



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Ingeniería de la proteína BLS para la construcción de
dispositivos nanofotónicos y mediciones estructurales
basadas en nanoscopía de fluorescencia

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área Química Biológica

Santiago Sosa

Director de Tesis: Dr. Fernando Alberto Goldbaum

Codirector de Tesis: Dr. Fernando Daniel Stefani

Consejera de estudios: Dra. Valeria Levi

Fundación Instituto Leloir - IIBBA
Ciudad de Buenos Aires, Argentina
Buenos Aires, 18 de septiembre de 2024

RESUMEN

Ingeniería de la proteína BLS para el diseño de dispositivos nanofónicos

La fabricación de nanoestructuras a partir de moléculas biológicas es un campo de investigación muy activo. En 2006 se desarrolló un método revolucionario, llamado “Origamis de ADN”, para formar estructuras nanométricas a base de DNA. Diversos trabajos demostraron que estas estructuras podían funcionar como sistemas de andamiaje donde organizar nanopartículas, fluoróforos y proteínas, y las aplicaciones de los origamis de ADN se expanden día a día. Las proteínas pueden aportar una herramienta alternativa y complementaria al campo de la nanofabricación. En comparación con el ADN, las proteínas tienen la ventaja de poseer mayor rigidez estructural, gran diversidad de funciones químicas y biológicas, y la capacidad de auto-ensamblarse en estructuras de mayor tamaño y complejidad.

En este contexto, esta tesis explora la ingeniería de una proteína específica para el diseño de dispositivos nanofónicos, es decir, estructuras fabricadas en base a proteínas que sirvan para manipular luz e interacciones luz-materia en escala nanométrica. La proteína modelo se llama Lumazina Sintasa de *Brucella* (o BLS por sus siglas en inglés). La misma es un homo-decámero, ensamblado como dímero de pentámeros. Algunas ventajas de emplearla como bloque de construcción son su alta termoestabilidad y su resistencia frente a desnaturizantes químicos. Así mismo, sus extremos N-terminales se encuentran libres y disponibles para la fusión con otros polipéptidos así como cualquier otro tipo de moléculas.

En primer lugar, aprovechando que el decámero de BLS forma una cavidad que podría albergar pequeñas moléculas, se incorporaron en ella fluoróforos y se caracterizaron sus propiedades ópticas en este entorno. Luego, combinando de manera novedosa dos metodologías de microscopía de molécula única, se caracterizó la movilidad y la orientación relativa de dichos fluoróforos respecto a la proteína. Con este método fue posible determinar que los fluoróforos se ubican en la cavidad en dos orientaciones preferenciales. Es destacable que esta información estructural se obtuvo en un microscopio óptico, a temperatura ambiente, y en entorno líquido, y de hecho se observaron transiciones dinámicas de los fluoróforos entre las dos orientaciones preferenciales. Estos experimentos constituyen avances en dos frentes. Por un lado, los resultados obtenidos demuestran que la nanofabricación por ingeniería de proteínas es una estrategia prometedora y ampliamente aplicable para estudiar las interacciones entre moléculas pequeñas y proteínas, así como una herramienta atractiva para controlar la orientación de los fluoróforos empleando un andamio biológico, allanando el camino para aplicaciones en bionanofotónica que dependen de la orientación molecular. Por otro lado, la metodología desarrollada representa un paso importante en la tendencia actual de obtener información estructural de biomoléculas en condiciones biológicamente relevantes, en incluso de observar dinámicas. En este sentido, en otro capítulo de esta tesis, expandimos este concepto modificando a BLS para aplicar nanoscopías de fluorescencia con resolución nanométrica, y así medir en condiciones biológicamente relevantes, las dimensiones de la proteína.

Otra investigación de BLS como plataforma para dispositivos nanofotónicos fue el ensamblado de sistemas multicromofóricos. Usando la multiplicidad de funcionalidades que ofrece BLS, se incorporaron grupos funcionales de especificidad en un extremo de un pentámero, y fluoróforos en el otro extremo. Este constructo multicromofórico fue evaluado como marcador para microscopía de super-resolución por ubicación de moléculas individuales, con el objetivo de obtener un marcador más eficiente que los tradicionales. Si bien se logró marcar y visualizar actina con BLS por super-resolución, no se hallaron grandes mejorías respecto a otros marcadores existentes o desarrollados en simultaneo con esta tesis.

Finalmente, con el objetivo de ensamblar nano-antenas ópticas basadas en BLS, se estudió el ensamblado de nanopartículas de oro sobre los extremos de BLS. Se lograron obtener oligómeros de nanopartículas de oro mediante dos estrategias diferentes que involucran a BLS. Estudios de partícula única revelaron que dichas poblaciones son heterogéneas. Este enfoque requiere de más investigación para obtener protocolos que permitan fabricar nanoantenas con control estequiométrico de proteínas y nanopartículas.

Palabras clave: microscopías de molécula única, caja proteica, nanoscopías, nano-fabricación, bionanofotónica

ABSTRACT

Engineering of BLS protein for the design of nanophotonic devices

The fabrication of nanostructures from biological molecules is an active field of research. In 2006, a revolutionary method (called “DNA Origamis”), was developed to form nanometric structures based on DNA. Various works demonstrated that these structures could function as scaffolding systems to organize nanoparticles, fluorophores and proteins. The applications of DNA origami are expanding day by day. Proteins can provide an alternative and complementary tool to the field of nanofabrication. Compared to DNA, proteins have the advantage of having more structural rigidity, a great diversity of chemical and biological functions, and the ability to self-assemble into structures of greater size and complexity.

In this context, this thesis explores the engineering of a specific protein for the design of nanophotonic devices. In other words, structures manufactured based on proteins that serve to manipulate light and light-matter interactions on a nanometric scale. The model protein is called *Brucella* Lumazine Synthase (or BLS). It is a homo-decamer, assembled as a dimer of pentamers. Some advantages of using it as a building block are its high thermostability and resistance to chemical denaturants. Likewise, its N-terminal ends are free and available for fusion with other polypeptides as well as any other type of molecules.

In first place, taking advantage of the fact that the BLS decamer forms a cavity that could house small molecules, fluorophores were incorporated inside it and their optical properties were characterized in this environment. Then, by combining two single-molecule microscopy methodologies in a novel way, the mobility and relative orientation of these fluorophores with respect to the protein were characterized. With this method it was possible to determine that the dyes are hosted in the cavity in two preferential orientations. It is important to note that this structural information was obtained in an optical microscope, at room temperature, and in a liquid environment, allowing to observe dynamic transitions of the fluorophores between the two preferential orientations. These experiments constitute advances on two fronts. On one hand, the results obtained demonstrate that protein engineering nanofabrication is a promising and widely applicable strategy to study interactions between small molecules and proteins, as well as an attractive tool to control the orientation of fluorophores using a biological scaffold, paving the way for applications in bionanophotonics that depend on molecular orientation. On the other hand, the developed methodology represents an important step in the current trend of obtaining structural information of biomolecules under biologically relevant conditions, even observing dynamic information. In this sense, in another chapter of this thesis, we expand this concept by modifying BLS to apply fluorescence nanoscopy with nanometric resolution, and thus measure the dimensions of the protein under biologically relevant conditions.

Another investigation of BLS as a platform for nanophotonic devices was the assembly of multichromophoric systems. Using the multiplicity of functionalities

offered by BLS, specificity functional groups were incorporated at one end of a pentamer, and fluorophores at the other end. This multichromophoric construction was evaluated as a marker for super-resolution microscopy by location of individual molecules, with the aim of obtaining a more efficient marker than traditional ones. Although it was possible to mark and visualize actin with BLS by super-resolution, no great improvements were found compared to other existing markers or developed simultaneously with this thesis.

Finally, with the aim of assembling optical nano-antennas based on BLS, the assembly of gold nanoparticles oligomers using BLS was studied. Gold nanoparticle oligomers were obtained using two different strategies involving BLS. Single particle studies revealed that these populations were heterogeneous. This approach requires more research to obtain protocols that allow manufacturing nano-antennas with stoichiometric control of proteins and nanoparticles.

Keywords: single molecule microscopies, protein cage, nanoscopy, nano-fabrication, bionanophotonics

AGRADECIMIENTOS

Me resulta difícil y casi inabarcable enumerar a todas las personas que ayudaron a que yo hoy esté entregando esta tesis doctoral. Sin duda existen personas que ayudaron de manera muy directa y otras que lo hicieron de manera más indirecta, desde el apoyo afectivo y la contención. Fueron 7 años de mi vida dedicados a este proyecto que fue, sin duda, el más largo y desafiante que emprendí. A riesgo de saber que alguien me olvidaré de nombrar, haré mi mejor intento de rendir homenaje a todas estas personas a quienes les debo parte de este título.

Antes de enumerarlas, quiero hacer una mención especial al Estado Argentino, que con todas sus falencias, ha garantizado que yo y muchas personas más hoy tengamos la formación que tenemos. No tengo palabras para expresar lo orgulloso que me siento de ser un egresado de una universidad pública argentina, la Universidad de Buenos Aires y muy especialmente la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, que ya hace muchos años es mi hogar. Quiero agradecer también al CONICET por haberme otorgado la beca con la cual pude dedicarme casi exclusivamente a la investigación y a la Agencia I+D+d por garantizar los fondos para llevar adelante los trabajos de los grupos a los cuales pertenezco. Me comprometo a seguir construyendo un estado que no solo garantice oportunidades como la que tuve, sino que se encargue de abordar desde la investigación las problemáticas de su territorio y su población, para que tengamos una Argentina justa, libre y soberana y una sociedad más equitativa, en la que cada persona pueda realizarse y ser feliz con otros.

Debo arrancar por las 2 personas que de manera muy directa me acompañaron durante todo este periodo. En primer lugar, Fer Goldbaum, quien en 2013 confió en Hernán para recibirme en su laboratorio y permitirme hacer mi tesis de grado y continuar con el doctorado. Fernando representa para mí un ejemplo a seguir, una persona muy generosa que siempre ayudó a todos en su laboratorio para que crecieran en la dirección que cada uno eligió. Una persona que no se queda en el molde y que exploró no sólo el camino clásico de la investigación en CONICET, sino

que dedicó algunos años de su vida a la gestión pública en la AGENCIA y luego exploró el desarrollo tecnológico en la articulación público-privada. Me considero una persona poco ortodoxa, que no suele andar por caminos pre-marcados sino que le gusta explorar caminos nuevos. En ese sentido, Fer fue para mí un ejemplo a seguir. En 2017 cuando decidimos iniciar mi doctorado, nos pusimos a buscar algún co-director que estuviera dispuesto a embarcarse en la aventura de encontrar intersecciones entre la biología estructural y la nanotecnología. Allí nos encontramos con otro entusiasta comprometido con la ciencia que resultó ser mi co-director, Fer Stefani. Él es sin duda otro farol en mi camino académico. Creo que en la Argentina se pueden contar con los dedos de la mano a los investigadores que combinan la rigurosidad y exigencia (típicamente alemana) con el amor y la contención casi paternal con la que Fer lleva adelante su grupo de investigación. Fer, quisiera agradecerle por empujarme siempre hasta los límites de mis capacidades y darme la confianza y ayuda para lograrlo. Lucho dice que soy un biólogo super-saiyajin porque en el doctorado aprendí un montón de física, química y programación. Todo eso te lo debo a vos. A ambos les debo también infinitas charlas sobre política científica, algo que, como ya muchos se imaginarán, terminó siendo algo central en mi vida.

Pero claro está que los Fernandos no son los únicos que me enseñaron a ser científico. Ambos conformaron dos grupos de investigación que tienen algo en común: una exquisita combinación de calidad académica y humana. Mis años en el grupo de Microbiología e inmunología molecular de la Fundación Instituto Leloir fueron sin duda muy felices. Allí di mis primeros pasos en la ciencia y aprendí un montón de técnicas de biología molecular, biofísica de proteínas, inmunología entre muchas otras cosas. Todo eso ocurrió entre cientos de desayunos, almuerzos, mates y birras con personas increíbles: Jime, Pau, Hernán, María Laura, Seba, Lisandro y Vani fueron durante todos estos años el alma del 304. Y a ellos nos sumamos quienes conformamos la denominada “juventud del 304”: Cami, Giu, Juan, Carla, Ana y Euge. Si hay algo que tenían en común todas las líneas de investigación del 304 es que todos teníamos que pasar por la purificación de proteínas cada tanto. Lo lindo de hacer purificaciones que duraban varios días

hasta altas horas de la noche, es que nos dio la oportunidad de conocernos a fondo, y acompañarnos no solo en lo laboral sino también en lo personal. La segunda parte de mi doctorado transcurrió en el CIBION junto al grupo de nanofísica aplicada. Ahí descubrí lo que es desarrollar proyectos en equipo, ya que hasta ese momento mi proyecto era principalmente algo que llevaba adelante solo con los Fernandos. Con Iani nos pasamos horas probando maneras de ensamblar nanopartículas de oro con BLS; con Chechu, Alan y Lu nos divertimos armando y desarmando el microscopio de STORM para probar maneras extraer la mayor cantidad de información posible de cosas que a los ojos de otros son solo puntitos que titilan. Lucho, la persona más curiosa que conozco, siempre me dejaba manija de probar cosas. Con todos ellos, sumando a Gonza, Luciana y Juli, compartimos decenas de churros en la ofi y birras en la espuma, karaokes en lo de Iani y asados en lo de Fer. A ellos se sumaron en este último tiempo Luis, Flor Choque, Flor Edorna y algunas personas más con quienes también compartimos lindo momentos.

Por fuera de mis dos grupos de investigación existió un segundo anillo de personas que también fueron clave en este proceso: el resto de la comunidad del Leloir y del CIBION. Quiero detenerme acá en algunas personas de la FIL que fueron muy importantes para mí. Hori, a quien nombraré varias veces porque es figurita repetida en mi vida, es sin dudas una de las personas más importantes que tengo, no me alcanzarían palabras para agradecerte y definir nuestro vínculo de amor y hermandad que tiene muchos capítulos y sin duda uno es el de la FIL. Ana, mi esposa, mi compinche del labo por muchos años que ahora vive en Inglaterra y extraño a montones. Hernán que fue la persona que me abrió las puertas del Leloir y, aun hoy a la distancia, siempre me pregunta cómo estoy y como vengo con la tesis. El ruso que además de darme el honor de compartir laboratorio el 304, me enseñó a cebar bien los mates y encima se puso al hombro los proyectos COVID durante la pandemia de los cuales siento mucho orgullo. Ángeles y Andrea que, como cabezas de la institución, me tuvieron que bancar siendo representante de los becarios y que siempre me acompañaron en ese rol. A quienes día a día hicieron y hacen que la FIL funcione: Mónica y Laura en la biblioteca, Dieguito en el droguero, Sole en el HPLC, Juli y Wanda en la administración y un sin fin de personas

increíbles. A toda la banda de Becaries de quienes me llevo un hermoso recuerdo, especialmente a quienes formamos les papiriquis: Hori, Guada, Carla, Sole, Natali, Nati Soldi, Giu, Yani, Pau. A todo el laboratorio de virología molecular a quienes iba siempre a visitar y me hicieron sentir casi como parte de su grupo: Andrea, Mora, Luana, Hori, Guada, Lau, Diego. Seguro me estoy olvidando de la gente, éramos muchos y contra todo rumor, debo decir que el Instituto Leloir es un lugar maravilloso para trabajar.

Todos estos años de investigación, coexistieron con otros dos planos de mi vida que, sin duda, fueron parte de mi formación como doctor: la docencia y la militancia. Pasé varios años en ORT dando clase de química, mi primera experiencia como docente en media. Donde forje una hermosa amistad con Rodri y Coni. Al mismo tiempo encontré otro lugar hermoso donde aprendí un montón: el bachi “Vientos del pueblo”, una banda hermosa de gente que milita cotidianamente para garantizar el derecho a la educación de cientos de personas que fueron expulsadas el sistema educativo y con quienes emprendíamos la desafiante tarea de terminar la escuela secundaria. Me llevo de allí muchos aprendizajes de muchas personas que luchan día a día para salir adelante. Pero la militancia no terminó ni empezó allí. Durante la presidencia de Macri, armamos con varios becaries una agrupación que se llamó Ideas de Pie, desde donde nos dedicamos no solo a defender la ciencia sino a imaginarnos un futuro donde la ciencia y la tecnología fueran parte de un proyecto de país que estuviera al servicio de su pueblo. Ideas de Pie, fue heredera de mis años en el FEM y precursora de los espacios donde hoy en día canalizo mi militancia: CyT para una Argentina Humana, Participación (nuestra agrupación de graduados en la Facultad), La RAIIS y la Red PLACTS. En todas estas transiciones a hay denominadores comunes, militantes invaluable, compañeros y amigos: Eze, Lupi, Flay, Cami, Enzo, Vale, Meli, Flor, Agus, Lipa, Caro, Axel, Caro, Mai, Ale, Tobi, Marce, Lenny, Facu; y también hay personas que aparecieron en el Camino: Santi Liaudat, Gabi Bilmes, Sole, Majo, Mante, Salva, Cate, Lara, Kirby, Juanma, Tomi, Ullu, Lau, y seguro muchas personas más de las que me estoy olvidando. No me alcanza el espacio, pero quisiera hacer una mención especial a la nueva banda del FEM, que son nuestro futuro y espero que sean mucho mejores que nosotros.

Ultimo grupo que me dijo muchas satisfacciones: la banda de JOBION, que ahora deberíamos llamarnos JOVATON: Chechu, Nati, Vicky, Ale, Nicky y Juanito. Con quienes tuvimos el coraje de armar nuestras propias reuniones científicas, por jóvenes para jóvenes, con nuestra propia impronta.

Estos últimos dos años de mi vida, estuvieron marcados por un cambio sustancial que, si bien demoró la entrega de esta tesis, también me dio muchos aprendizajes y satisfacciones: la secretaría de extensión de la FCEN. allí muchas personas no solo me enseñaron un montón de cosas sobre extensión, sino también me bancaron cada vez que me escapé a escribir la tesis o hacerlos últimos experimentos que me faltaban. Todo el equipo de extensión Pancho, Clau y el equipo de la DOV (Yas, Lu, Diani, Mariel), Guille y todo el equipo de Popu (Flor, Romi, Vale), Charly, Nair, Marce, toda el área de bienestar. A la comisión de la reserva, especialmente a Adri, Joaco, Pau y Rober a quienes admiro como biólogos y personas. Todas las personas que sostienen día a día la Facu, con algunos de los cuales además construí un vínculo personal: Diego, Armando, Lau, Omar, Nico, Agus, Martin, Gabi, Ana, Rober, Leo, Carlos, Eduardo, Guido, Tere y un sinfín de personas. Todo este grupo conducido por Willy y vale, quienes manejan este hermoso barco al que le toca hoy atravesar una tormenta. Me siento muy orgulloso de formar parte de su equipo. Por esas casualidades de la vida, Vale es además mi consejera de estudios a quien le queme el cerebro con preguntas de todo tipo en algún momento.

Esta Tesis no podría haber sido escrita sin la compañía de la familia, aquellos con quienes comparto la genética y aquellos que no. A todos ellos, los elegí y los sigo eligiendo. Soy hijo único pero la vida me dio varios hermanos: Anto, Caro, Gonza, Marie, Enzo y Hori, gracias por oficiar de hermanos mayores cada vez que estoy un poco perdido, gracias por contenerme siempre, gracias por las risas y los llantos. Gracias a los palmis (Pau, Gonza, Fede, Juan, Gonza, Mati, Emi), a los nerds y sensuales (Flor, Lari, Juli, Celes, Ale, Guada y Hori), al rancho aparte, grupo que mayoritariamente está desperdigado por el mundo en este momento (Sebi, Seve, Car, Fler, Ax), a los puTITOs, nueva incorporación a mi familia (Coqui, Tito, Santi, Nacho, Enzo y Agus). A los amigos que me dejó Hori antes de irse a USA y hoy son

una parte hermosa de mi vida: Pablo, Ale, Hora, Ema. A Lui y Caro, minhas irmãs brasileiras. A Mauro y Nati, compañeros de birra y reflexiones de las más profundas. Gracias a mi familia materna en Buenos Aires y a mi familia paterna en Jujuy, a Sandra, Goye y Lili. Gracias Yuri por haber sido mi compañero y mi pareja durante buena parte de esta tesis. Si bien hoy elegimos no transitar la vida de la mano, valoro infinitamente lo que aprendí y viví a tu lado.

Papa y Mama, las personas más importantes en mi vida, por quienes haría cualquier cosa y quienes ya dieron todo y más por mí. Gracias por acompañarme siempre en mis locuras y perdón por sorprenderlos con mis decisiones extravagantes y cambios de rumbo. La confianza y el amor que ustedes depositaron siempre en mí, son lo que me da fortaleza y coraje. Ustedes me enseñaron a tener sueños y objetivos, a no conformarme, a ir siempre por más. No lo saben, pero la semillita militante, la plantaron ustedes hace mucho tiempo cuando me enseñaron a pensar en los demás, a no ser indiferente frente a las injusticias, a dar sin esperar nada a cambio. Finalmente, hay dos personas que ya no están físicamente conmigo, pero que los llevo en mi corazón todos los días. Además de todo el amor que me dieron, fueron parte de la razón por la que estudie una carrera científica: tía baby y tío armando, a ustedes dedico esta tesis.

