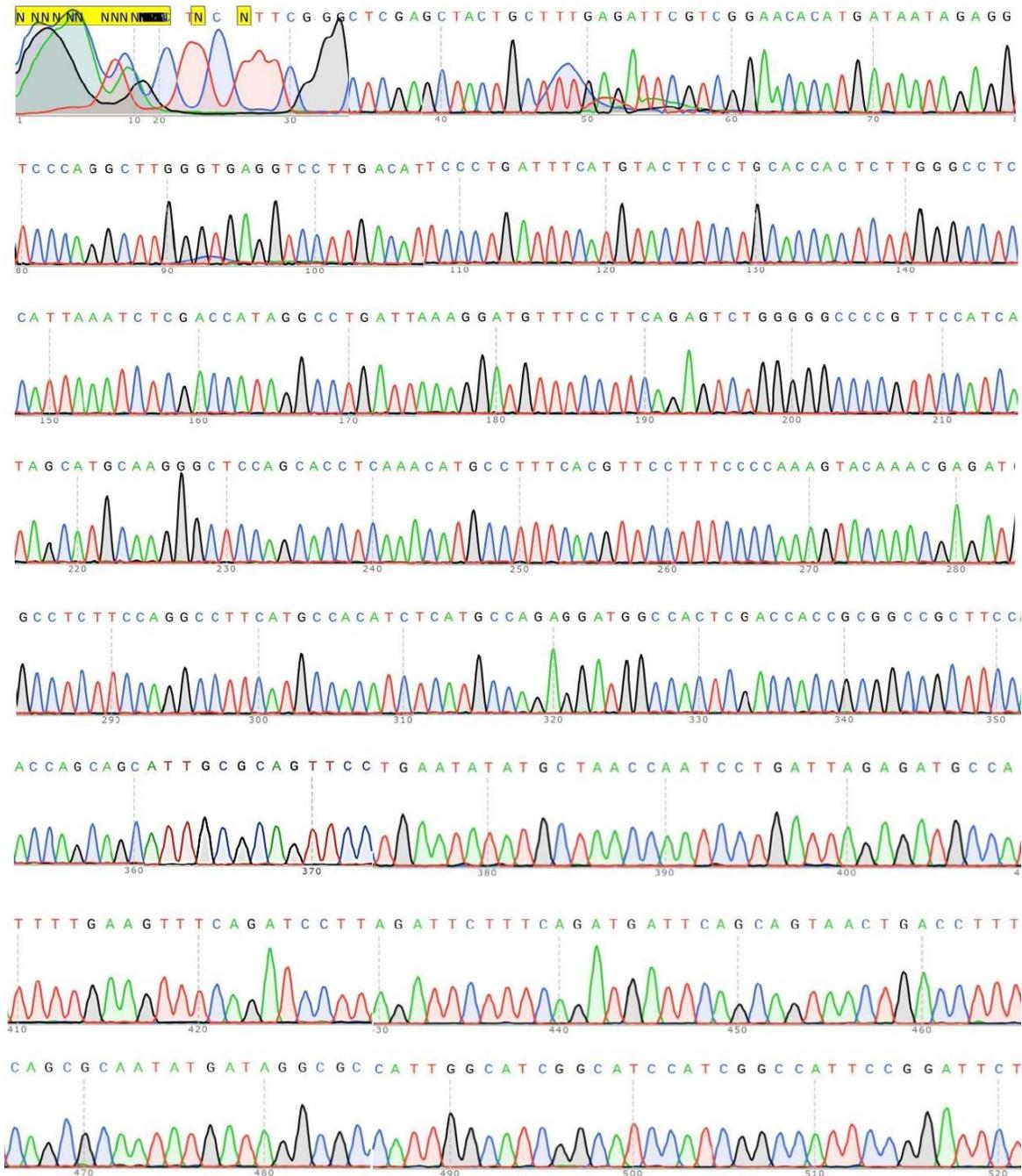


Figura 48. Alineamiento de la secuencia dCas12a – FKBP (~1000 pares de base).



