

DESARROLLO DE BIONANOESTRUCTURAS CON DNA Y PROTEÍNAS CRISPR-Cas

Jesús Ortiz Saucedo & Armando Hernández García, Instituto de Química, Departamento de Química de Biomacromoléculas, Laboratorio de Ingeniería Biomolecular y Bionanotecnología, UNAM. Ciudad de México, CP. 04510, jesus.osaucedo@comunidad.unam.mx

Palabras clave: Bionanotecnología, CRISPR-Cas, nanofibras

Introducción. En la naturaleza, el DNA es la molécula universal para el almacenamiento de la información genética, mientras que en el mundo sintético el DNA se ha usado como un bloque de construcción empleado para desarrollar arquitecturas en la nanoescala (1). Esta molécula es altamente versátil y programable, esto se ha visto reflejado con el creciente desarrollo de la nanotecnología del DNA en las últimas décadas, permitiendo el diseño racional de nanoarquitecturas con gran precisión. El alcance de las nanoestructuras de DNA puede ser expandido con la incorporación de proteínas, dando lugar a bionanoestructuras híbridas. Este proyecto está enfocado en la bionanotecnología híbrida de DNA-proteínas, en la cual ambos bloques de construcción actúan sinérgicamente durante el proceso de auto-ensamble (2). El objetivo de este trabajo es la formación de bionanoestructuras híbridas, donde se utilizarán dos versiones de proteínas quiméricas Cas catalíticamente inactivas fusionadas a dominios de heterodimerización (dCas12a-FRB y dCas12a-FKBP [5]), que formaran un complejo ribonucleoproteico con crRNAs, pudiendo reconocer secuencias específicas de dsDNA, además incorporando la capacidad intrínseca de polimerizarse por el sistema de heterodimerización inducido químicamente en presencia de rapamicina.

Metodología. Se realizó la producción de las proteínas por métodos recombinantes en *Escherichia coli* BL21 D3. Se purificaron secuencialmente por cromatografías: afinidad a iones metálicos inmovilizados, heparina y por exclusión de tamaño molecular (3). Se realizó la caracterización de la unión al dsDNA por ensayo de movilidad electroforética, caracterización de heterodimerización de proteínas por dispersión de luz dinámica y caracterización de la formación de bionanoestructuras microscopia de fuerza atómica.

Resultados.

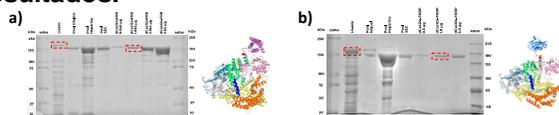


Fig. 1. Gels de poliacrilamida SDS-PAGE al 7.5 % mostrando la producción y las etapas de purificación de las proteínas a) dCas12a-FRB y b) dCas12a-FKBP. Se resalta en rojo la proteína purificada.

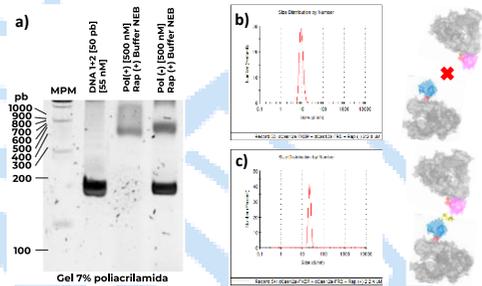


Fig. 2. Unión al dsDNA y dimerización de las proteína Cas12a. a) Ensayo de movilidad electroforética de los RNPs con fragmentos de DNA en presencia y ausencia de rapamicina. b) Distribuciones de diámetro hidrodinámico de dCas12a-FKBP + dCas12a-FRB (11.7 nm) y c) dCas12a-FKBP + dCas12a-FRB + Rapamicina (24.36 nm).

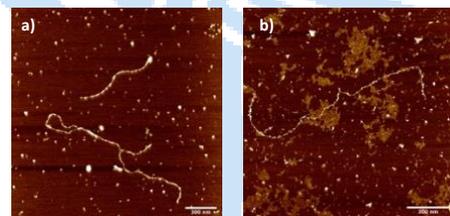


Fig. 3. Microscopia de fuerza atómica de las bionanoestructuras ensambladas. a) y b) Polimerización de los complejos ribonucleoproteicos (dCas12a-FRB/FKBP + crRNAs) ensamblados con fragmentos de dsDNA, en presencia de rapamicina (RNP:DNA:Rapamicina).

Conclusiones. Las proteínas recombinantes dCas12a-FRB y dCas12a-FKBP purificadas (pureza de 84.4% y 86.5%, respectivamente) unieron al DNA de manera específica y se heterodimerizaron en presencia de rapamicina. Las proteínas se auto-ensamblan en bionanoestructuras híbridas tipo nanofibras con longitudes de entre 800 nm y 2 µm.

Agradecimientos. Este proyecto ha sido financiado con el proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IN210121. Beca de CONACYT con número de apoyo: 1229033.

Bibliografía.

- Li, F., Li, J., Dong, B., Wang, F., Fan, C., & Zuo, X. (2021). DNA nanotechnology-empowered nanoscopic imaging of biomolecules. *Chemical Society Reviews*, 50(9), 5650-5667.
- Hernandez-Garcia, A. (2021). Strategies to Build Hybrid Protein-DNA Nanostructures. *Nanomaterials*, 11(5), 1332.
- Mohanraju, P., J, Oost., M, Jinek., & D, Swarts. (2018). Heterologous Expression and Purification of the CRISPR-Cas12a/Cpf1 Protein. *BIO-PROTOCOL*, 9.