PRÓLOGO

El presente trabajo tiene el objetivo de mostrar los resultados, discusiones y conclusiones obtenidas tras 7 años de trabajo en los laboratorios de Inmunología y Microbiología Molecular de la Fundación Instituto Leloir (FIL/IIBBA-CONICET) y de Nanofísica Aplicada del Centro de Bionanociencias (CIBION-CONICET). Persigo con esta tesis poder compartir algo de lo aprendido durante estos años, a lo que yo llamo pequeñas conquistas en la interfaz de la ingeniería de moléculas biológicas (especialmente de proteínas) y las nano-ciencias (específicamente las microscopías de molécula única y de super-resolución). Precisamente, esta tesis comenzó a gestarse en 2017 entre Hernán, los dos Fernandos y yo con la ambiciosa motivación de empalmar estas dos áreas de conocimiento que hasta ese momento poco se cruzaban entre sí. Esto después se materializó en el objetivo general y los objetivos específicos que podrán leer en la introducción.

Sin embargo, considero que mostrar los resultados experimentales sería mostrar sólo una parte de lo que para mí fue el proceso del doctorado. Es por esto que he decidido incluir este prólogo, en el que también quiero compartir otro tipo de procesos, reflexiones y conclusiones a las que llegué producto de haber realizado un doctorado. Aprendizajes que considero tanto o más importantes que los aprendizajes técnicos y analíticos.

Durante estos 7 años, aprendí no solo como utilizar un HPLC o un microscopio de fluorescencia, sino que también aprendí mucho sobre cómo funcionan el sistema universitario y el sistema científico argentino, ambos altamente imbricados entre sí. Pude aprender sobre ellos por muchas razones, pero sin duda podría destacar tres: la primera es de contexto general, ya que los procesos políticos y económicos de nuestro país en este período impactaron tanto de manera directa como indirecta en la universidad y en el sistema científico (y consecuentemente impactaron en mi doctorado); la segunda es que tuve la suerte de que, además de grandes científicos, tuve dos directores muy preocupados también por estas cuestiones y con quienes compartí no solo infinitas discusiones sobre resultados sino también

sobre política científica; la tercera razón es que durante este período dediqué parte de mi tiempo a estudiar (de manera autodidáctica pero también de manera formal) el sistema científico y su historia, para tener más herramientas a la hora de pensarlo y de actuar en consecuencia. Lógicamente, este proceso reflexivo tuvo su correlato en la práctica, por lo que durante todos estos años alterné los experimentos con militancia activa, para poder defender lo que como comunidad científica habíamos logrado conseguir y también para cambiar aquellas cosas que podían y debían mejorar. Todo esto resultó en un salto (inesperado) en mi vida hacia la gestión en la FCEN (mi segundo hogar) durante los últimos 2 años, mientras esta tesis era escrita.

Quisiera entonces compartir algunas reflexiones que me llevo del proceso de haber hecho un doctorado.

Sobre el “pensamiento crítico”

Habitualmente se hace referencia a que un objetivo de las instituciones en la formación de profesionales, tanto en sus carreras de grado como de posgrado, es la formación de ciudadanos con pensamiento crítico. Sin embargo, pocas veces se da una definición clara de que significa tener pensamiento crítico. En mi opinión, esta expresión tiene dos significados hermanos, que deberían ser dos caras de una misma moneda. Por un lado, es esencial que un graduado universitario y más aún un doctor, tenga la capacidad de ser crítico a la hora de hacerse preguntas científicas, a la hora de diseñar experimentos, de interpretar resultados y de obtener conclusiones a partir de ellos. Eso es sin duda la condición *sine qua non* para poder hacer ciencia de calidad. Pero, por otro lado, pensamiento crítico debe también ser interpretado como la capacidad de un individuo de pensarse como sujeto cuya actividad (en este caso hacer ciencia) se encuentra inmersa en un contexto social, histórico y geográfico. En ese sentido, no podemos dejar de ser críticos con nuestra propia actividad y con el sistema del cual formamos parte. Si nos quedáramos sólo con la primera definición que dimos de pensamiento crítico, caeríamos en el riesgo de ser simples técnicos altamente calificados.

Sobre la ciencia como actividad situada

La ciencia, como toda actividad humana es un proceso histórica y geográficamente situado. Esta Tesis tuvo la particularidad de haber atravesado 3 periodos presidenciales distintos (comenzó con el gobierno de Mauricio Macri, siguió con el de Alberto Fernández y culminó con el gobierno de Javier Milei). Esto impactó fuertemente en el desarrollo de esta y otras tesis por dos vías: las políticas macroeconómicas que influyeron en nuestros sueldos, becas, el valor real de los subsidios de investigación. Sin dudas fueron años difíciles para hacer ciencia, caracterizados por una política de achicamiento de los gastos del estado durante los gobiernos de Macri y Milei y una crisis inflacionaria y cambiaria durante el gobierno de Fernández; por otro lado, las políticas de desmantelamiento de complejo científico-tecnológica llevadas adelante durante el gobierno de Macri fueron levemente compensadas por el gobierno de Fernández y fuertemente profundizadas por el gobierno de Milei al punto de que algunos hablan hoy de un intento de científicidio.

Por otro lado, entre 2020 y 2021 el mundo y la Argentina atravesaron una pandemia sin precedentes en la historia de la humanidad que no solo tuvo efectos en el plano biomédico-epidemiológico, sino que también impulsó cambios en otros aspectos como las dinámicas sociales, laborales y culturales, mayormente traccionados por una digitalización de la vida en general. Sin entrar en mucho detalle, quiero destacar aquí que esta tesis no solo se vio afectada producto de la imposibilidad de hacer experimentos por casi 2 años, sino que modificó las formas de relacionarnos con nuestro equipo de trabajo, los congresos, la docencia y las publicaciones. En lo personal, rescato que ese tiempo que dejé de hacer experimentos me forzó a explorar otras formas de indagar las preguntas científicas que abordábamos a través de simulaciones, y análisis de datos en los que tuve que aprender a programar, algo que me quedaba muy lejos y hasta me daba un poco de miedo. Esta pandemia me dio también la oportunidad de aportar algo de lo que había aprendido durante mi tesis de grado y de doctorado tanto en el desarrollo de posibles tratamientos (en particular colaboré en un proyecto liderado por Fernando Goldbaum para el desarrollo de suero hiper-inmune anti-SARS-CoV-2), como en el

diagnóstico temprano de trabajadores del sistema de salud y el seguimiento de la respuesta inmune de las primeras personas vacunadas en nuestro país (ambos proyectos coordinados por Andrés Rossi en el Laboratorio de Serología y Vacunas del instituto Leloir). Esta experiencia me dio un indicio sobre la importancia para un país de formar personal altamente calificado, aun cuando su trabajo se netamente de ciencia básica. Durante este período en la Fundación Instituto Leloir, pusimos todo nuestro conocimiento sobre producción y purificación de proteínas, así como ensayos inmunológicos al servicio de un problema social y sanitario, esta tarea fue publicada en trabajos científicos de los cuales me siento muy orgulloso de haber podido participar.

Todo esto me lleva a un texto de Oscar Varsavsky que leí mientras estudiaba biología y que cambio mi forma de ver la ciencia:

“Pero debemos insistir, a riesgo de repetirnos, sobre el significado de esta autonomía, pues es fácil atacar por medio del ridículo la idea de una ciencia argentina. ¿Qué es una Física argentina, o una Sociología argentina, aparte de aplicaciones locales de verdades universales descubiertas por estas ciencias? La ley de la gravitación no es inglesa, aunque haya sido descubierta allí. Lo que es verdad en Nueva York también lo es en Buenos Aires. Lo que ocurre es que la verdad no es la única dimensión que cuenta: hay verdades que son triviales, hay verdades que son tontas, hay verdades que sólo interesan a ciertos individuos. “Una proposición significa algo si y sólo si puede ser declarada verdadera o falsa”, afirma una escuela filosófica muy en boga entre los científicos norteamericanos. Yo no lo creo: hay otra dimensión del significado que no puede ignorarse: la importancia. [...] Y la importancia es algo esencialmente local; una teoría sobre el petróleo no tiene el mismo interés en Suiza que en Venezuela. Nosotros no debemos usar los criterios de importancia en el hemisferio Norte. Y si usamos nuestros propios criterios ya habremos comenzado a hacer ciencia argentina”.

Oscar Varsavsky en “ciencia política y científicismo” (1969)

Efectivamente, haber dejado por un rato de lado nuestro trabajo cotidiano para intentar aportar un granito de arena al abordaje de un problema tan central en ese momento como la pandemia, fue hacer ciencia politizada.

PUBLICACIONES

Publicaciones que se desprenden de esta Tesis

Monitoring conformations of a single molecule inside a protein cavity under physiologically compatible conditions

Santiago Sosa, Alan M. Szalai, Lucía F. Lopez, Juan Manuel Prieto, Cecilia Zaza, Aleksandra K. Adamczyk, Hernan R. Bonomi, Marcelo Marti, Guillermo P. Acuna, Fernando A. Goldbaum, Fernando D. Stefani (en etapa de revisión)

Asymmetric bifunctional protein nanoparticles through redesign of self-assembly

Santiago Sosa, Andrés H. Rossi, Alan M. Szalai, Sebastián Klinke, Jimena Rinaldi, Ana Farias, Paula M. Berguer, Alejandro D. Nadra, Fernando D. Stefani, Fernando A. Goldbaum and Hernán R. Bonomi Nanoscale Advances. (2019)

Colaboraciones

El Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires entre 1943 y 1983.

Enzo Scargiali y Santiago Sosa Ciencia, Tecnología Y Política, 7(12), p 115. (2024)

A TLR4 agonist improves immune checkpoint blockade treatment by increasing the ratio of effector to regulatory cells within the tumor microenvironment

A. Farias, A. Soto, F. Puttur, C. J. Goldin, S. Sosa, C. Gil, F. A. Goldbaum & P. M. Berguer Scientific Reports volume 11, Article number: 15406 (2021)

Effect of UVB solar irradiation on Laccase enzyme: evaluation of the photooxidation process and its impact over the enzymatic activity for pollutants bioremediation

Daniel Cacciari, Agustina Reynoso, Santiago Sosa, Facundo Parodi, Fernando A. Goldbaum, Hernán A. Montejano, M. Alicia Biasutti & Eugenia Reynoso Amino Acids volume 52, pages925–939(2020)

Publicaciones vinculadas a COVID-19

Sputnik V vaccine elicits seroconversion and neutralizing capacity to SARS-CoV-2 after a single dose

Andres H.Rossi, Diego S.Ojeda, AugustoVarese, LautaroSanchez, Maria M.Gonzalez Lopez Ledesma, Ignacio Mazzitelli, Anabel Alvarez Juliá, Santiago Oviedo Rouco, Horacio M.Pallarés, Guadalupe S. Costa Navarro, Natali B.Rasetto, Corina I.Garcia, Shirley D.Wenker, Lila Y. Ramis, Magalí G. Bialer, Maria Jose de Leone, C. Esteban Hernando, Santiago Sosa, Luciana Bianchimano, Antonella S. Rios, Maria Soledad Treffinger Cienfuegos, Julio J. Caramelo, Yesica Longueira, Natalia Laufer, Diego E. Alvarez, Jorge Carradori, Dariana Pedrozza Alejandra Rima, Cecilia Echegoyen, Regina Ercole, Paula Gelpi, Susana Marchetti, Martín Zubieta, Guillermo Docena, Nicolas Kreplak, Marcelo Yanovsky, Jorge Geffner, Marina Pifano, Andrea V.Gamarnik Cell Reports Medicine, (2021)

Development of a hyperimmune equine serum therapy for COVID-19 in Argentina

Zylberman V, Sanguineti S, Pontoriero AV, Higa SV, Cerutti ML, Morrone Seijo SM, Pardo R, Muñoz L, Acuña Intrieri ME, Alzogaray VA, Avaro MM, Benedetti E, Berguer PM, Bocanera L, Bukata L, Bustelo MS, Campos AM, Colonna M, Correa E, Cagnaz L, Dattero ME, Dellafiore M, Foscaldi S, González JV, Guerra LL, Klinker S, Labanda MS, Lauché C, López JC, Martínez AM, Otero LH, Peyric EH, Ponziani PF, Ramondino R, Rinaldi J, Rodríguez S, Russo JE, Russo ML, Saavedra SL, Seigelchifer M, Sosa S, Vilariño C, López Biscayart P, Corley E, Spatz L, Baumeister EG, Goldbaum FA. *Medicina* 80 Suppl 3:1-6 (2020)

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

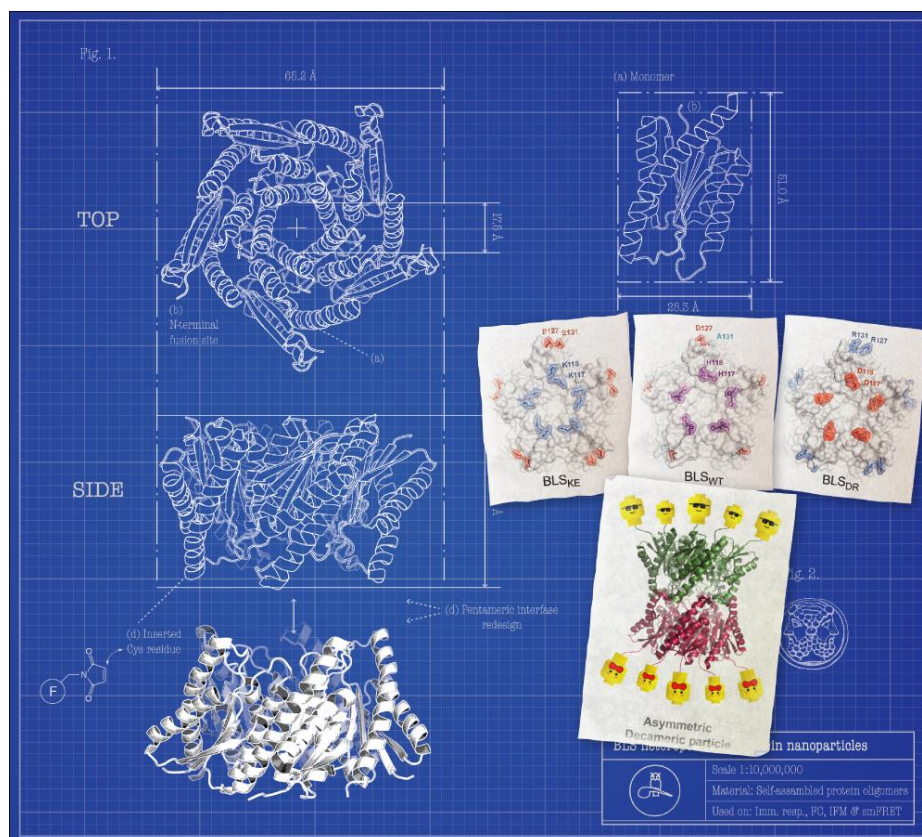
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BLS	Lumazina Sintasa de <i>Brucella</i>
β -Me	β -Mercaptoetanol
BSA	Albúmina de suero bovino
CD	Dicroísmo Circular
CYS	Cisteína
DC	Ciclo de trabajo
DE	Desviación estándar
DLS	Dispersión dinámica de Luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Medio Luria-Bertani
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAINT	Acumulación de puntos para la obtención de imágenes de topografía en la nanoescala
PBS	Buffer fosfato salino
PDDA	Cloruro de polidialildimetilamonio
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PM	Peso molecular
RESI	resolución mediante imágenes secuenciales
SDS	Dodecilsulfato sódico
SIMPLER	microscopía de iluminación supercrítica para localización en z fotométrica con resolución mejorada
SMLM	microscopía de localización de molécula única
SLS	Dispersión estática de luz
TCEP	Tris (2-carboxietil) fosfina
TBE	Tris-Borato-EDTA
Tm	Temperatura de desnaturalización
Ton	tiempo de encendido
Toff	tiempo de apagado
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Luz ultravioleta

Índice

RESUMEN	2
ABSTRACT	4
AGRADECIMIENTOS	6
PRÓLOGO	12
PUBLICACIONES	17
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	19
INTRODUCCIÓN.....	22
Encuentro entre las nanociencias y las biociencias	23
Empleo de biomoléculas para la nano-fabricación	25
BLS como modelo de trabajo en la nano-fabricación.....	34
Empleo de nanoscopías para el abordaje de preguntas biológicas	40
Motivación y objetivos	49
CAPÍTULO 1: BLS COMO NANO-CAJA DE FLUORÓFOROS.....	51
Características de la cavidad de BLS	52
Incorporación de moléculas pequeñas en la cavidad de BLS	53
Expresión, purificación y caracterización de KE88C.....	56
Marcación de KE88C con Cy3 y Cy5 y caracterización de propiedades espectroscópicas	60
Caracterización fotofísica de Cy3 y Cy5 a nivel de molécula única	69
Conclusiones parciales	80
CAPÍTULO 2: BLS COMO SISTEMA DE ANDAMIAJE PARA DNA-PAINT	82
DNA-PAINT	83
sm FRET y super-resolución.....	86
Motivación y objetivos:	88
Estudios preliminares y diseño	89
Ensamblaje de BLS con faloidina y oligonucleótidos de DNA.....	93
Caracterización de los imagers	98
FRET-PAINT de partículas individuales	103
Imágenes de actina por DNA-PAINT y FRET-PAINT	106
Conclusiones parciales	108
CAPÍTULO 3: DETERMINACIÓN DE LA ORIENTACIÓN DE MOLÉCULAS INDIVIDUALES EN UNA CAJA PROTEICA MEDIANTE NANOSCOPIAS	110
Información estructural dinámica a partir de nanoscopías	111

Orientación 2D de Cy5 en el plano por microscopía de fluorescencia con polarización resuelta en el tiempo	112
Orientación 2D de BLS por DNA-PAINT.....	118
Orientación de Cy5 respecto a BLS por combinación de microscopías de molécula única	124
Dinámicas moleculares y comparación con resultados experimentales.....	129
Conclusiones parciales	132
CAPÍTULO 4: MEDICIÓN DE DISTANCIAS INTRAMOLECULARES EMPLEANDO NANOSCOPIAS CON RESOLUCIÓN SUB-10 NM EN 3D	134
Nanoscopías con resolución sub-10 nm.....	135
Uso de nanoscopías para biología estructural.....	137
Diseño molecular y ensamblado de la muestra	139
Medición de BLS por RESI+Simpler	141
Conclusiones Parciales	145
CAPÍTULO 5: BLS COMO ANDAMIAJE DE OLIGÓMEROS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO	147
Propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas	148
Estrategias para el ordenamiento espacial de nanopartículas y fluoróforos	149
<i>Caracterización de nanopartículas esféricas de Oro</i>	<i>150</i>
BLS para el ensamblado de nano-antenas ópticas	154
Estrategia 1: ensamblaje basado en interacción directa tiol-oro	154
<i>Estrategia 2: ensamblaje mediado por hebras de BLS y oligonucleótidos</i>	<i>165</i>
Conclusiones parciales	173
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	175
MATERIALES Y MÉTODOS.....	181
Variantes de BLS	182
Plásmidos y primers.....	182
Oligonucleótidos.....	183
Fluoróforos.....	184
Nanopartículas de oro	184
Bioinformática	185
Biología molecular.....	186
Modificaciones químicas de BLS y ensamblado de complejos	189
Técnicas espectroscópicas	191
Microscopías	194
BIBLIOGRAFÍA.....	201

INTRODUCCIÓN



Encuentro entre las nanociencias y las biociencias

En una conferencia de 1959 el famoso físico Richard Feynman dijo *“There 's plenty of space at the bottom”*¹, remarcando la importancia de que las ciencias estudien la materia a nivel atómico y molecular. Algunos autores² datan este hecho como el nacimiento conceptual de las nanociencias, de naturaleza interdisciplinaria en términos de la forma en la cual se separaban las disciplinas científicas hasta entonces. Los avances en nanotecnología se fueron sucediendo de manera acelerada a medida que mejoraban las capacidades de fabricación y caracterización de la materia en esta escala de tamaños.

Hoy en día existen diversas estrategias para construir en la nanoescala²⁻⁴, las cuales pueden ser agrupadas en dos grandes grupos en función de su enfoque: las estrategias *“top-down”* y las estrategias *“bottom-up”*(figura 1). Las primeras consisten en esculpir materiales hasta obtener estructuras nanométricas. El ejemplo más frecuente de este enfoque es la litografía. Por el contrario, en el enfoque bottom-up se parte de estructuras pequeñas que se ensamblan de manera ordenada para obtener nano-estructuras. En la mayoría de los casos, esto se alcanza mediante reacciones químicas controladas o gracias a procesos de auto-ensamblaje debidos a las fuerzas intermoleculares. Este último enfoque es muy frecuente en la naturaleza, especialmente en la organización de estructuras celulares o subcelulares.