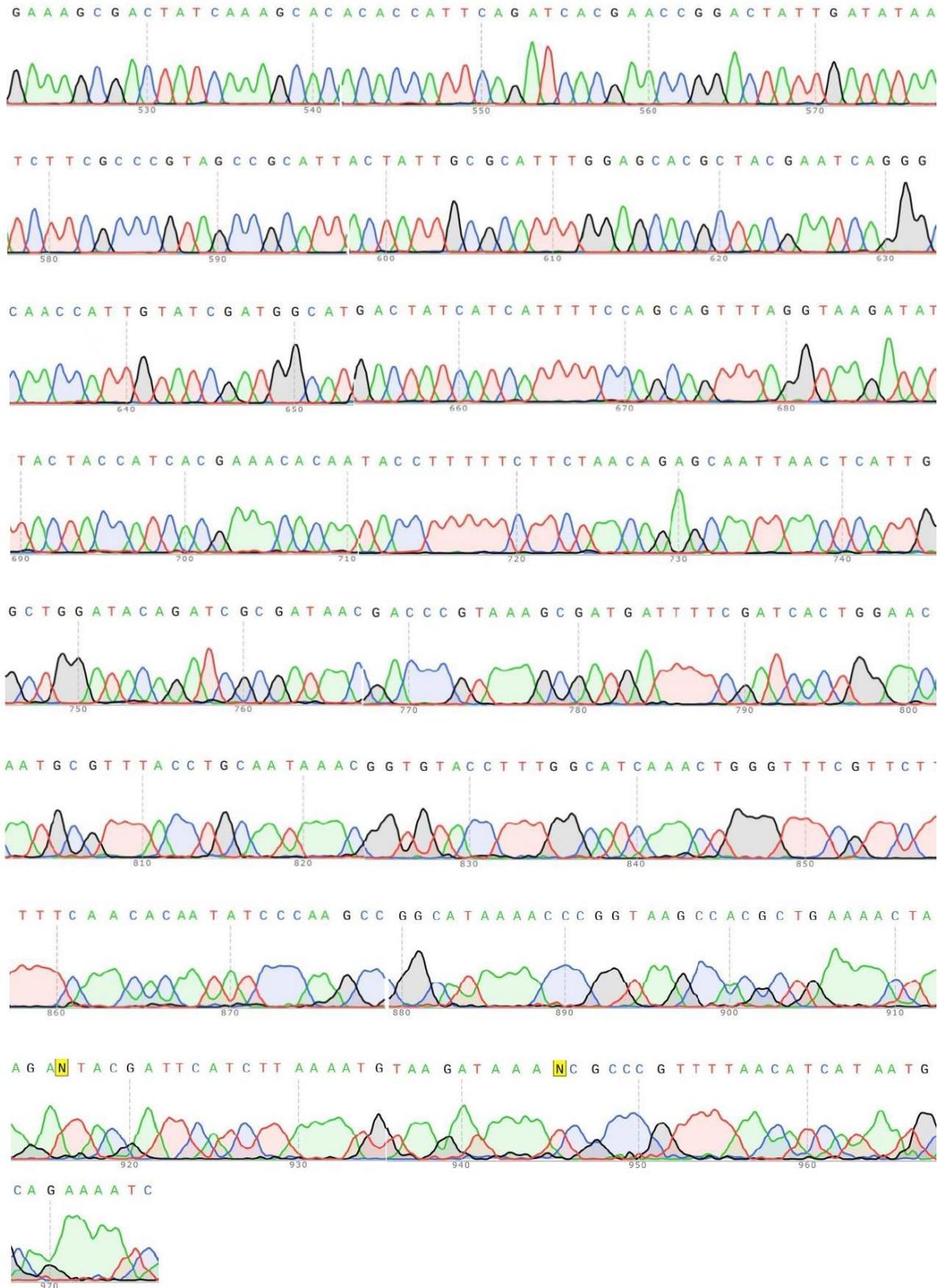


Figura 49. Secuenciación del segmento de dCas12a – FRB (~1000 pares de base).

acat t t t c t g g a a g g c t t t g a t t t t c t g c a t t a t g a t g t t a a a c g g g c g a t t t t a t c t t a c a t t t t a a g
 t g t a a a a g a c c t t c c g a a a c t a a a a g a c g t a a t a c t a c a a t t t t g c c g c t a a a a t a g a a t g t a a a t t c
 c t a a a g a c g t a a t a c t a c a a t t t t g c c g c N a a a t a g a a t g t a a a t t c
 H F L E G F D F L H Y D V K T G D F I L H F K
 AsCpf1

4200

a t g a a t c g t a a t c t t a g t t t t c a g c g t g g c t t a c c g g g t t t a t g c c g g c t t g g g a t a t t g t g t t g a a a
 t a c t t a g c a t t a g a a t c a a a a g t c g c a c c g a a t g g c c a a a a t a c g g c c g a a c c c t a t a a c a c a a a c t t t
 t a c t t a g c a t N a g a a t c a a a a g t c g c a c c g a a t g g c c a a a a t a c g g c c g a a c c c t a t a a c a c a a c t t t
 M N R N L S F Q R G L P G F M P A W D I V F E
 AsCpf1