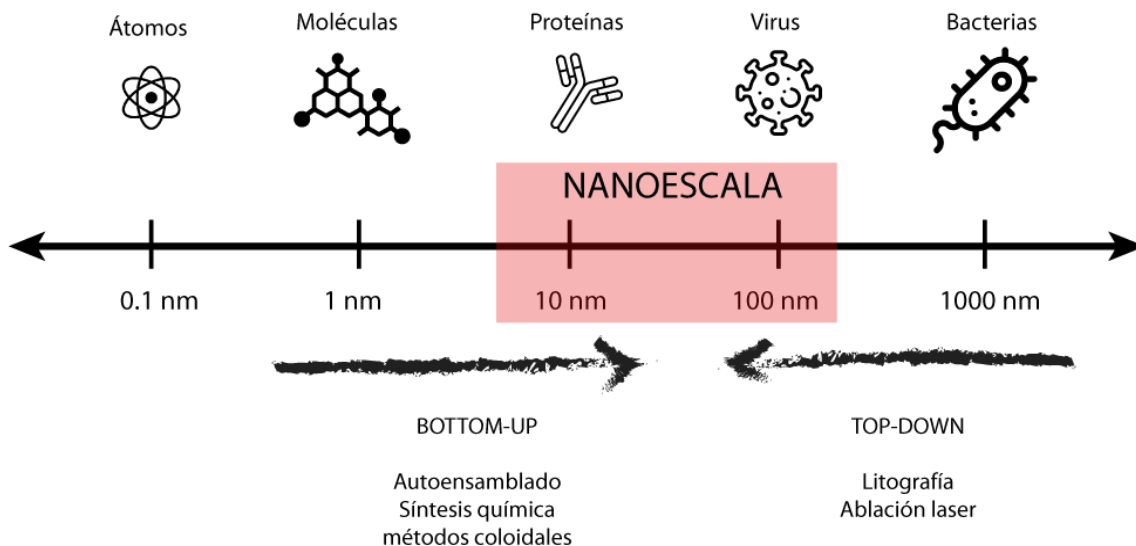


figura 1: representación esquemática de estructuras biológicas típicas de diversos tamaños y estrategias para la construcción de sistemas de tamaño nanométrico (10-100 nm).

En paralelo, la biología molecular y la biología estructural tuvieron un considerable crecimiento a lo largo de la segunda mitad del siglo XX⁵⁻⁸. Podemos situar como punto de partida la década del 50, cuando se descifró la estructura de la doble hélice de ADN (1953) y se obtuvo la primera estructura cristalográfica de una proteína (1959). Vale aclarar que antes de ese momento ya se tenía bastante información sobre la química de las moléculas biológicas, pero poco sobre su estructura. El entendimiento de la relación entre la estructura y la función de las moléculas biológicas traería, entre otras cosas, el desarrollo de la biotecnología moderna con aplicaciones en salud⁹⁻¹¹, agro¹²⁻¹⁴, e industria¹⁵.

Al iniciarse el siglo XXI las nanociencias y las biociencias comenzaron a cruzarse por varios caminos¹⁶. En primer lugar, se comenzaron a aplicar herramientas provenientes de la nanotecnología a la biotecnología^{13,17,18}. Se puede enumerar una extensa lista de trabajos que desde entonces han intentado incorporar funciones biológicas a nanopartículas y superficies nano-estructuradas^{19,20}: anticuerpos²¹, enzimas²², polímeros biológicos²³, ADN²⁴, entre muchas otras. En segundo lugar, se comenzaron a utilizar moléculas biológicas como elementos estructurales, aprovechando su capacidad natural de auto-ensamblarse²⁵. Otro punto de contacto

más reciente es el advenimiento de nuevas técnicas que permite observar estructuras biológicas a escala nanométrica en condiciones compatibles con la vida. Entre ellas, destacan las microscopías de fluorescencia de súper-resolución, también llamada nanoscopía de fluorescencia²⁶. El acelerado desarrollo de las mismas está comenzando a permitir responder preguntas propias de la biología estructural en condiciones fisiológicas. Esta tesis involucra los dos últimos puntos mencionados: el empleo biomoléculas para la nano-fabricación y la aplicación de nanoscopías para resolución de preguntas biológicamente relevantes, razón por la cual a continuación detallaremos el estado del arte en estas dos áreas de conocimiento.

Empleo de biomoléculas para la nano-fabricación

Ácidos nucleicos como bloques de construcción en la nanoescala

El ADN es una molécula lineal polimérica, formada por 4 posibles monómeros llamados nucleótidos: adenina, timina, guanina y citosina. El primer par tiene la capacidad de aparearse entre sí y el segundo también. Dadas dos determinadas secuencias de nucleótidos complementarias, se puede formar una hebra doble cadena que toma la forma tridimensional de una doble hélice.

En 1982, Nadrian Seeman propuso la idea de usar el ADN como material de construcción empleando las reglas de apareamiento de dicho sistema²⁷. De esta forma, el ADN se utilizó como un nuevo nano-material versátil. La estrategia se basaba en apareamientos denominados *holliday junctions* en los cuales, hebras de ADN simple cadena eran unidos para formar uniones rígidas por un lado y extremos pegajosos del otro. Así, estas estructuras rígidas podían ser pegadas entre sí para formar ensamblados de mayor tamaño. Esto dio lugar a una serie de trabajos en los que pequeños objetos de ADN son ensamblados: nano-cables, grillas 2D y poliedros 3D.

En 2006 Paul Rothumend, descubrió una forma más eficiente y versátil de diseñar nano-estructuras basadas en ADN ²⁸. El método, llamado “origami de ADN” consiste

en plegar una hebra larga simple cadena de ADN (denominada *scaffold*) empleando una serie de oligonucleótidos (llamados *staples*) con complementariedad parcial a dos sectores diferentes de la hebra (figura 2A). Así, fragmentos del *scaffold* muy alejados en la secuencia lineal pueden quedar muy cercanos espacialmente. Los primeros trabajos que demostraron el uso de esta técnica fueron estructuras bidimensionales de formas geométricas^{29,30}. En pocos años se lograron obtener estructuras 3D³¹ tales como nano-tubos o nano-cubos (Figura2B). También se construyeron estructuras formadas por más de un *scaffold* mediante técnicas de ensamblado jerárquico^{32,33}.

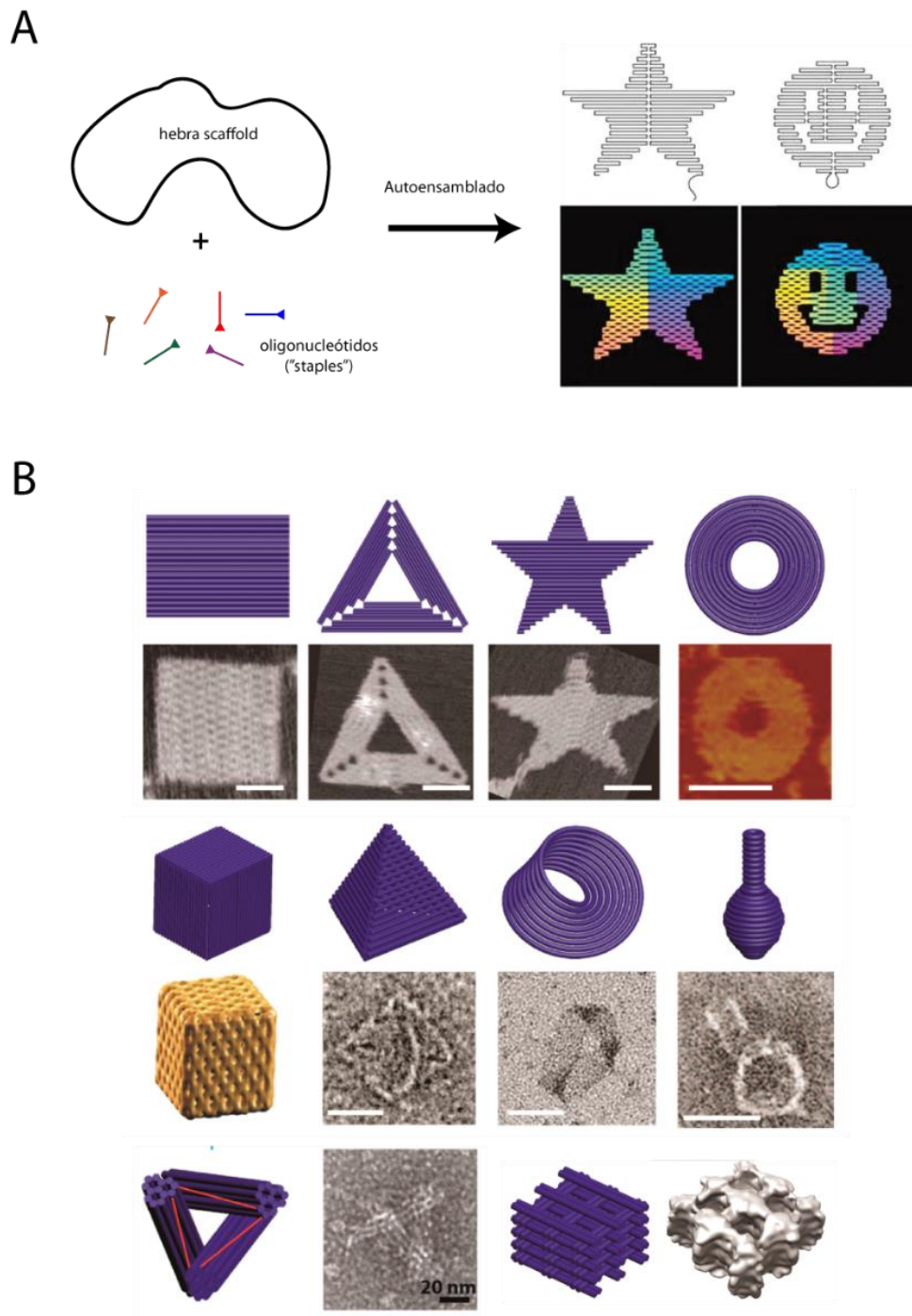


Figura 2: (A) esquema de ensamblado de una estructura de ORIGAMI de ADN empleando una hebra "scaffold" y muchas pequeñas llamadas "staple" (B) ejemplos de estructuras de diverso grado de complejidad y tamaño, ensambladas mediante la técnica de origami. Adaptado de Hong et al. (2017)

Existen varias ventajas sobre el uso de ADN como nano-material, como su fácil diseño y programabilidad, reactividad controlable con otras moléculas y baja inmunogenicidad. También es fácil construir nano-estructuras híbridas entre origamis de ADN y nanopartículas metálicas, polímeros, moléculas pequeñas y proteínas³⁴. La nanotecnología del ADN tiene en la actualidad aplicaciones en diversos ámbitos³⁵: *delivery* de drogas^{36–38}; biosensado de compuestos y diagnóstico^{39–41}; nanofotónica y plasmónica^{42–44}; fabricación de motores moleculares^{45,46}; diseño de nano-reactores enzimáticos^{47–49}; entre otros. Es importante destacar que esta tecnología no solo ha aportado al desarrollo de las aplicaciones antes mencionadas, sino que también permite poner a prueba nuevas metodologías de nano-caracterización, especialmente aquellas basadas en microscopias de fluorescencia de super-resolución.

Sin embargo, las nano-estructuras de ADN tienen problemas que limitan algunos usos. En aquellos casos en los que se necesitan distancias y formas bien definidas, como en nanofotónica y plasmónica, la flexibilidad puede convertirse en un problema⁵⁰. Además, existen algunos problemas de estabilidad cuando los origamis de ADN se exponen a altas temperaturas, bajas concentraciones catiónicas o nucleasas⁵¹. Estas dos últimas condiciones son relevantes cuando se piensa en aplicaciones médicas^{52–55}. De alguna manera, esto puede revelar una explicación de por qué el ADN o el ARN no fueron seleccionados por la evolución como moléculas estructurales. Hay varios trabajos que abordan estos problemas utilizando reticulantes para aumentar la estabilidad térmica⁵⁶, o recubriendo con polímeros / proteínas para mejorar la estabilidad^{57,58}.

Proteínas como bloques de construcción en la nanoescala

Las proteínas son, tal vez, el grupo de macromoléculas más diverso en cuanto a sus estructuras y funciones^{59,60}. Cumplen desde roles estructurales hasta funciones de reconocimiento, como sensores, de catálisis enzimática, etc. Dicha diversidad se basa en la variedad de propiedades fisicoquímicas de sus componentes elementales, los aminoácidos. La secuencia primaria de aminoácidos determina la forma tridimensional en la que se pliega cada proteína, y dicha estructura determina

las funciones biológicas de la misma. Es necesario aclarar que existe un grupo grande de proteínas que escapa a esta lógica llamadas proteínas intrínsecamente desordenadas^{61,62}. Cada proteína puede estar formada por más de un dominio cuya forma y función es independiente de los otros dominios. Las cadenas polipeptídicas pueden a su vez interactuar con otras proteínas y autoensamblarse⁶³ en homooligómeros - si los polipéptidos son idénticos entre sí- u heterooligómeros, si los polipéptidos son diferentes (Figura 3). Este proceso de auto-ensamblaje es muchas veces vital para la función de las proteínas⁶⁴. Por ejemplo: los factores de transcripción típicamente forman dímeros para unirse al ADN^{65,66}, las cápsides virales están formadas por múltiples copias de una o más proteínas^{67,68}, las fibras del citoesqueleto son una secuencia repetida lineal o espiralada de una misma proteína^{69,70}, etc.

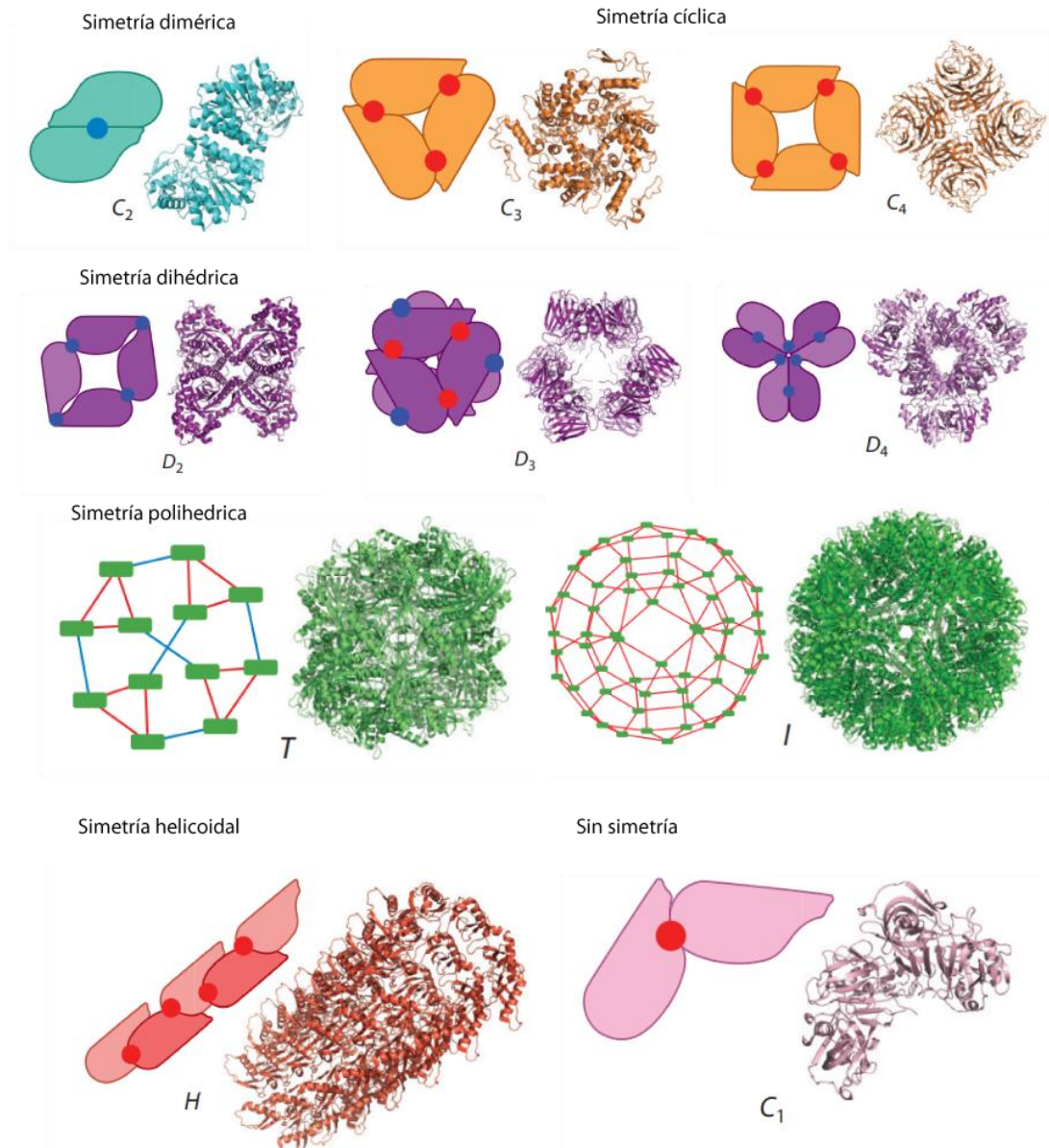


Figura 3: ejemplos de tipos de simetrías de ensamblados proteicos. Adaptado de Marsh et al. (2015)

En la actualidad existen diversas proteínas que se utilizan en nanotecnología debido a sus propiedades o actividad específica⁷¹. Algunos ejemplos conocidos son GFP, BSA^{72,73}, Neutravidina⁷⁴ y anticuerpos^{75,76}. Sin embargo, el uso de proteínas como bloques de construcción estructurales es menor. Esto probablemente se deba a las dificultades en la ingeniería de estructuras, superficies y oligomerización de proteínas. La diversidad química de los aminoácidos hace que sea difícil predecir

los cambios globales cuando se introducen mutaciones y aún más difícil diseñar estructuras proteicas desde cero. En las últimas décadas, la bioinformática estructural ha realizado grandes mejoras en esta dirección, aportando predicciones más precisas. Sin embargo, existe una gran oportunidad en la diversidad estructural natural. Solo en PDB hay más de 190.000 estructuras de proteínas, que se agrupan en unos pocos miles de familias de plegado⁷⁷. Adicionalmente, existen otras bases de datos que clasifican a proteínas por su estado oligomérico^{78–80}.

Teniendo esto en cuenta, es fácil imaginar el uso de proteínas como nano-bloques basados en una búsqueda en una base de datos en lugar de diseños complejos desde cero. El desafío de la ingeniería de proteínas con fines estructurales se puede reducir entonces a insertar modificaciones específicas en las posiciones correctas, agregando o eliminando puntos de anclaje o fusionando diferentes dominios^{25,81–87}. Existen algunas herramientas genéticas y químicas que facilitan este tipo de desafíos (figura 4). El primer grupo consiste en fusionar dominios o motivos proteicos mediante la unión de las secuencias de ambos componentes⁸⁵. Dado que los dominios y motivos suelen ser unidades de plegado independientes, dichas uniones no suelen afectar a su forma y función original. Por otro lado, usando las propiedades naturales de los aminoácidos es posible promover interacciones no covalentes entre diferentes proteínas⁸³. La introducción de pequeños motivos de unión selectiva como cremalleras de leucina o dedos de zinc también se utilizan para dimerizar polipéptidos^{79,88}.

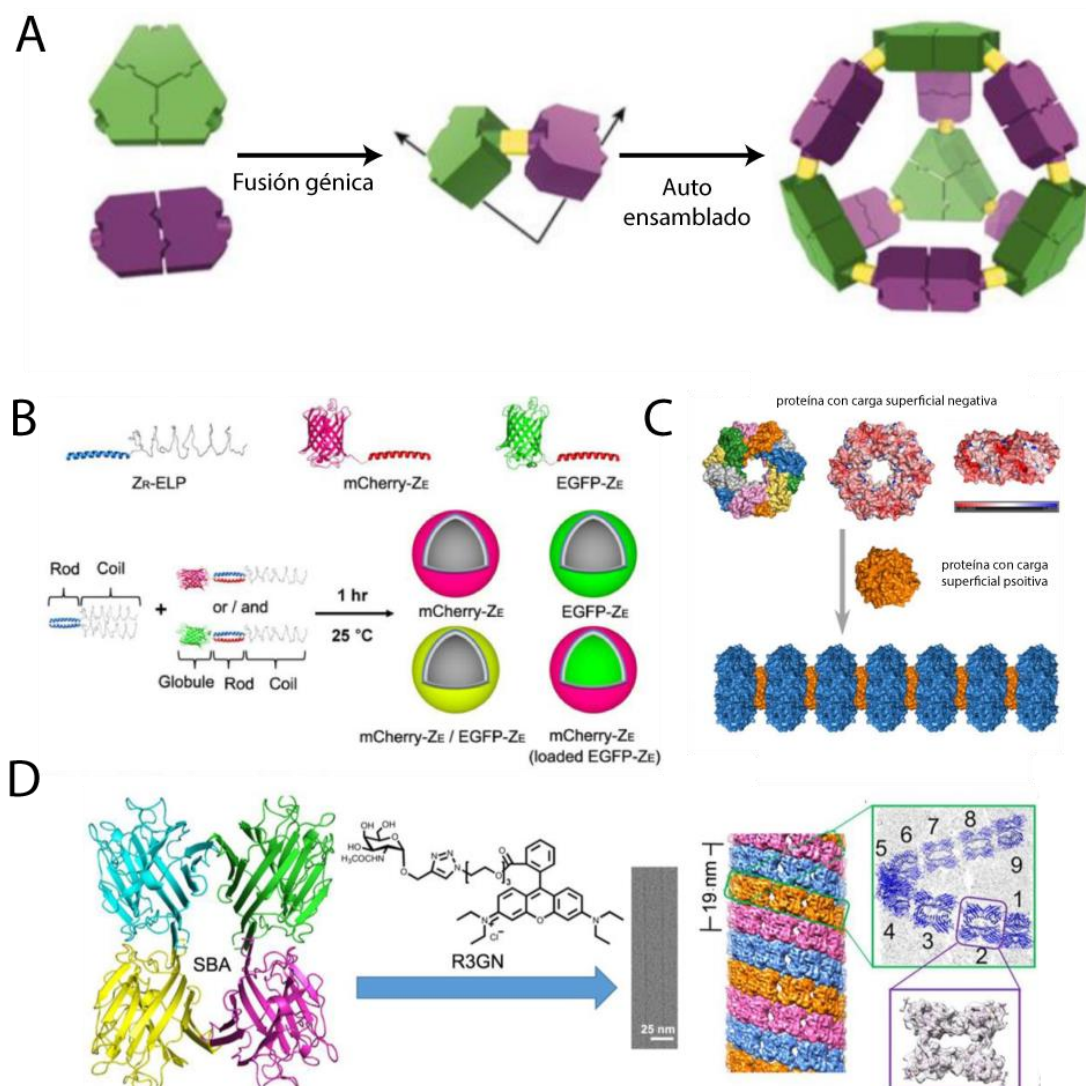


Figura 4: diseños de estructuras proteicas supramoleculares basadas en (A) fusiones de dominios (B) cremalleras de leucina (C) interacciones entre cargas (D) mediados por ligandos. (Adaptado de Sun et al. 2017)

Otras veces se utilizan aminoácidos cargados para insertar interacciones electrostáticas⁸³. Si bien dichas interacciones no suelen ser muy fuertes, la suma de varios puentes salinos puede favorecer la oligomerización de péptidos independientes. Adicionalmente, se sabe que muchas pequeñas moléculas como el hemo, la biotina o los carbohidratos pequeños, se unen a varias proteínas mediante interacciones proteína-ligando⁸³. Estas interacciones suelen no ser covalentes, pero

en algunos casos llegan a tener constantes de disociación tan bajas que en la práctica terminan siendo equivalentes a una unión covalente. Estas interacciones suelen ser aprovechadas para unir dichos dominios a diversos tipos de superficies.

Nano-estructuras híbridas

La química de ciertos grupos funcionales presentes en las biomoléculas ha abierto la puerta a la construcción de nano-estructuras híbridas^{89–93}: proteína-DNA, proteína-RNA, proteína-nanopartículas, DNA-nanopartículas, etc. En particular, si se toma en cuenta la química de los aminoácidos existe una amplia diversidad de reacciones químicas que permiten unir moléculas de manera selectiva y controlada (figura 5). La baja frecuencia natural y la reactividad particular del aminoácido cisteína, lo ha convertido en el caballito de batalla de las modificaciones químicas en proteínas⁸⁷. Sin embargo, no se trata del único aminoácido reactivo: las lisinas y tirosinas también suelen emplearse con este fin⁸⁷. Aprovechando la química de estos aminoácidos, existen varios enlazadores pequeños que pueden reaccionar con cisteínas (maleimida), lisinas o aminas terminales (N-hidroxisuccinimida, isotiocianato). Por otro lado, la introducción de aminoácidos no naturales permite desarrollar otros enfoques basados en la denominada química “click”, en los que residuos con alquenos o alquinos terminales son capaces de unirse eficientemente a azidas o tetrazinas⁹⁴.

Por otro lado, la histidina, la cisteína y el ácido aspártico tienen la capacidad de formar enlaces de coordinación con cationes tales como Ca^{2+} , Cu^{n+} , Fe^{n+} , Zn^{n+} , Co^{n+} y Ni^{n+} ($n=1,2$ o 3)^{90,95,96}. Esto abre las puertas al ensamblado de redes supramoleculares basadas complejos proteína – metal.

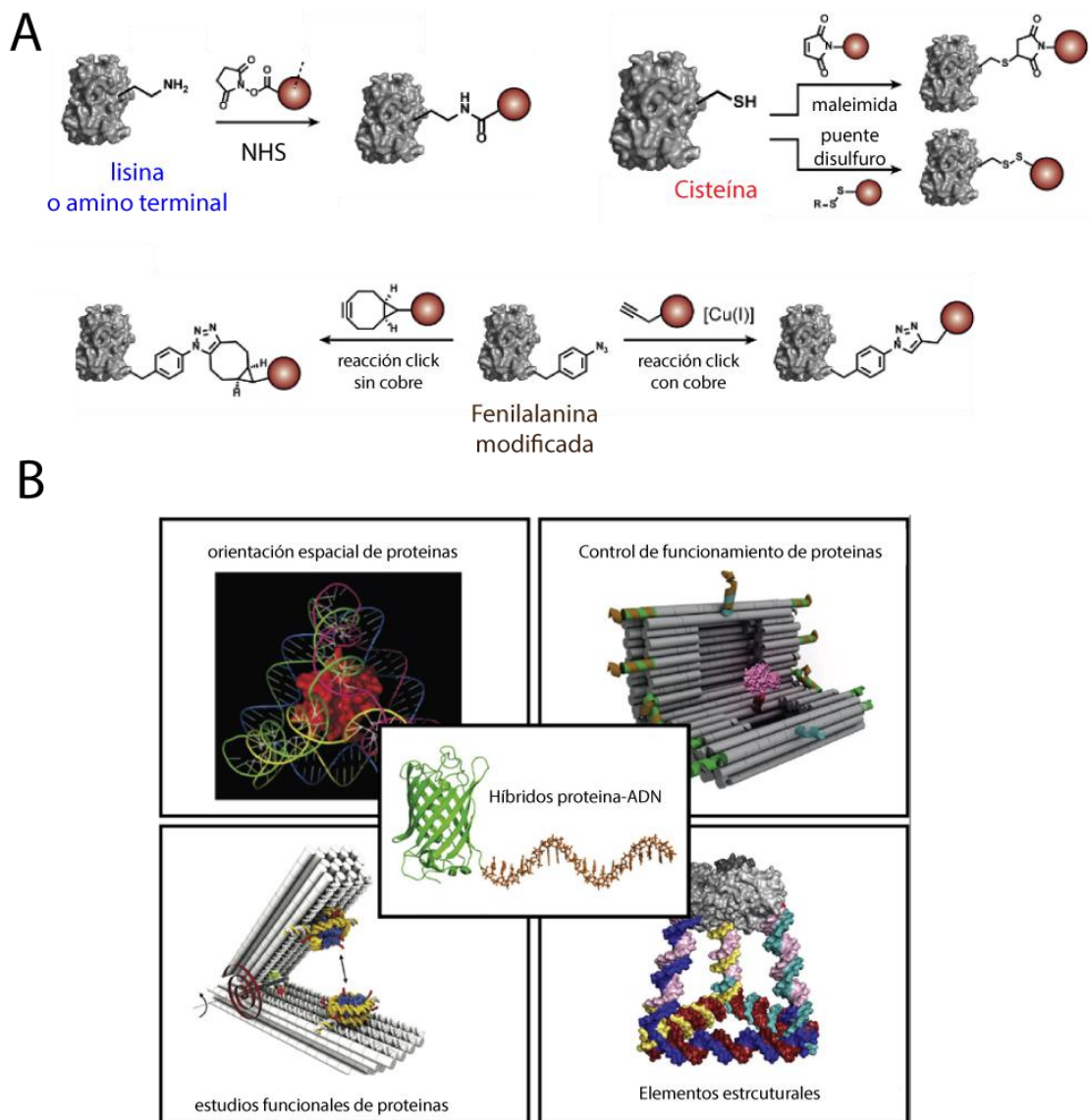


Figura 5: (A) Ejemplos de reacciones más utilizadas para unir ADN, nanopartículas y pequeñas moléculas a proteínas (B) Usos más frecuentes de estructuras híbridas de proteína-ADN. (Adaptado de Stephanopoulos, 2020)

BLS como modelo de trabajo en la nano-fabricación

Diversidad estructural de las Lumazinas Sintetas

Las Lumazinas Sintetas (LS) son enzimas involucradas en el camino sintético de las riboflavinas⁹⁷. Las mismas son un ejemplo de familia de proteínas en la que pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos generan cambios significativos

en la estructura cuaternaria^{98,99}. Si bien la estructura terciaria se encuentra bastante conservada entre especies, se puede encontrar una variedad de Lumazinas Sintetas cuya diversidad estructural va desde el pentámero (como su forma más simple), pasando por decámetros hasta icosaedros (Figura 6). Esta diversidad estructural ha llamado la atención de diversos grupos de investigación, los cuales han estudiado en detalle las LS de diversos organismos. La planta espinaca (*Spinacea oleracea*) y las bacterias *Bacillus subtilis* y *Aquifex aeolicus* expresan LSs conformadas por 60 subunidades, las cuales se pueden considerar como dodecámeros de pentámeros^{100–102}. Estas partículas, de aproximadamente 1 MDa, se las suele denominar también LSs icosaédricas. Por otra parte, los hongos *Magnaporthe grisea* y *Candida albicans*, la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* y las levaduras *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae* expresan una LS pentamérica de PM cercano a 90 kDa, sin asociación a estructuras superiores¹⁰¹. En nuestro laboratorio se ha descrito una tercera estructura cuaternaria (dímero de homopentámeros, con un PM de 180 kDa) presente en los géneros *Brucella* (denominada BLS) y *Mesorhizobium* (denominada MLS)^{99,103}. Ambas están formadas por la unión cabeza-cabeza de dos pentámeros.

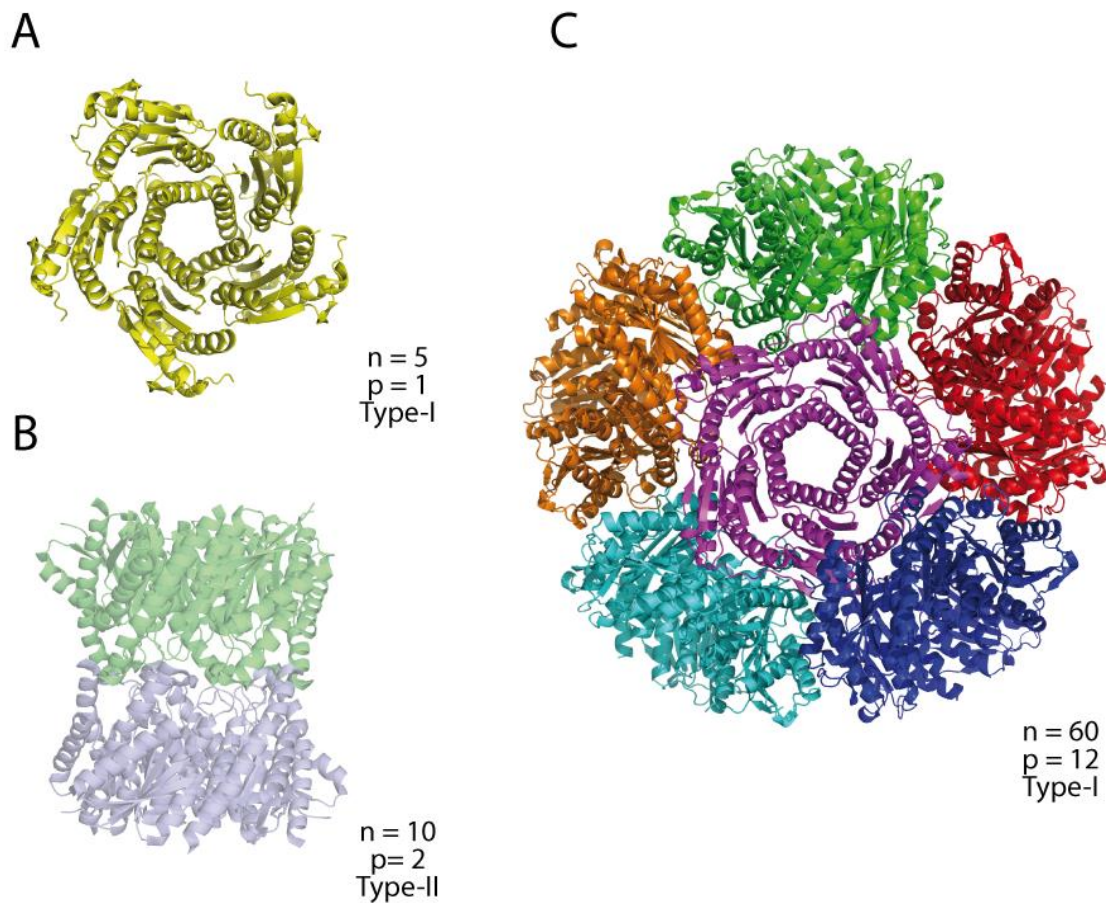


Figura 6: Diversidad estructural de Lumazinas Sintetas (A) pentaméricas (PDB 1KYV) (B) Decaméricas (PDB 1XN1) (C) icosaédricas (PDB 1RVV)

Características estructurales de BLS

BLS es una proteína extremadamente estable frente a las temperaturas ($T_m = 89^\circ\text{C}$) y frente a desnaturalizantes químicos tales como Urea y Cloruro de guanidinio^{99,103}. Su estructura es compacta en forma de barril, y resistente a una variedad de mutaciones. Por otro lado, su extremo N-terminal se lo ha caracterizado como una secuencia de 8 aminoácidos sin estructura secundaria definida. El mismo se encuentra por fuera de la estructura plegada y con gran libertad de movimiento. Esto permite que sea fácil construir proteínas quiméricas, así como modificar químicamente dicho extremo sin afectar la estructura terciaria o cuaternaria.

Es posible separar el decámetro en sus respectivos pentámeros sometiéndolo a un $\text{pH} < 5.5$ (figura 7). Sin embargo, no es posible obtener el monómero en solución, puesto que su estructura terciaria y secundaria se estabilizan por los contactos monómero-monómero de la estructura cuaternaria (pentámero).

La estructura tipo *Virus Like Particle* (VLP), permite que BLS genere una fuerte respuesta inmunológica cuando es inoculada en diversos organismos^{104–106}. Dicha respuesta inmune ha sido ampliamente estudiada, y se ha visto que la misma es mediada por los receptores TLR4.

La naturaleza polimérica, su estabilidad, su elevada inmunogenicidad, así como la facilidad de unión a otras secuencias proteicas convirtió a BLS en una excelente plataforma empleada como presentadora de antígenos^{107–112}. Actualmente se están desarrollando aplicaciones en el campo de la producción de anticuerpos policlonales en equinos con fines terapéuticos^{113,114}.

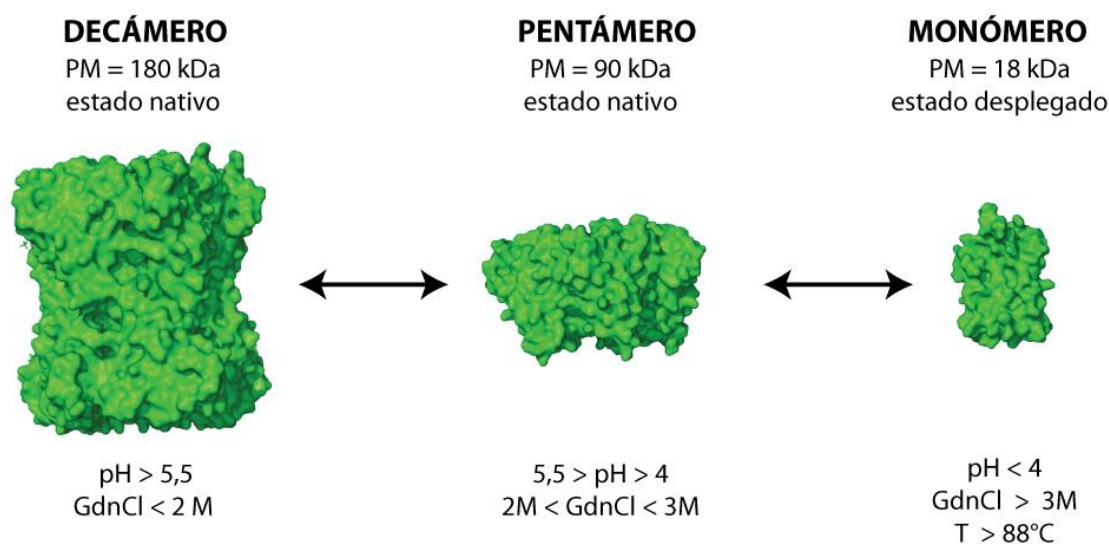


Figura 7: estados de oligomerización y de plegamiento de BLS bajo distintas condiciones de pH, temperatura y concentración de desnaturizante

Mutantes pentaméricas de BLS

En nuestro laboratorio se ha estudiado en detalle la naturaleza de los contactos presentes en la interfaz pentámero-pentámero. Se han identificado aquellos

aminoácidos involucrados en estas interacciones, así como la relevancia de cada uno en la formación del decámero^{99,103}. Dicho estudio ha permitido diseñar 2 mutantes pentaméricas complementarias entre sí (llamadas KE y DR por las mutaciones introducidas), que pueden unirse para formar un nuevo decámero, dímero de heteropentámeros¹¹⁵ (Figura 8). La mutante KE conserva la estabilidad de la proteína *wild type*, así como su inmunogenicidad. La mutante DR presenta una disminución tanto en la estabilidad como en la inmunogenicidad. Así mismo, la formación del dímero de heteropentámeros es completa y el mismo conserva las propiedades del decámero original. Esto ha abierto la posibilidad de construir estructuras asimétricas, modificando por separado cada uno de los pentámeros. como prueba de concepto se construyó una quimera de KE con un dominio de unión a ácido siálico la cual tiene ahora la capacidad de unirse a membranas celulares. El pentámero DR fue derivado con un fluoróforo de manera tal que al ensamblar el decámero, fue posible visualizar membranas celulares en un microscopio confocal¹¹⁵.

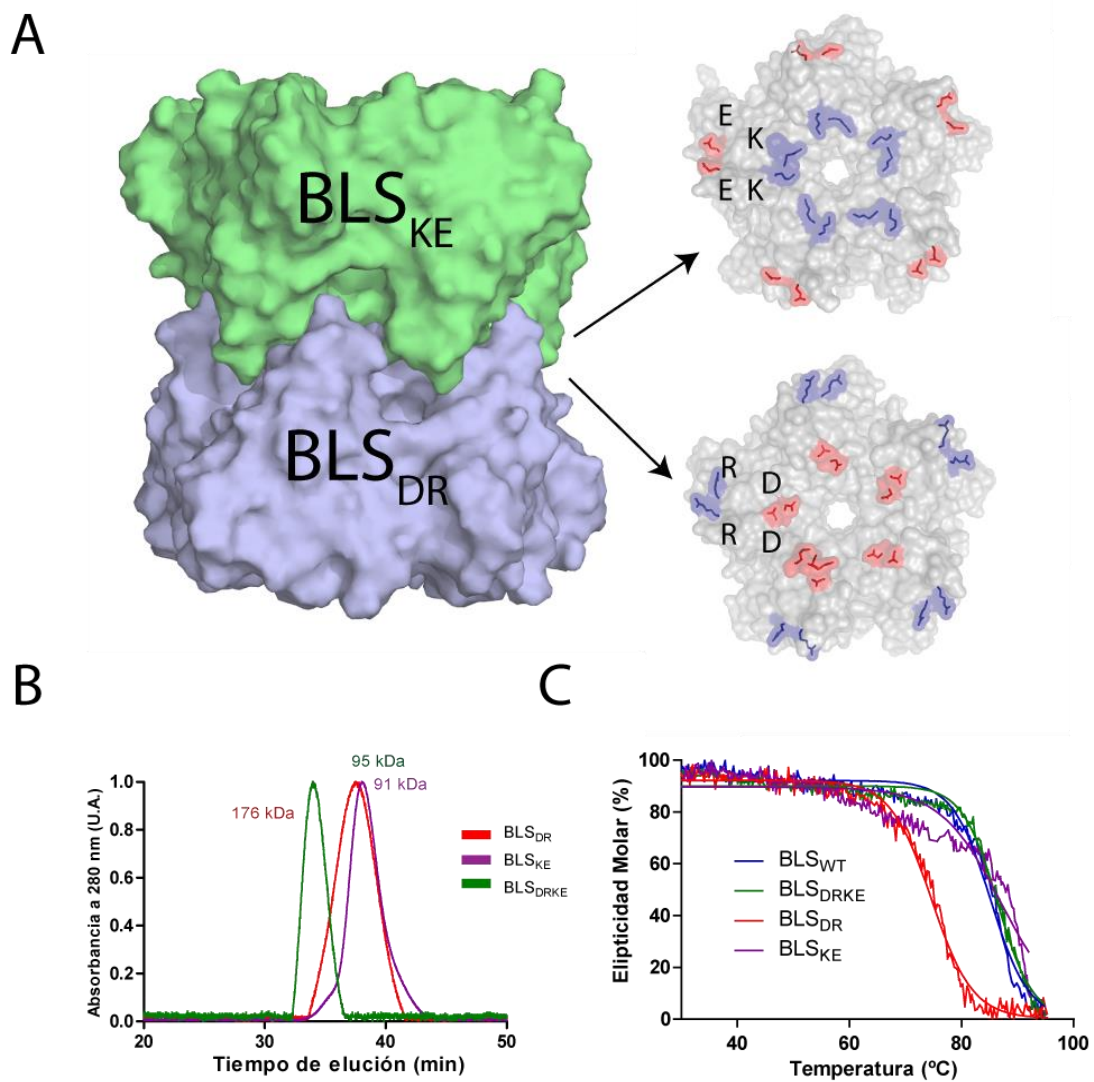


Figura 8: (A) vista lateral del ensamblado decamérico BLS_{DRKE} y vista frontal de las mutaciones en BLS_{DR} y BLS_{KE} (B) SEC-SLS de las mutantes pentaméricas y del ensamblado decamérico (C) perfil de desnaturalización térmica seguido por dicroísmo circular a 222 nm de las mutantes pentaméricas y del ensamblado decamérico

Empleo de nanoscopías para el abordaje de preguntas biológicas

Fluorescencia

La fluorescencia es un caso particular de luminiscencia por el cual algunas sustancias tienen la capacidad de absorber luz a una determinada longitud de onda para luego emitir en otra. A las partículas o moléculas que tienen la capacidad de fluorescer se las denomina fluoróforos, los cuales se los puede clasificar en fluoróforos orgánicos^{116,117}, proteicos^{118,119}, puntos cuánticos^{120,121}, entre otros (figura 9).