4270

a g a a c g a a a c c c a g t t t g a t g c c a a a g g t a c a c c g t t a t t g c a g g t a a a c g c a t t g t t c c a g t g a t c g a
 t c t t g c t t t g g g t c a a a c t a c g g t t t c c a t g t g g c a a a t a a c g t c c a t t t g c g t a a c a a g g t c a c t a g c t
 t c t t g c t t t g g g t c a a a c t a c g g t t t c c a t g t g g c a a a t a a c g t c c a t t t g c g t a a c a a g g t c a c t a g c t
 K N E T Q F D A K G T P F I A G K R I V P V I E
 AsCpf1

4340

a a a t c a t c g c t t a c g g g t c g t t a t c g c g a t c t g t a t c a g c c a a t g a g t t a a t t g c t c t g t t a g a a g a a
 t t t a g t a g c g a a a t g c c a g c a a t a g c g t a g a c a t a g g t c g g t t a c t c a a t t a a c g a g a c a a t c t t c t t
 t t t a g t a g c g a a a t g c c a g c a a t a g c g t a g a c a t a g g t c g g t t a c t c a a t t a a c g a g a c a a t c t t c t t
 N H R F T G R Y R D L Y P A N E L I A L L E E
 AsCpf1

4410

a a a g g t a t t g t g t t c g t g a t g g t a g t a a t a t c t t a c c t a a a c t g c t g g a a a t g a t g a t a g t c a t g c c a
 t t t c c a t a a c a c a a a g c a c t a c c a t c a t t a t a g a a t g g a t t t g a c g a c c t t t a c t a c t a t c a g t a c g g t
 t t t c c a t a a c a c a a a g c a c t a c c a t c a t t a t a g a a t g g a t t t g a c g a c c t t t a c t a c t a t c a g t a c g g t
 K G I V F R D G S N I L P K L L E N D D S H A
 AsCpf1

4480

t c g a t a c a a t g g t t g c c c t g a t t c g t a g e g t g c t c c a a a t g c g c a a t a g t a a t g c g g c t a c g g g c g a a g a
 a g c t a t g t t a c c a a c g g g a c t a a g c a t c g c a c g a g g t t t a c g c g t t a t c a t t a c g c c g a t g c c c g c t t c t
 a g c t a t g t t a c c a a c g g g a c t a a g c a t c g c a c g a g g t t t a c g c g t t a t c a t t a c g c c g a t g c c c g c t t c t
 I D T M V A L I R S V L Q M R N S N A A T G E D
 AsCpf1

4550

t t a t a t c a a t a g t c c g g t t c g t g a t c t g a a t g g t g t g c t t t g a t a g t c g c t t c a g a a t c c g g a a t g g
 a a t a t a g t t a t c a g g c c a a g c a c t a g a c t t a c c a c a c a c g a a a c t a t c a g c g a a a g t c t t a g g c c t t a c c
 a a t a t a g t t a t c a g g c c a a g c a c t a g a c t t a c c a c a c a c g a a a c t a t c a g c g a a a g t c t t a g g c c t t a c c
 Y I N S P V R D L N G V C F D S R F Q N P E W
 AsCpf1

4620

c g a t g g a t g c c g a t g c c a a t g g c g c c a t c a t a t t g c g c t g a a a g g t c a g t t a c t g c t g a a t c a t c t g a
 g g c t a c c t a c g g c t a c g g t t a c c g c g g a t a g t a t a a c g c g a c t t t c c a g t c a a t g a c g a c t t a g t a g a c t
 g g c t a c c t a c g g c t a c g g t t a c c g c g g a t a g t a t a a c g c g a c t t t c c a g t c a a t g a c g a c t t a g t a g a c t
 P M D A D A N G A Y H I A L K G Q L L L N H L
 AsCpf1

4690

a a g a a t c t a a g g a t c t g a a a c t t c a a a t g g c a t c t c t a a t c a g g a t t g g t t a g c a t a t a t t c a g g a a c t
 t t c t t a g a t t c c t a g a c t t t g a a g t t t t a c c g t a g a g a t t a g t c c t a a c c a a t c g t a t a t a a g t c c t t g a
 t t c t t a g a t t c c t a g a c t t t g a a g t t t t a c c g t a g a g a t t a g t c c t a a c c a a t c g t a t a t a a g t c c t t g a
 K E S K D L K L Q N G I S N Q D W L A Y I Q E L
 AsCpf1