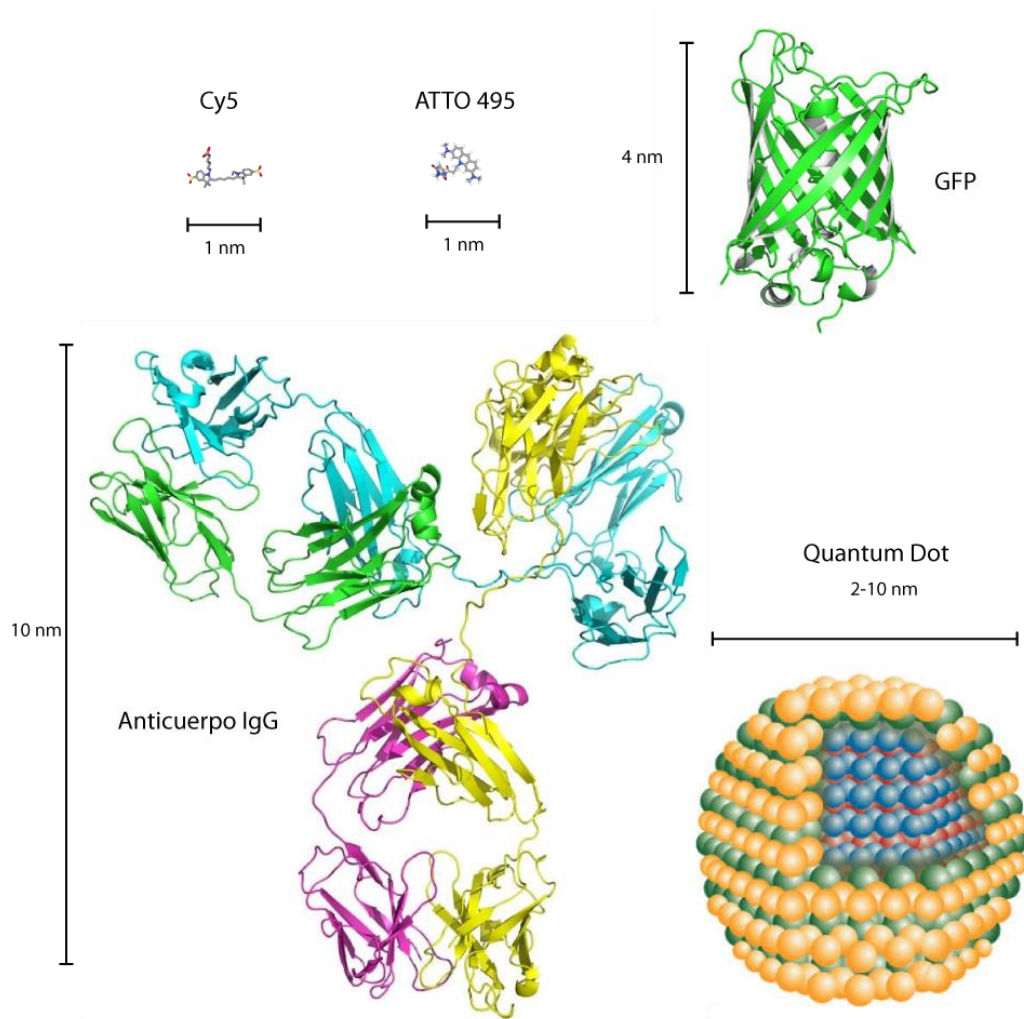


Figura 9: estructuras y tamaños representativos de fluoróforos orgánicos (CY5 y ATTO 495), proteicos (GFP) y quantum dots. Se incluye la estructura y tamaño de un anticuerpo como referencia.

El fenómeno de fluorescencia puede ser explicado mediante el diagrama propuesto por Jablonski^{122,123} (figura 10). El proceso se inicia cuando una molécula absorbe un fotón de energía suficiente para impulsar la transición de un electrón desde su orbital basal (normalmente un singlete llamado S0) a otro orbital de mayor energía (usualmente un singlete excitado denominado S1 o S2). En cada uno de estos estados pueden existir distintos sub-niveles de estados vibraciones. Independientemente del nivel de energía al que es excitado dicho electrón, este relaja rápidamente al estado vibracional de menor energía de S1. En este punto el electrón puede decaer al estado basal de muy diversas maneras que dependen de la identidad y el entorno del fluoróforo. Si el electrón pasa directamente de S1 a S0 emitiendo un fotón, llamaremos a este proceso fluorescencia, el cual ocurre típicamente en el orden de los nanosegundos. Por otro lado, el electrón excitado puede cambiar su spin y realizar un cruce inter-sistema a un estado triplete (T1). La vuelta a S0 desde este punto con la emisión de un fotón se llama fosforescencia. Es un proceso mucho menos probable, que requiere nuevamente un cambio de spin, y suele ocurrir en el orden de los milisegundos a segundos. Es habitual que las moléculas fluorescentes presenten ambos fenómenos. Como las tasas de transición singlete-triplete son mucho menores que las tasas de transición singlete-singlete, la emisión de fluorescencia suele estar interrumpida por periodos oscuros correspondientes a las excursiones a T1, es decir con duración en el rango de milisegundos a segundos. Este efecto se conoce como parpadeo o *blinking*. Finalmente, el electrón excitado puede volver a su estado basal mediante diversos mecanismos de relajación no radiativa.

Otra posibilidad para una molécula fluorescente excitada es utilizar la energía extra para cruzar barreras de potencial de alguna reacción química. Se denomina fotoblanqueo (*photobleaching* en inglés) al proceso en el que el fluoróforo sufre una alteración fotoquímica que lo deja inactivo en términos de la fluorescencia. En el caso de moléculas individuales, este fenómeno se observa como una interrupción

abrupta de la emisión, que se diferencia del parpadeo porque es permanente. Este fenómeno limita el número de ciclos de excitación-relajación que una molécula puede realizar, y en consecuencia el número de fotones que puede entregar. El fotoblanqueo suele ser no deseado ya que limita la información obtenible a partir de mediciones de fluorescencia.

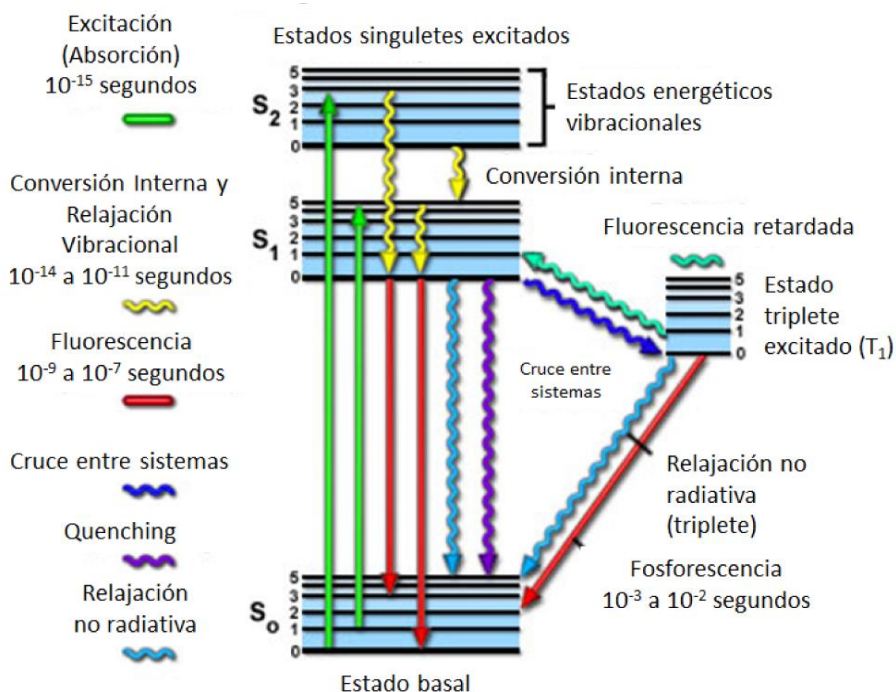


Figura 10: Diagrama de Jablonski (adaptado de <https://www.olympus-lifescience.com/>)

El análisis del diagrama de Jablonski muestra como la energía de fotón emitido por fluorescencia es siempre menor que la del fotón absorbido, es decir, de longitud de onda. Esta observación es llamada “corrimiento de Stokes” y explica por qué los espectros de emisión de fluorescencia se encuentran corridos siempre a mayor longitud de onda que sus respectivos espectros de excitación (figura 11). Por otro lado, y como se ha dicho previamente, el fenómeno de fluorescencia ocurre (en la mayoría de los casos) desde el estado vibraciones más bajo de S_1 , sin importar el nivel inicial de excitación. Consecuentemente, espectro de fluorescencia tendrá

siempre la misma forma, independientemente de la longitud de onda de excitación (regla de Kasha).

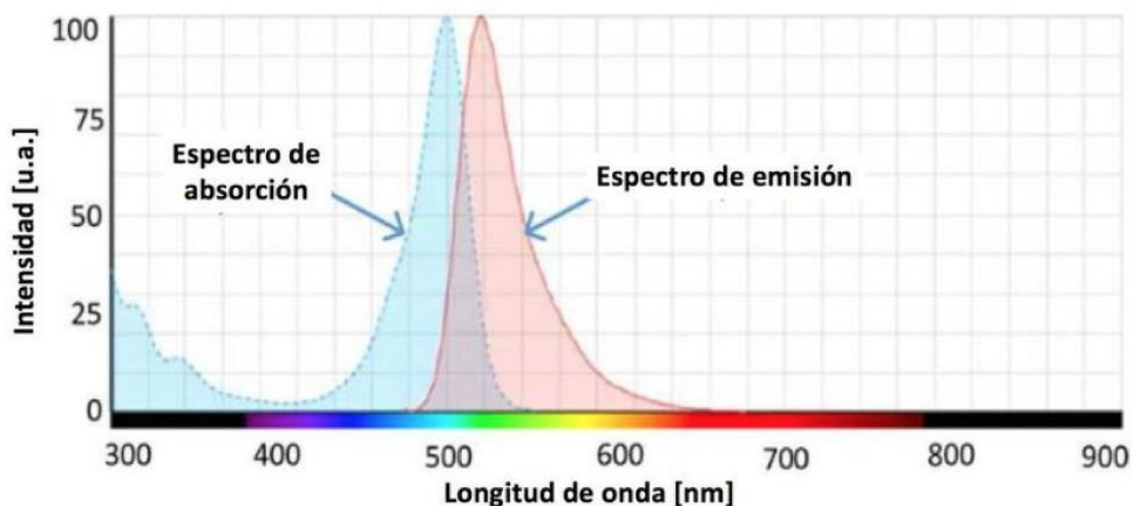


Figura 11: ejemplo de espectro de absorción y emisión de un fluoróforo

El tiempo de vida media y el rendimiento cuántico son dos de los parámetros más característicos de un fluoróforo^{124–126}. El tiempo de vida media (τ) se define como el tiempo promedio que tarda un fluoróforo en pasar del estado excitado al estado basal. La emisión de fluorescencia es un proceso aleatorio. El tiempo de vida es un valor medio del tiempo transcurrido en el estado excitado y sigue una distribución exponencial. Existe una variedad de métodos para medir dicho parámetro, de las cuales la más utilizada es el conteo de fotones únicos correlacionados en el tiempo o TCSPC por sus siglas en inglés. Por otro lado, el rendimiento cuántico de fluorescencia es la relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos. Matemáticamente se lo puede expresar como el cociente entre la tasa de emisión de fotones y la suma entre esta y la tasa de decaimiento no radiativo.

Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es un tipo particular de microscopía óptica que emplea fluoróforos como sondas^{127–129}. Se trata en realidad de un conjunto de

técnicas que se diferencian de la microscopía óptica tradicional por iluminar la muestra a una determinada longitud de onda (adecuada para excitar a los marcadores fluorescentes) y recolectar la imagen proveniente de la misma a otra longitud de onda (aquel rango en el que la sonda emite fluorescencia). Es ampliamente utilizada para observar muestras biológicas debido a que nos ofrece una gran sensibilidad (es posible detectar fluoróforos individuales), es una técnica poco invasiva y compatible con la biología, y ofrece selectividad a través de una enorme biblioteca de protocolos para marcar biomoléculas con fluoróforos de manera específica.

Las microscopías de fluorescencia se clasifican en dos grandes grupos según su esquema de excitación/detección: microscopías de campo amplio y microscopías de barrido o confocales (figura 12).

La microscopía de fluorescencia de campo amplio¹³⁰ se caracteriza por iluminar un área de la muestra y detectar la fluorescencia emitida en una cámara que reconstruye la imagen en función de la intensidad de luz que le llega a cada pixel de la misma. El esquema se completa con filtros de excitación a la salida del haz de excitación y filtros de emisión antes de la cámara para seleccionar los rangos de longitud de onda correspondientes.

La microscopía de barrido¹³¹, a diferencia de la anterior, emplea un láser enfocado para iluminar la muestra, en un área limitada por el tamaño del foco. La fluorescencia emitida es detectada por un detector puntual. Para obtener una imagen, se necesita mover la ubicación del área iluminada/detectada por la muestra, midiendo en cada punto la señal de fluorescencia. Habitualmente se emplea un *pinhole* confocal frente al detector que evita que fluorescencia que de otros puntos de la muestra sea detectada. Esta modalidad, denominada microscopía confocal, brinda una mayor relación señal-fondo y una mejor capacidad de seccionado óptico para obtener imágenes en tres dimensiones.

A diferencia de los confocales, los microscopios de campo amplio colectan luz proveniente de todo el volumen de muestra iluminado. Esto puede ser un problema para ciertas aplicaciones. Existe una estrategia que permite realizar imágenes sólo

de la región cercana a la interfaz vidrio/agua (unos 100-200 nm de espesor). Esto permite ver la fluorescencia en la superficie del portaobjetos con una mejor relación señal/ruido. El fenómeno subyacente a esta técnica es la reflexión total interna^{132,133} (TIRF por sus siglas en inglés). Brevemente, si se incide la muestra con un determinado ángulo, mayor al ángulo crítico, la ley de Snell asegura que ningún haz se verá transmitido más allá de la interfaz. Así, sólo serán excitados los fluoróforos que sean alcanzados por una onda evanescente que no recorre más de 200 nm de distancia.

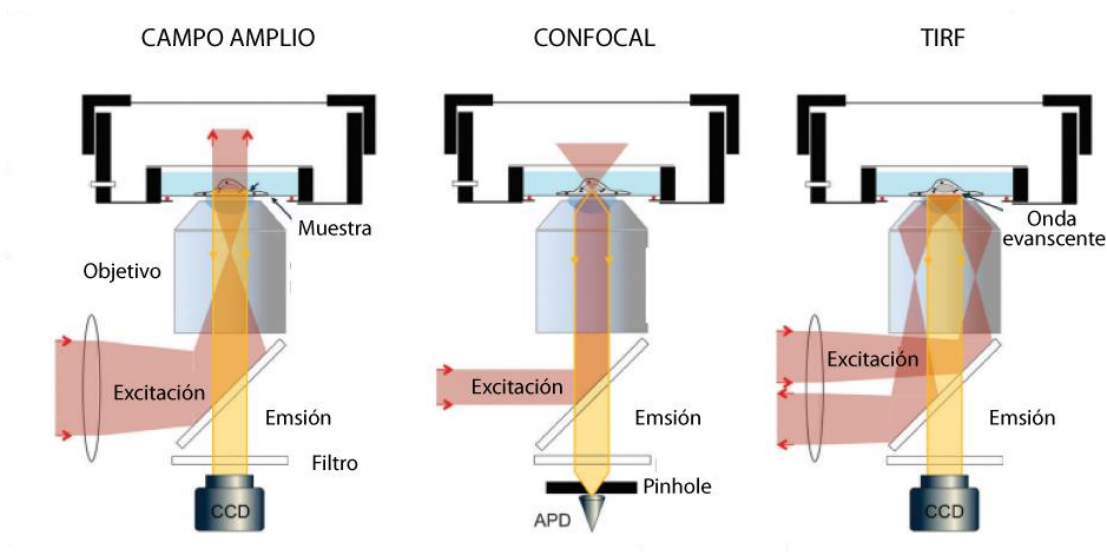


Figura 12: tipos de microscopios de fluorescencia (adaptado de Park et al. 2015)

El límite de la difracción

Como toda microscopía óptica, la resolución de la microscopía de fluorescencia está determinada por el límite de difracción¹³⁴. Este fenómeno es responsable de que la imagen de una fuente puntual de luz tenga un tamaño finito, comúnmente llamado PSF (por sus siglas en inglés: *Point spread function*). La PSF tiene la forma de un disco de Airy y su diámetro es aproximadamente la mitad de la longitud de onda de la luz emitida (200-300 nm). Esto impone un límite para obtener información sobre lo que ocurre en escalas inferiores.

Enfoques para acceder a la super-resolución

A pesar de que el límite de difracción es un fenómeno físico inevitable, existen estrategias que permiten salvar esta limitación y acceder así a mejores resoluciones espaciales, llegando en algunos casos a resoluciones nanométricas^{135,136}. Todas las microscopías de super-resolución (o nanoscopías) se basan en “encender” y “apagar” fluoróforos, es decir en habilitar o deshabilitar su capacidad de fluorescer (figura 13). Se las suelen agrupar en 2 grandes categorías^{137,138}: las que emplean microscopios de campo amplio (STORM, PALM, DNA-PAINT) y aquellas que se basan en microscopía de barrido (STED, RESOLFT).

Las primeras, también llamadas microscopias de fluorescencia por ubicación de moléculas individuales ^{139,140} (SMLM por sus siglas en ingles), se fundamentan en que la coordenada espacial de moléculas fluorescentes individuales se puede determinar con alta precisión si sus PSF no se superponen. Si se asume que la PSF corresponde a un solo fluoróforo, es posible obtener la posición del mismo a partir de un ajuste para obtener el centro de la PSF. Para evitar superposiciones entre las PSF de moléculas individuales, las emisiones fluorescentes de moléculas distintas se separan estocásticamente en el tiempo. Luego, se adquieren secuencialmente muchas imágenes de campo amplio del mismo campo de visión (FOV por sus siglas en ingles), de modo que muchas, idealmente todas, las moléculas fluorescentes queden registradas en al menos un cuadro de la secuencia. A continuación, las imágenes se procesan computacionalmente para determinar la posición de todas las moléculas detectadas. Finalmente, todas estas localizaciones se acumulan para ensamblar una sola imagen de super-resolución. La resolución de esta imagen está determinada por la exactitud y precisión con la que se localizan las moléculas individuales.

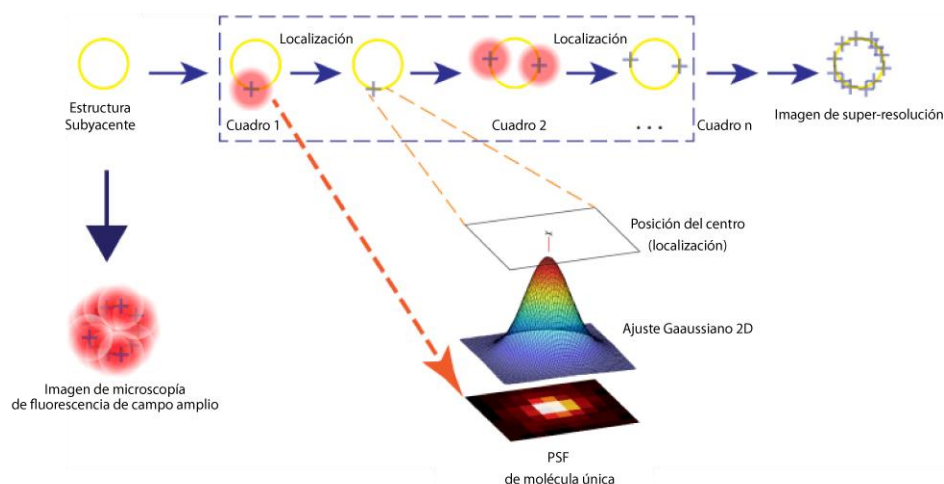


Figura 13: Principio racional de la construcción de imágenes de super-resolución en las técnicas de SMLM (adaptado de Khater et al. 2020)

El otro grupo de métodos, como STED y RESOLFT, se basa en fluoróforos cuya emisión puede suprimirse usando luz en coordenadas espaciales definidas^{141,142} (nanoscopías dirigida por coordenadas). En este enfoque, se superponen dos haces. Uno para excitar la fluorescencia, y otro para suprimirla. El segundo haz se genera con mínimos de intensidad (uno, varios o muchos), idealmente con intensidad cero. La idea es que solo los fluoróforos cerca de estos mínimos (ceros) serán capaces de emitir fluorescencia. También se puede implementar el escenario inverso, es decir, el encendido en todas partes menos en los mínimos.

Las técnicas de SMLM tienen la ventaja de ser relativamente sencillas en términos de instrumentación en comparación con las de STED/RESOLFT, por lo que su uso se ha ampliado mucho más. Es importante también señalar que la resolución temporal está intrínsecamente limitada en las técnicas SMLM debido al registro secuencial de la posición de las moléculas individuales.

Análisis de moléculas/partículas individuales: más allá de la información espacial

El análisis de partículas individuales puede dar mucha más información además de la distribución espacial. De hecho, en los últimos 20 años ha sido empleada para resolver preguntas en el campo de la biología estructural y la biofísica^{143–145}. La ventaja de este enfoque es que da acceso a sub poblaciones, en contraposición a los parámetros promedio medidos por técnicas de ensamble. Por ejemplo, al analizar las trazas temporales de fluorescencia de moléculas individuales, se puede acceder a mucha información del comportamiento de fluoróforos que luego se puede traducir en información biofísica. En la figura 16, se puede observar como a partir de una traza es posible observar los tiempos de encendido y apagado del fluoróforo. Esto permite calcular otros parámetros tales el número total de fotones emitidos antes del fotoblanqueo, la frecuencia de los ciclos de encendido, el *duty cycle*, entre otros.

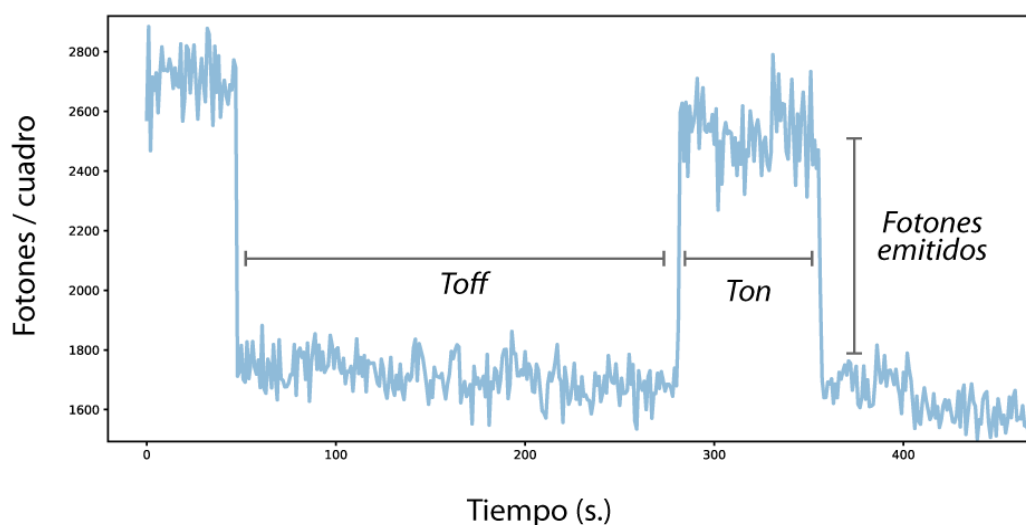


Figura 16: ejemplo de traza de fluorescencia de una molécula única y principales parámetros

Por otro lado, en los últimos años se han desarrollado varios enfoques basados en SMLM que abordan preguntas como el número de copias de biomoléculas agrupadas en distancias nanométricas o el número de marcas fluorescentes por macromolécula (Figura 17). Algunos de ellos se basan en la medición de la

intensidad de la emisión (IBC), otros en las estadísticas de fotones o parpadeo (qSMLM, qPAINT, CoPS), o los escalones hasta el fotoblanqueo (PBSC).

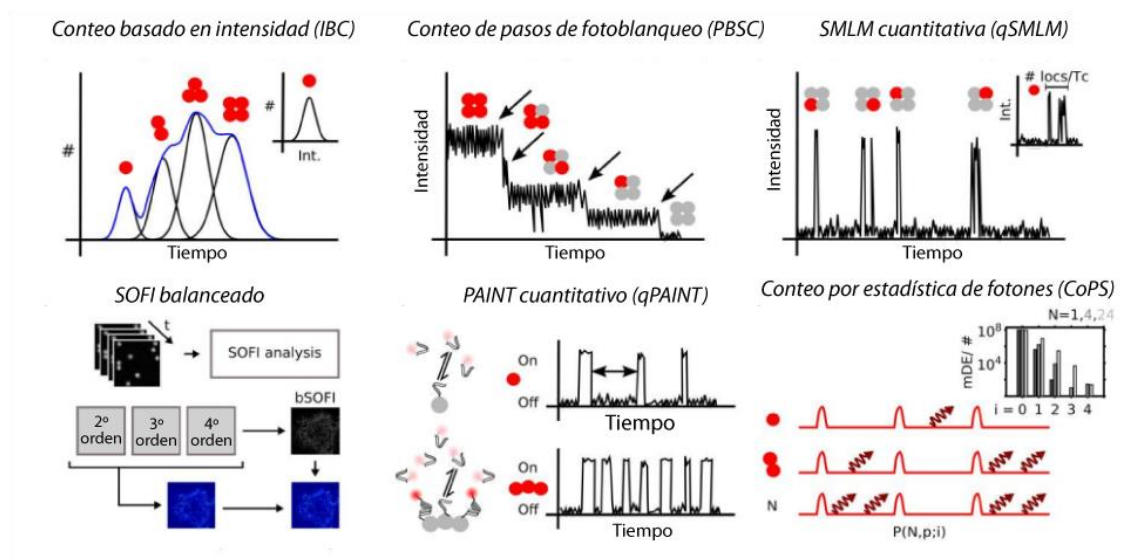


Figura 17: Métodos cuantitativos basados en fluorescencia molécula único para la estimación del número de fluoróforos (adaptado de Grußmayer et al. 2019).

Motivación y objetivos

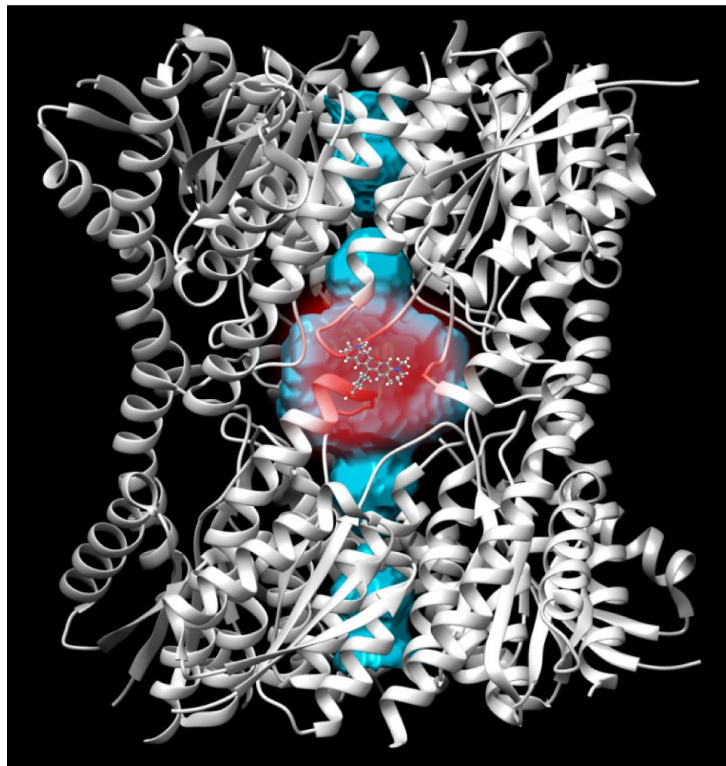
Las microscopías de super-resolución han alcanzado recientemente resoluciones que se encuentran en el mismo orden de magnitud que las macromoléculas biológicas. Estos avances permiten pensar en el uso de las mismas no sólo para el abordaje de preguntas en el campo de la biología celular sino también en el campo de la biología estructural. Para ponerlas a prueba, es necesario poder contar con estructuras de referencia. Una condición para que una estructura sea tomada como referencia es contar con información estructural lo más detallada posible de la misma. Varias estructuras celulares, tales como los complejos de poro nucleares o proteínas del citoesqueleto cumplen con este requerimiento. Por otro lado, si bien la ingeniería de proteínas ha avanzado a pasos agigantados y es posible construir y modificar estructuras proteicas con precisión nanométrica, esta estrategia no ha sido ampliamente utilizada. El desafío de la incorporación de proteínas como

herramientas para el desarrollo de nano-estructuras radica en el control y la buena predicción de los cambios estructurales y funcionales obtenidos por mutaciones puntuales, derivatizaciones químicas o fusiones.

El objetivo general de este trabajo es emplear a la proteína BLS como bloque de construcción de nano-estructuras.

- El primer objetivo consiste en emplear a BLS como una caja que permita albergar una cantidad limitada, ordenada y controlada de fluoróforos.
- El segundo objetivo consiste en utilizar a una forma pentamérica de BLS como herramienta para lograr imágenes de súper-resolución.
- El tercer objetivo es desarrollar una metodología para medir la movilidad y orientación relativa de fluoróforos dentro de una estructura proteica.
- El cuarto objetivo es combinar nanoscopías de segunda generación para obtener información estructural de proteínas, empleando como referencia a la proteína BLS.
- El quinto objetivo consiste en usar a BLS para construir nano-antenas ópticas.

CAPÍTULO 1: BLS COMO NANO-CAJA DE FLUORÓFOROS



Colaboración: Hernán Bonomi (diseño), Jimena Rinaldi (análisis biofísicos) y Cecilia Zaza (microscopía de molécula única)

Características de la cavidad de BLS

La estructura cuaternaria de diversas proteínas les confiere la capacidad de albergar moléculas en su interior. En algunos casos, como la ferritina^{146,147}, las chaperonas^{148–150} o las cápsides virales^{151,152}, dicha cavidad está vinculada con su función biológica. En el afán de aprovechar dicha característica, muchos trabajos han mostrado la posibilidad de emplearlas como nano-cajas, capaces de almacenar y transportar pequeñas moléculas como fármacos o cromóforos^{82,153–156}. Esto abre la puerta a diversas aplicaciones, algunas en el área de la nano-medicina para el *delivery* de fármacos^{154,155,157,158} pero también otras áreas de conocimiento como el control de procesos enzimáticos¹⁵⁹ o la nanofotónica¹⁶⁰.

Desde la resolución de la estructura cristalina de BLS en 2005, se observó la presencia de un “canal” que atraviesa la estructura, que posee un diámetro máximo de 22Å en el centro y constricciones de 8 Å de diámetro en los extremos (Figura 1. 1). Durante años se buscó alguna función biológica del mismo, sin confirmarse ninguna hipótesis hasta la fecha. Independientemente de la función en la naturaleza, es posible pensar a esta proteína como una caja proteica capaz de albergar moléculas de menor tamaño. Las particularidades de BLS respecto a otras cajas proteicas existentes son tres. Por un lado, el tamaño pequeño de la cavidad permite pensar que solo pocas moléculas podrían entrar en la misma y que la movilidad de las mismas se vería restringida. Por otro lado, a diferencia de la mayoría de las cajas proteicas existentes, cuya simetría estructural es radial, BLS posee una simetría cilíndrica (similar a GroEL¹⁴⁹). Finalmente, la posibilidad de controlar el ensamblaje de los pentámeros de BLS permiten obtener una cavidad con propiedades asimétricas.

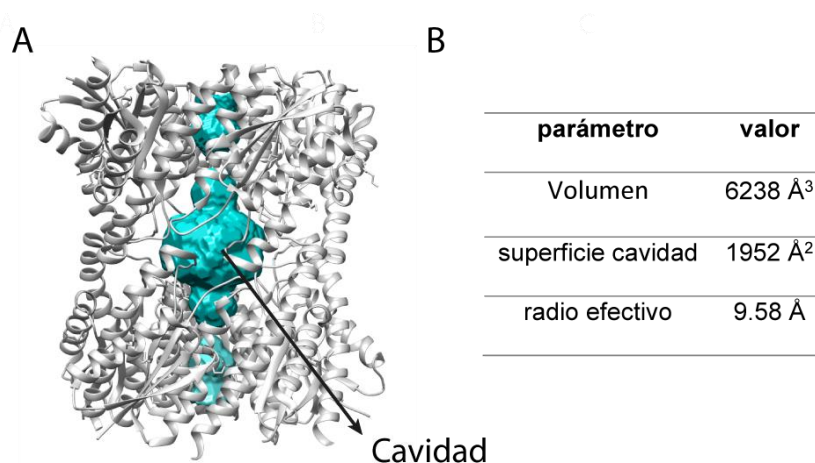


Figura 1. 1: (A) representación de la estructura cristalográfica de BLS (PDB: 1XN1), en azul se muestra la cavidad de BLS hallada con el web server Voss Volumen Voxelator (B) parámetros característicos de la cavidad central, analizados con el software 3V: Voss Volume Voxelator

Incorporación de moléculas pequeñas en la cavidad de BLS

Empleando un software de análisis de cavidades¹⁶¹ se midió la superficie, volumen y radio promedio de la cavidad de BLS, arrojando los valores que se muestran en la Figura 1. 1. Si bien en la estructura no se observa la presencia de moléculas de agua (solo las estructurales), dadas las dimensiones y la naturaleza polar de los aminoácidos que la conforman (Figura 1. 1), es de esperar que la cavidad sea un ambiente hidrofílico. Consecuentemente, la probabilidad de que moléculas orgánicas hidrofóbicas (como muchos fármacos y fluoróforos) puedan ser atrapadas en su cavidad, es baja. Se hace necesario entonces, realizar una ingeniería de la cavidad de BLS de manera tal que estas moléculas puedan ser unidas de manera covalente o transitoriamente.

Se decidió realizar estudios bioinformáticos para introducir mutaciones en la cavidad de BLS de manera tal de favorecer la inclusión de fluoróforos en la misma. Se consideraron dos estrategias: la inclusión de cisteínas reactivas en la cavidad y el rediseño de la cavidad para crear parches hidrofóbicos. La segunda opción parece más difícil. Dada la naturaleza hidrofílica de la cavidad, se necesitarían varias

mutaciones para favorecer dicho cambio. Se optó entonces por la inclusión de una cisteína. El análisis de la cavidad muestra que la misma está formada por 2 *loops* y una alfa hélice de cada monómero. De esos tres motivos, sólo el *loop* que va del aminoácido 83 al 89 no presenta contactos con otro monómero del mismo pentámero o del pentámero complementario, sugiriendo que una mutación en cualquiera de estas posiciones debería mantener inalteradas las estructuras terciaria y cuaternaria. Se analizó el efecto de una mutación puntual para cada uno de los aminoácidos del *loop* por cisteína sobre el ΔG de formación del decámero y la superficie accesible al solvente (ASA, Figura 1.2). Esto fue realizado con el software BeAtMuSiC¹⁶². Dos mutaciones se destacaron. La mutación G85C parece favorecer energéticamente la formación del decámero, pero a costa de una drástica reducción de la superficie accesible al solvente. La mutación R88C parece ser la más neutra en cuanto a estabilidad del decámero y accesibilidad al solvente. Se decidió seleccionar esta última mutación por ser la que tiene el efecto más conservador respecto a los parámetros de la proteína *wild type*.

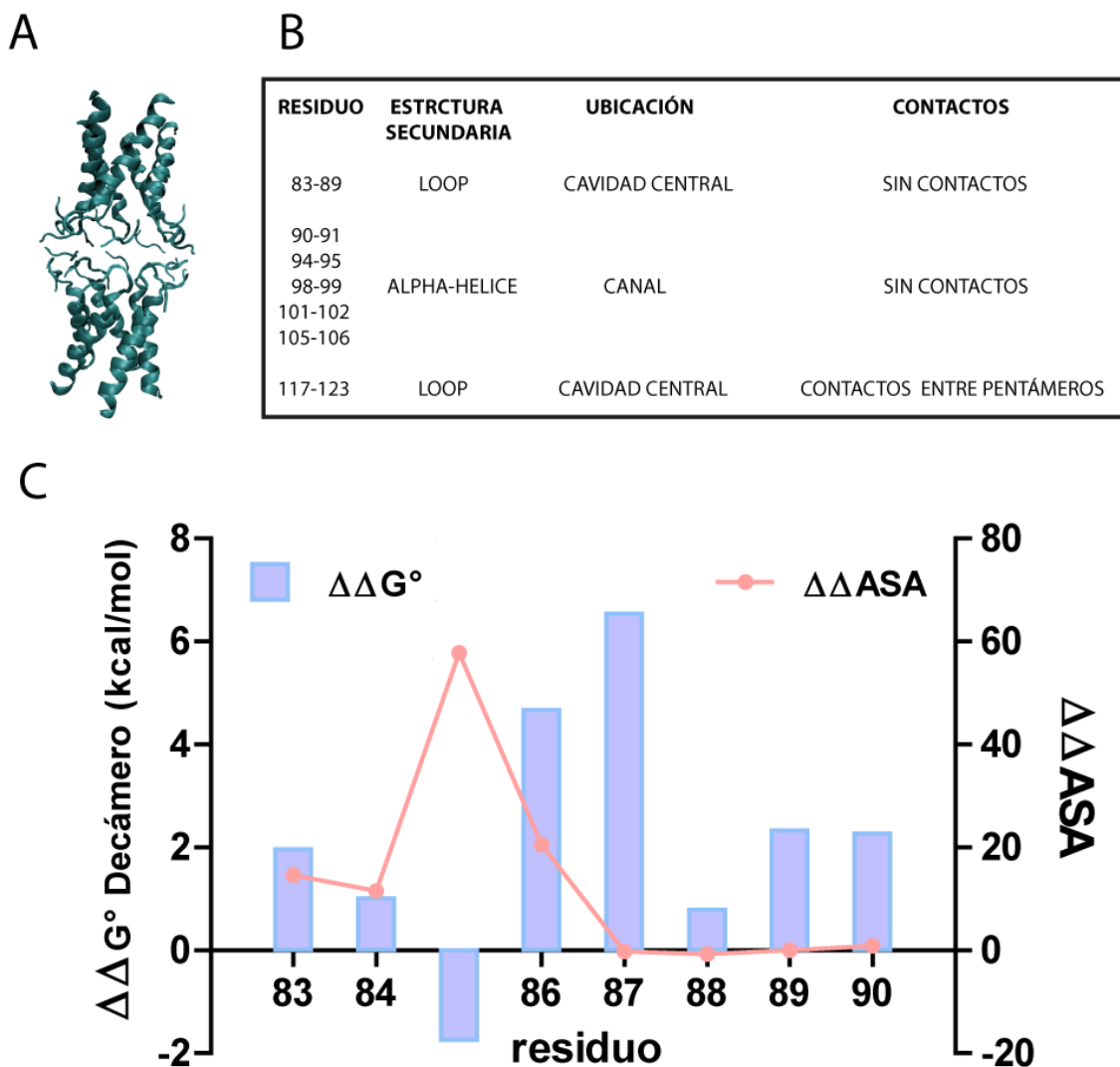


Figura 1. 2 (A) elementos estructurales que forman el canal y la cavidad de BLS, (B) tabla de aminoácidos involucrados en el canal y la cavidad y relevancia en la estructura cuaternaria, (C) análisis de efecto de mutación de cada residuo por una cisteína sobre la energía libre de Gibbs de formación del decámero ($\Delta\Delta G$) y sobre la superficie accesible al solvente ($\Delta\Delta ASA$), realizado con el software BeAtMuSiC

Adicionalmente, se analizó el efecto de dicha mutación empleando el software FoldX¹⁶³. El mismo arrojó un resultado similar sobre el ΔG de formación del decámero y mostró un efecto también bajo en el ΔG de plegamiento de la proteína, sumado a un aumento en el volumen de la cavidad. El modelo de la mutación se muestra en la Figura 1. 2.