4760

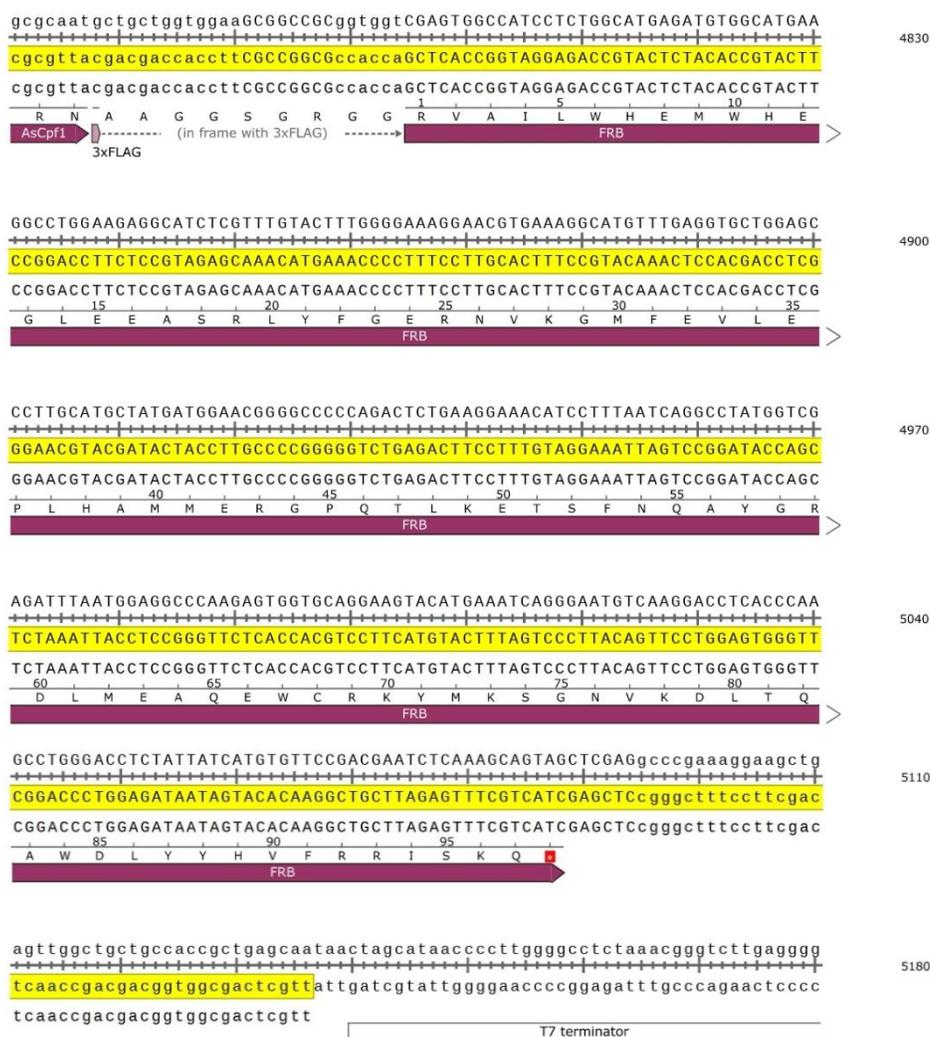


Figura 50. Alineamiento de la secuencia dCas12a – FRB (~1000 pares de base).

Tabla 10. Secuencia objetivo y secuencia constante de las proteínas dCas9 y dCas12a.

Secuencia objetivo dCas9 (ARN)	5'- AACGGUCCACAAGGUUCUCA-3'
Region constante dCas9 (ARN):	5'-GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUU-3'
Secuencia objetivo dCas12a (ARN)	5'-CCUUGUUCACCUUGGUUGACCAGGG-3'
Region constante dCas12a (ARN):	5'-UAAUUUCUACUCUUGUAGAU-3'

Tabla 11. Diseño de oligos para amplificación de los templados por PCR.

Oligo	Secuencia
sgRNA dCas9 Fwd	5'- GAAATTAATACGACTCACTATAGGAACGGTCCACAAGGTTCTCAG TTTTAGAGCTAGAAATAGC- 3'
sgRNA dCas9 Rev	5'- AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGAC TAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAC- 3'
crRNA dCas12a Fwd	5'- GAAATTAATACGACTCACTATAGGTAATTTCTACTCTTGTAGAT- 3'
crRNA dCas12a Rev	5'- CCCTGGTCAACCAGGTGAACAAGGATCTACAAGAGTAGAAATTA- 3'