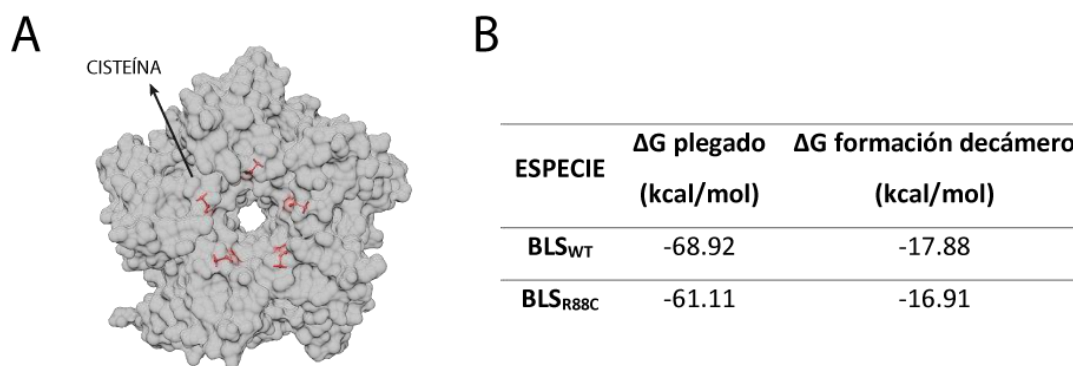


Figura 1.3 (D) Modelo estructural de la mutación in sílico R88C, basado en la estructura cristalográfica 1XN1, (E) análisis de remplazo de la arginina 88 por una cisteína en la energía libre de plegado y la energía libre de formación del decámero, realizado con el software FoldX.

Expresión, purificación y caracterización de KE88C

Se partió de una versión pentamérica de BLS previamente desarrollada en el laboratorio¹¹⁵, llamada KE, por sus mutaciones. Una vez hecha la mutación sitio-dirigida sobre KE, se procedió a seleccionar clones expresantes en dos cepas distintas de E. Coli: BL21 y BL21 pLys (Figura 1. 4). En todos los casos se expresó ON a 37°C. En base a estos los resultados, se seleccionó el clon 3 de BL21 para expresar a mayor escala y purificar.

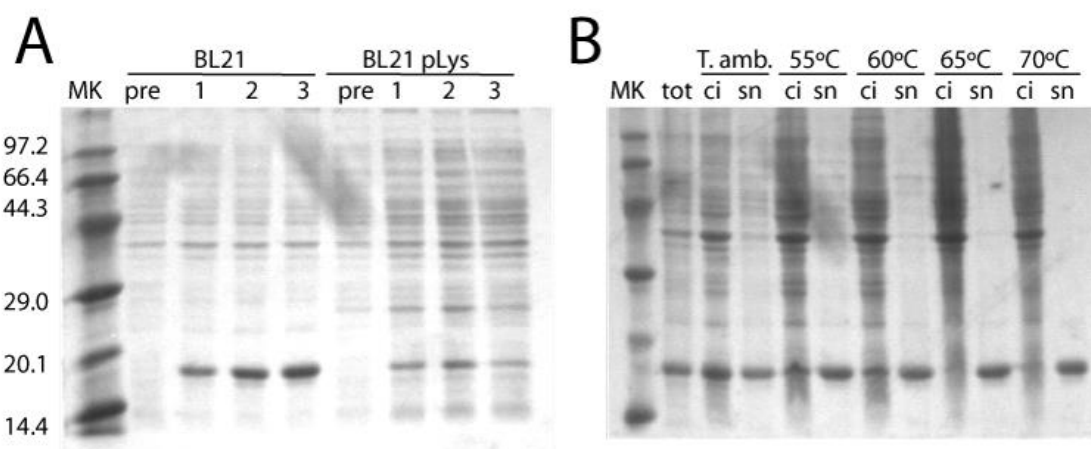


Figura 1. 4: SDS-PAGE de cultivos bacterianos inducidos ON a 37°C (A) de distintos clones de KE_{R88C} en distintas cepas; (B) de muestra lisada y calentada a distintas temperaturas. MK=marcado de peso molecular; pre=cultivo sin inducir; tot= cultivo inducido total; ci=cuerpos de inclusión; sn=fracción sobrenadante.

KE_{R88C} Fue purificada siguiendo los pasos previamente establecidos para la proteína *wild type*¹¹⁵. Dado que en trabajos anteriores resulto difícil purificar completamente a esta mutante, se decidió incluir como paso de purificación el calentamiento de la muestra lisada seguido por centrifugación. Debido a que la T_m se puede ver afectada por las mutaciones puntuales, se decidió hacer una prueba de estabilidad que consistía en calentar el lisado bacteriano a distintas temperaturas y separar los sobrenadantes de los cuerpos de inclusión + proteína agregada/desnaturalizada. La figura 3b muestra que esta mutante soporta hasta al menos 70°C sin agregarse.

Brevemente, se expreso ON a 37°C en un volumen de 1l de medio LB. Se centrifugó y resuspendió la muestra en 40 ml. Se lisó por sonicado y se separó el protoplasma de los cuerpos de inclusión por centrifugación a 40 mil revoluciones durante media hora. El sobrenadante fue calentado a 70°C y vuelto a centrifugar. Se inyectó la fracción soluble en una columna de intercambio aniónico (Q-sefarosa). La muestra fue eluida con un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. Se tomaron las fracciones enriquecidas en KE_{R88C} (Figura 1. 5). Las mismas fueron concentradas e inyectadas en una columna de exclusión molecular (s200). Se tomaron las fracciones de mayor pureza (Figura 1. 5) y se guardaron a -80°C. El rendimiento de la purificación fue de 9,4 mg por litro de cultivo.

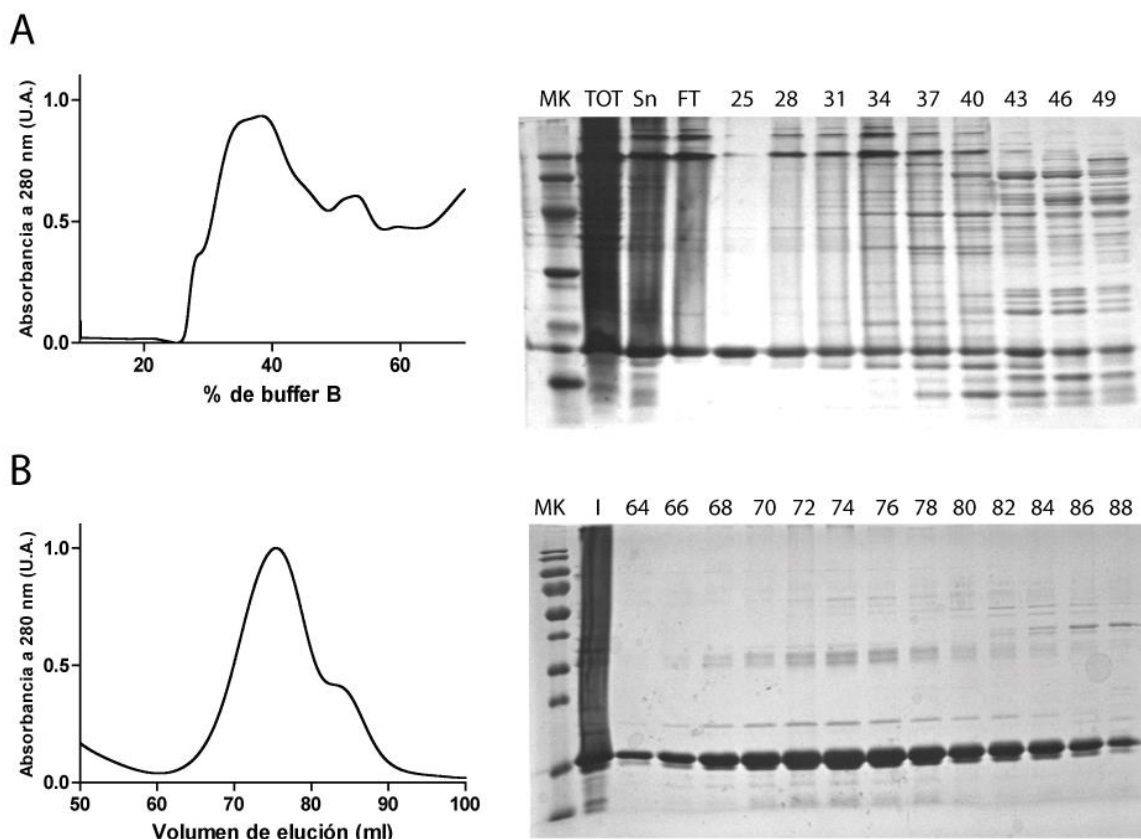


Figura 1. 5: Purificación de KE_{R88C} (A) Cromatograma y SDS-PAGE de cromatografía de intercambio aniónico (Q-sefarosa). Buffer B= NaCl 1 M (B) Cromatograma y SDS-PAGE de cromatografía de exclusión molecular (S-200), a partir de fracciones seleccionadas en Q-sefarosa.

La estructura secundaria y la estabilidad de la nueva mutante fueron estudiadas por dicróismo circular. En la Figura 1.6 se puede observar que no hay cambios significativos en espectro de KE_{R88C} respecto a la proteína *wild type* o a la mutante KE. Esto indica que la introducción del residuo cisteína en la posición indicada, no afecta significativamente a la estructura secundaria de la proteína. Sin embargo, como se puede ver en la Figura 1.6, esta mutación sí afecto a la estabilidad térmica de la proteína, pasando de una T_m de $87,8 \pm 0,3$ °C en la *wild type* a $80,4 \pm 0,2$ °C en KE_{R88C} . A pesar de esta disminución en la estabilidad, esta mutante se puede seguir considerando termo-resistente.

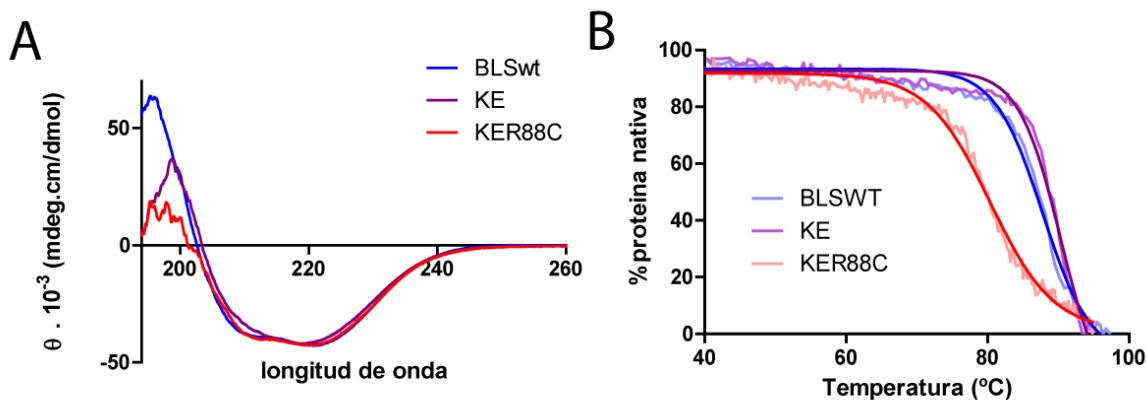


Figura 1.6: Caracterización estructural de KE_{R88C} (A) Espectro de dicroísmo circular de BLSwt, KE y KE_{R88C} (B) Porcentaje de proteína en estado nativo en función de la temperatura, seguida por la señal de CD a 222nm.

Se decidió estudiar la reactividad de las cisteínas incluidas en estado nativo y desnaturalizado de la proteína. Para esto se empleó un protocolo estándar de reactividad de tioles basado en el reactivo de Ellman^{164,165}. Se probaron dos pretratamientos: proteína sin reducir y proteína incubada con exceso de reductor (DTT), seguida de una exclusión molecular (s200). En la Figura 1.7 se puede observar una gran diferencia en la reactividad debido al pretratamiento con reductor (la reactividad se triplica). Por lo tanto, será conveniente reducir la cisteína antes de incubarla con los fluoróforos. Adicionalmente se puede ver que al desnaturalizar la proteína con cloruro de guanidinio aumentó la reactividad en ambos casos. Esto indica que la cisteína está parcialmente oculta y que puede haber impedimentos estéricos para la marcación.

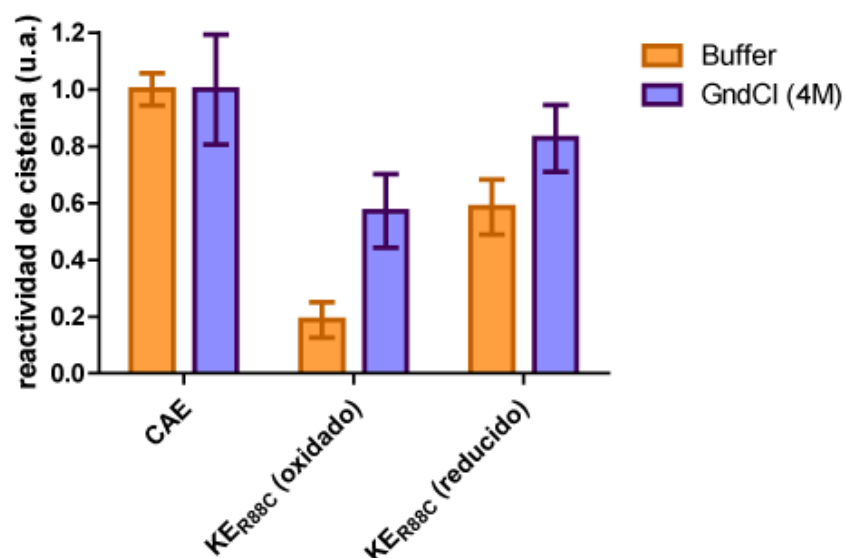


Figura 1.7: Ensayo de reactividad de cisteínas monitoreado por espectroscopía de absorbancia. La sonda empleada es el reactivo de Ellman. CAE: péptido de 7 aminoácidos con una única cisteína reducida. KE_{R88C} oxidado: sin incubación con reductor; KE_{R88C} reducido; incubado con 10 mM de DTT y purificado por exclusión molecular (s200). Buffer: TrisHCl 50 mM + NaCl 250 mM pH 8.

Marcación de KE88C con Cy3 y Cy5 y caracterización de propiedades espectroscópicas

La mutante pentamérica con una cisteína en la cavidad (KE88C) fue purificada y marcada con 2 fluoróforos: Cy3 y Cy5. En la Figura 1.8 se puede observar la estructura química y los espectros típicos de dichos fluoróforos. Brevemente, el protocolo consistió en incubar a la proteína con exceso de reductor (DTT 10 mM) durante 1 hora. Luego, el exceso de reductor fue quitado por cromatografía de exclusión molecular (superdex 200) e incubada (8°C ON) con cada fluoróforo en una concentración 10 veces mayor a la de la proteína. Finalmente se quitó el exceso de fluoróforos por cromatografía de exclusión molecular.

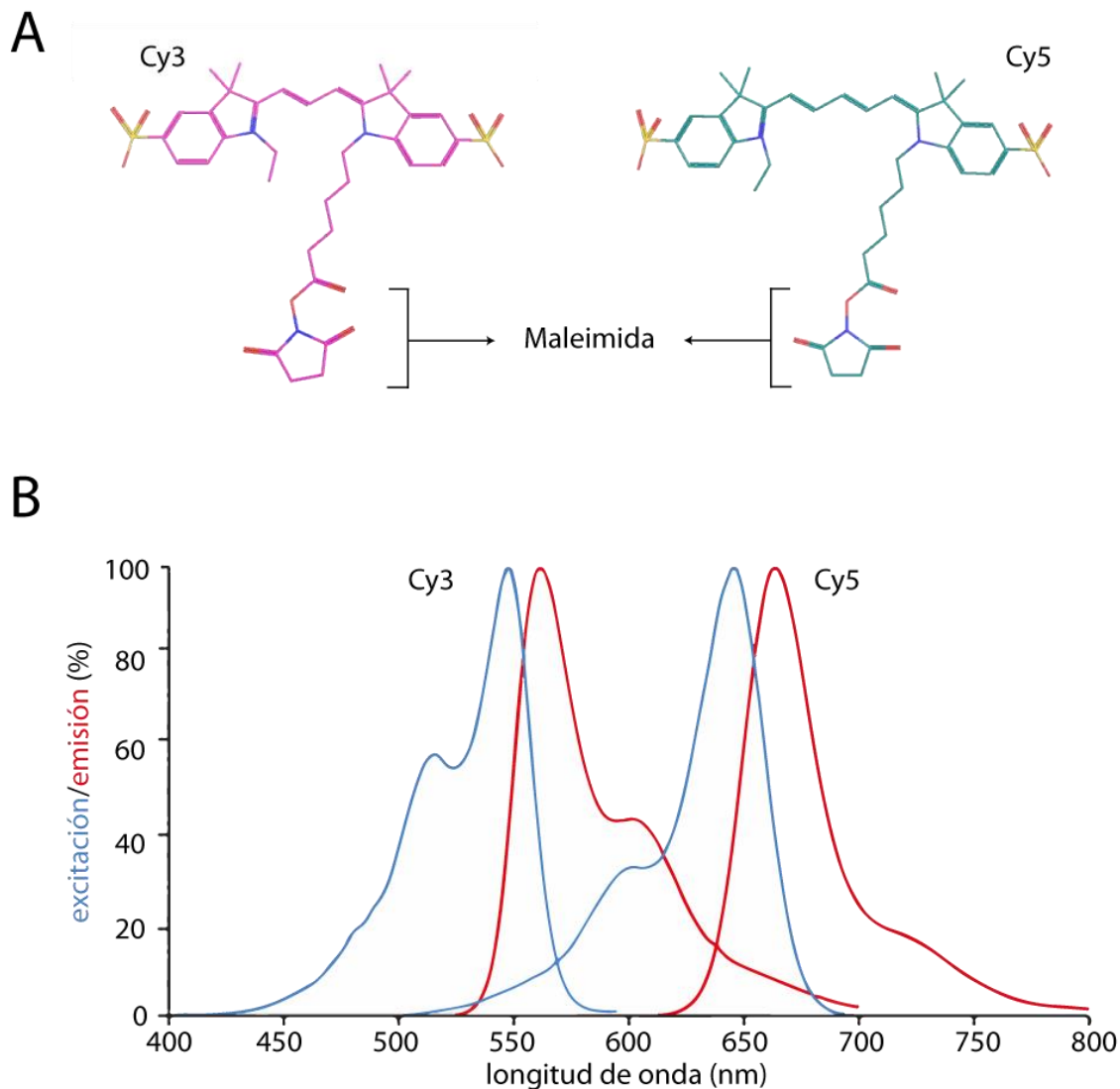


Figura 1.8: (A) estructura molecular de Cy3-maleimida y Cy5-maleimida (B) espectros de excitación y emisión de Cy3 y Cy5

El resultado de dicha marcación se muestra en la Figura 1.9. Por SDS-PAGE se puede observar una diferencia en el patrón de corrida del monómero marcado respecto al no marcado. Esto permite cuantificar la proporción de monómero marcado que en ambos casos ronda 1/3 del total de proteína. Cuando se cuantifica por absorbancia proporción de fluoróforos (DOL por las siglas en ingles de *degree of labelling*) por pentámero fue de 2.52 en el caso de Cy3 y 1.7 en el caso de Cy5.

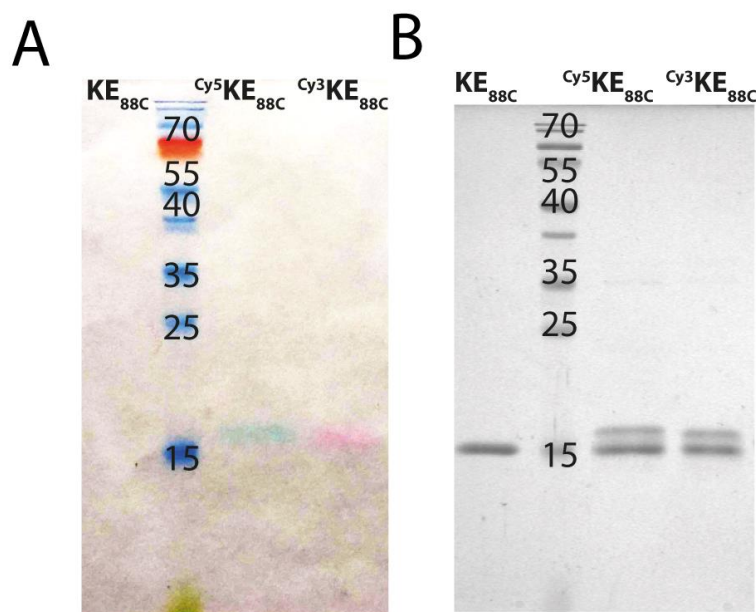


Figura 1.9: Marcación de la mutante KE88C con Cy3 y Cy5. (A) SDS-PAGE sin teñir (B) SDS-PAGE teñido con coomasie-blue. El grado de marcación (DOL) para ambas muestras fue 1,7 y 2,6 respectivamente.

Una vez obtenida la proteína marcada y cuantificada, se procedió a evaluar la formación del decámero al incubarla con la mutante DR. Como se puede ver en la Figura 1.10, dicho proceso fue evaluado por exclusión molecular seguida a la longitud de onda de absorbancia de la proteína (280 nm) y del máximo de cada fluoróforo (550 nm para Cy3 y 660 nm para Cy5). Aquí se puede observar un cambio en el patrón de corrida de la proteína indicando que el agregado de DR favorece la formación en un 100% del decámero.

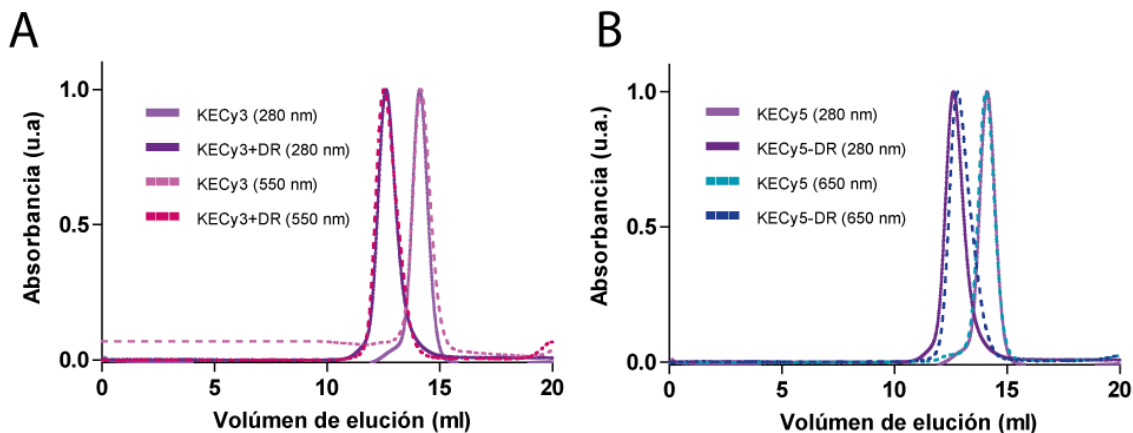


Figura 1.10: Formación del decámero KE_{88C} -DR con fluoróforo adentro seguido por cromatografía de exclusión molecular a 2 longitudes de onda. (A) Cromatograma correspondiente a Cy3 (B) Cromatograma correspondiente a Cy5

Una vez obtenidas las mutantes marcadas y comprobada la formación del decámero, se procedió a caracterizar espectroscópicamente a los 3 fluoróforos sueltos, unidos a KE_{R88C} y tras formar el decámero con el pentámero complementario (DR). En primer lugar, se hicieron espectros de absorción, los cuales se muestran en la Figura 1. 11. Tanto para Cy3 como para C5 se observan cambios significativos en la forma de los espectros. En primer lugar, se observa un pequeño corrimiento al infrarrojo, indicador de un entorno menos polar (entorno proteico), típico de cromóforos solvatocrómicos¹⁶⁶. Por otro lado, se observa el aumento significativo de absorbancia de un pico secundario a 510 nm en Cy3 y a 600 nm en Cy5. Si se observan los espectros de excitación para los 2 fluoróforos en las tres condiciones antes nombradas (Figura 1. 11B), se puede suponer que dichos picos secundarios de absorbancia no representan especies fluorescentes, esto se explicará más adelante.

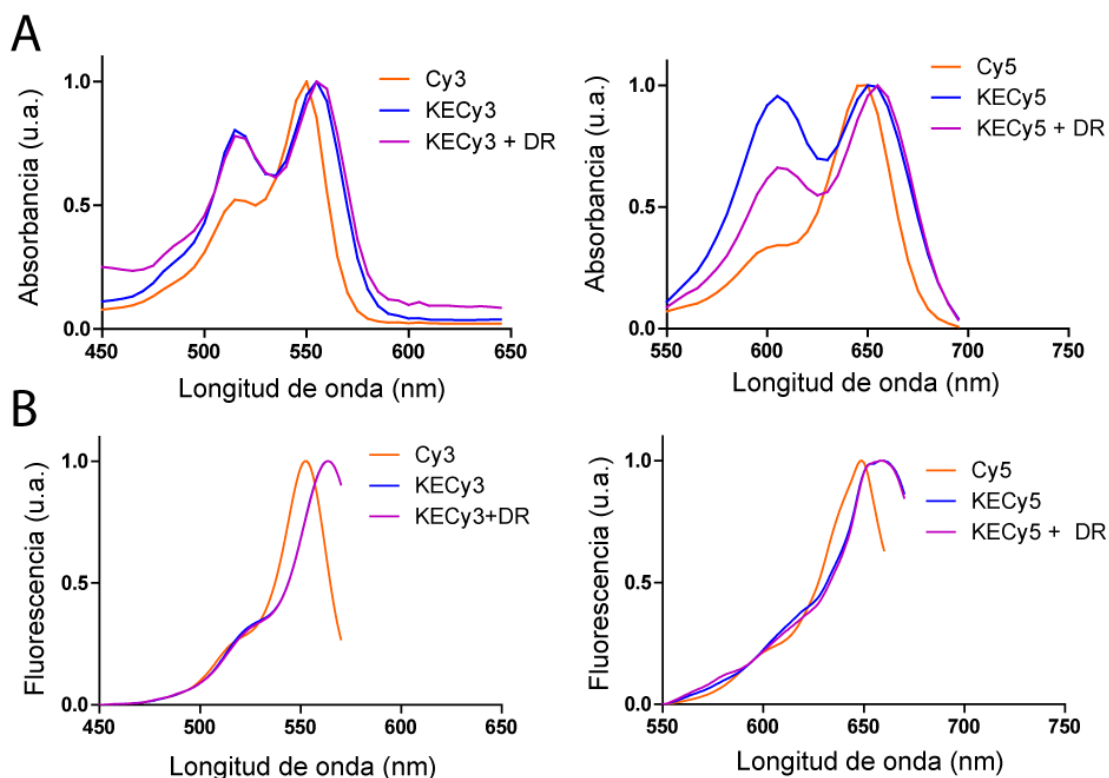


Figura 1. 11: (A) Espectros de absorción de fluoróforo suelto en solución, unido a pentámero y tras la formación de decámero para Cy3 y Cy5. (B) Espectros de excitación de fluoróforo suelto, unido a pentámero y tras la formación de decámero para Cy3 y Cy5, medidos por emisión a 580 nm y 670 nm, respectivamente. Todos los graficos están normalizados respecto al valor máximo de señal.

En la Figura 1. 12Figura 1. 11 se muestran los espectros de emisión para cada especie. Para poder compararlas se midió la fluorescencia a iguales concentraciones de fluoróforo. Se observa un corrimiento del espectro al infrarrojo, coincidente con lo ocurrido en los espectros de absorción y emisión. Para el caso de Cy3 se observa un aumento relativo de fluorescencia cuando está unida a la proteína mientras que para Cy5 se observa una disminución. En ambos casos, al formar el decámero se observa un aumento sustantivo de fluorescencia respecto a cuándo se tiene sólo el pentámero. Tanto el aumento de fluorescencia de Cy3 como la disminución en Cy5 han sido previamente reportadas^{167–169} y nombradas como PIFE (*Protein induced fluorescence enhancement*) y PIFQ (*Protein induced*

fluorescence quenching), respectivamente. De hecho este fenómeno ha sido empleado para la detección de interacciones proteína-proteína o proteína-DNA^{170,171}. Adicionalmente, la baja en intensidad de fluorescencia de Cy5 podría deberse también a la presencia de especies diméricas de fluoróforos o clústers que absorben, pero no emiten fluorescencia^{169,172,173}.

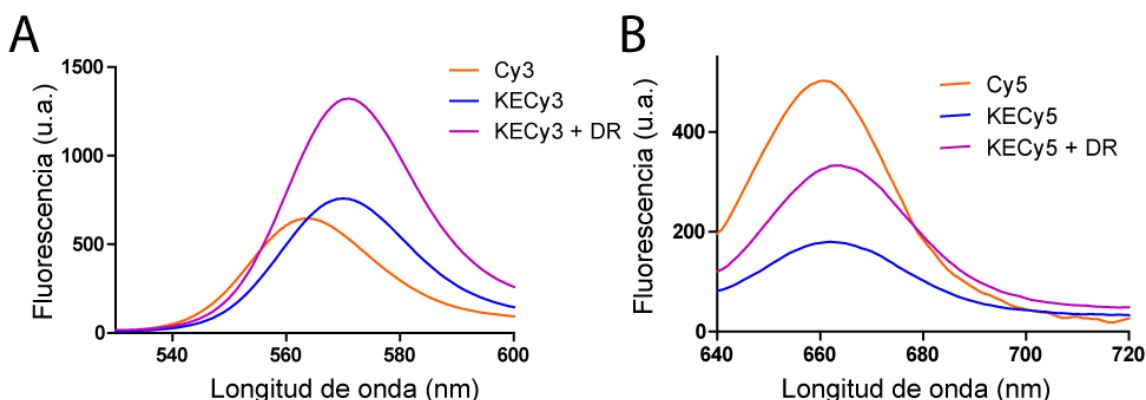


Figura 1. 12: Espectros de emisión de fluorescencia de las 3 especies (A) de Cy3 y (B) de Cy5. Todas las muestras fueron medidas a iguales concentraciones de fluoróforo y excitadas a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorbancia de cada especie.

Para estudiar si los cambios de intensidad de fluorescencia entre el pentámero y el decámero se deben a interacciones entre fluoróforos dentro de la cavidad, se realizaron experimentos con distinto nivel de marcación. Se marco la proteína con una cantidad lo mas baja posible de fluoróforo, para contrastar con la original. Los resultados se muestran en la Figura 1. 13. En primer lugar, si se observan sólo las curvas correspondientes a los pentámeros (color azul) se puede reafirmar que la mera unión de Cy5 a la proteína tiene un efecto negativo sobre la capacidad de emitir fluorescencia, mientras que para Cy3 el efecto de unión no es muy significativo. En segundo lugar, se puede decir que el aumento de ocupación es contraproducente para Cy5, ya que aumenta la absorbancia del pico secundario y se reduce la emisión de fluorescencia. Dicho efecto ya ha sido observado

previamente y se lo atribuye a la formación de dímeros no fluorescentes tipo H^{173,174}. Este fenómeno es mucho menor en Cy3. Finalmente, se observa en todos los casos un aumento relativo de fluorescencia cuando se forma el decámero, el cual es más marcado cuando el DOL es alto. Esto es acompañado de una disminución en la absorbancia del pico secundario en Cy5. Todo esto indica que el cambio en el entorno producido por la formación del decámero, favorecería o bien la eficiencia cuántica de fluorescencia o bien el número de fluoróforos que emiten por partícula. Una posible hipótesis que explique este fenómeno sería la ruptura de los dímeros no fluorescentes debido al nuevo entorno generado en el decámero.

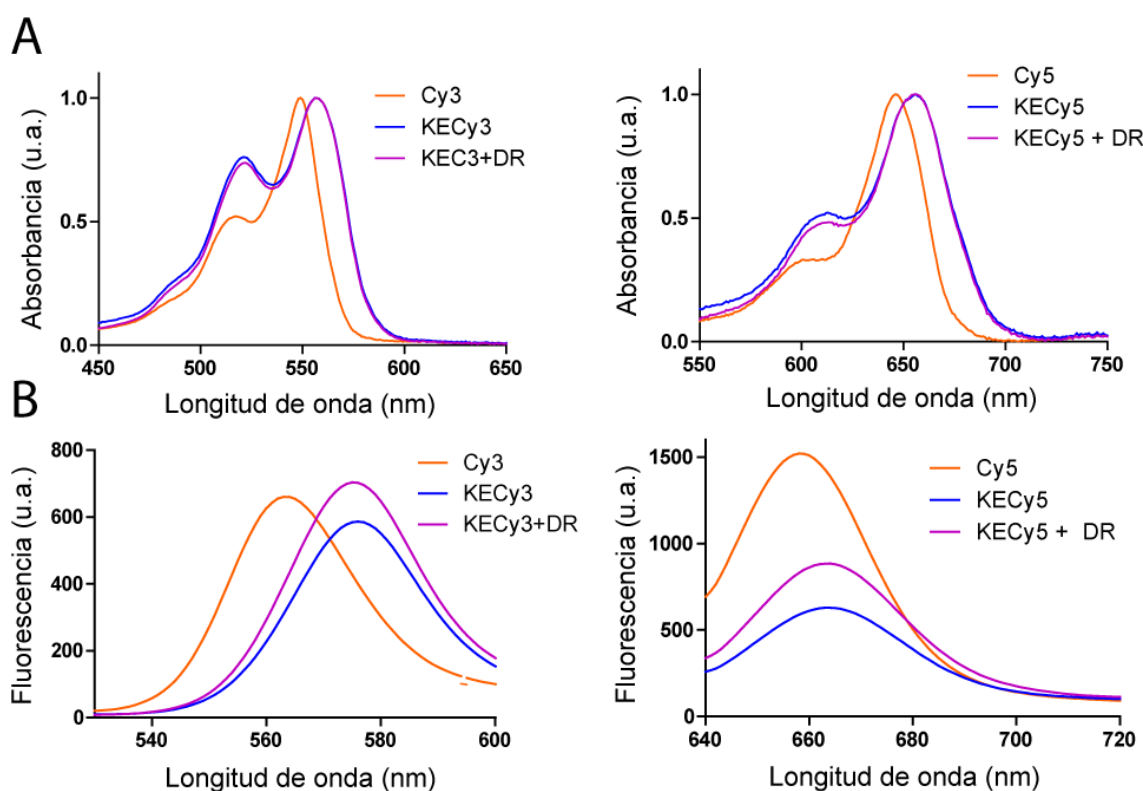


Figura 1. 13: Espectros de (A) absorción y (B) emisión normalizada por concentración de Cy3 en bajo DOL: 1.1 fluoróforo por partícula proteica para Cy3 y 0.9 para Cy5.

Para probar dicha hipótesis se decidió estudiar el tiempo de vida media de cada fluoróforo en las 3 condiciones. Los resultados se muestran en la Figura 1. 14. Para

ambos se observa un aumento en el tiempo de vida media al unirse a la proteína, independientemente de si se trata del pentámero o del decámero. Esto está en consonancia con trabajos previos^{169–171,175} en los cuales tanto la unión a proteínas como la inmovilización en superficies de cianinas provoca un aumento de tiempo de vida media, explicado por la restricción de la isomerización Cis-Trans. Tomando como referencia los rendimientos cuánticos tabulados de ambos fluoróforos en solución, y considerando que el aumento del tiempo de vida media se debe exclusivamente a una reducción de la tasa de relajación no radiativa, es posible calcular los rendimientos cuánticos cuando estos se unen a KE y cuando se forma el decámero. Los resultados se muestran en la Tabla 1.2. Se observa que Cy5 unido a KE aumenta un 65% su rendimiento cuántico mientras que Cy3 aumenta un 430%. En ambos casos la formación del decámero no cambia el rendimiento cuántico. Los cambios en el rendimiento cuántico por si solos no alcanzarían para explicar los cambios en la intensidad de fluorescencia obtenida y de hecho son de sentido contrario para el caso de Cy5. Por otro lado, la ausencia de diferencias entre el rendimiento cuántico de los fluoróforos unidos a pentámero y con el decámero cerrado, apoyan la idea de que el cambio en la intensidad de fluorescencia no se debe a un cambio en el brillo por molécula sino a la cantidad de moléculas fluorescentes.

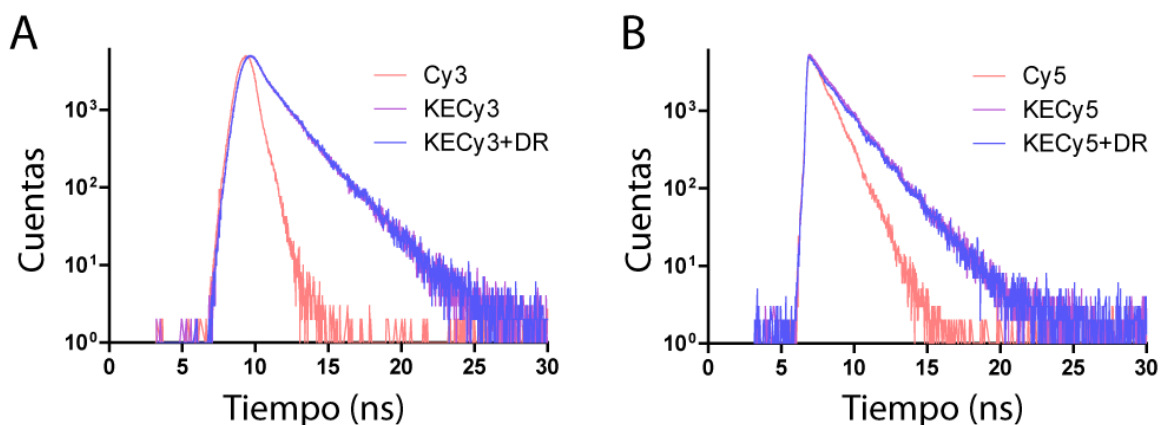


Figura 1. 14: gráficos de tiempos de vida media medidos por la técnica de TCSPC para las 3 especies de (A) Cy3 y (B) Cy5

muestra	τ (ns)	Φ	$\Delta\Phi$
Cy5	1.161 ± 0.004	0.27^{176}	1.00
KECy5	1.908 ± 0.008	0.44	1.64
KECy5+DR	1.902 ± 0.007	0.44	1.64
Cy3	0.444 ± 0.003	0.15^{177}	1.00
KECy3	1.909 ± 0.008	0.65	4.30
KECy3+DR	1.933 ± 0.011	0.65	4.35

Tabla 1.1: Ajustes obtenidos de los tiempos de vida media (τ) medidos por la técnica de TCSPC y rendimientos cuánticos calculados(Φ), para las 3 especies de Cy3 y Cy5

Por otro lado, se decidió estudiar si la formación del decámero ofrece algún grado de protección de los fluoróforos contra quenchers. En trabajos previos se vio que la presencia de TCEP en muestras de Cy5 tenía la capacidad de *quenchear* su fluorescencia a través de una unión reversible por UV, no así con Cy3¹⁷⁸. En nuestro caso, el estudio comparativo (Figura 1. 15) muestra que efectivamente la unión a la proteína muestra cierto grado de protección contra este *quencher*. Sin embargo, la formación del decámero parece no aportar significativamente a la protección contra TCEP. Una posible explicación para esto último es que el TCEP tenga la capacidad de atravesar sin dificultades el poro de la proteína, dado su pequeño tamaño.

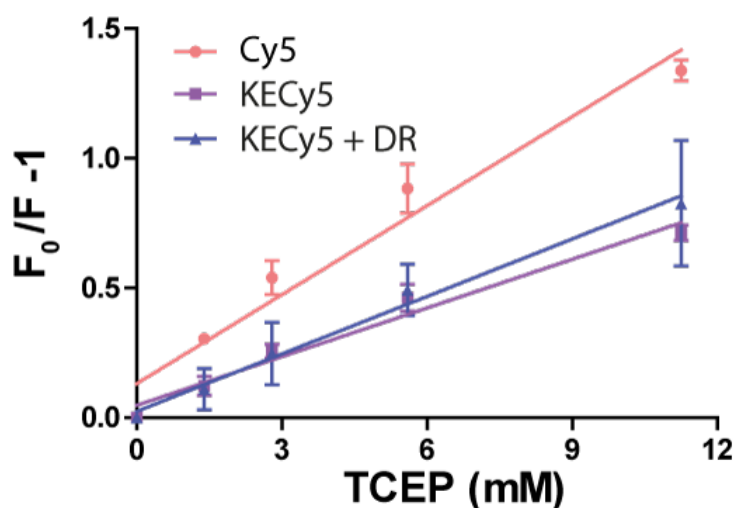


Figura 1. 15: Curva de Stern-Volmer correspondiente a las 3 especies de Cy5. En el eje X se grafican concentraciones de TCEP y en el eje Y $F_0/F-1$, siendo F_0 la fluorescencia inicial y F la fluorescencia medida para cada concentración de TCEP.

Caracterización fotofísica de Cy3 y Cy5 a nivel de molécula única

Con el fin de profundizar sobre los cambios en la fluorescencia que ocurren por la unión de los fluoróforos al pentámero de BLS y como efecto del cierre de la caja proteica tras formar el decámero, se decidió realizar estudios a nivel de molécula única empleando microscopía de fluorescencia de campo amplio de las muestras con alto DOL (aquellas en las que el cambio en la intensidad de fluorescencia tras la formación del decámero es más marcado). Para hacer los estudios de moléculas individuales, se prepararon respectivas muestras de Cy3, Cy5 y sus respectivos constructos con BLS inmovilizados en un substrato de vidrio a una concentración superficial lo suficientemente diluida como para que se encuentren separados por una distancia mayor que el límite de difracción. La concentración que satisface esta condición suele rondar valores de 10-100 pM. Los substratos fueron previamente limpiados y recubiertos con un polímero positivo (PDPA) que permitiría inmovilizar a los fluoróforos o los constructos de BLS por fuerzas electrostáticas.

Para cada muestra, se grabaron videos que permitieran captar la emisión de Cy3 o Cy5 individuales en función del tiempo. La figura 1.16 muestra un ejemplo. En todos los casos se pudo observar la emisión intermitente característica de moléculas individuales.

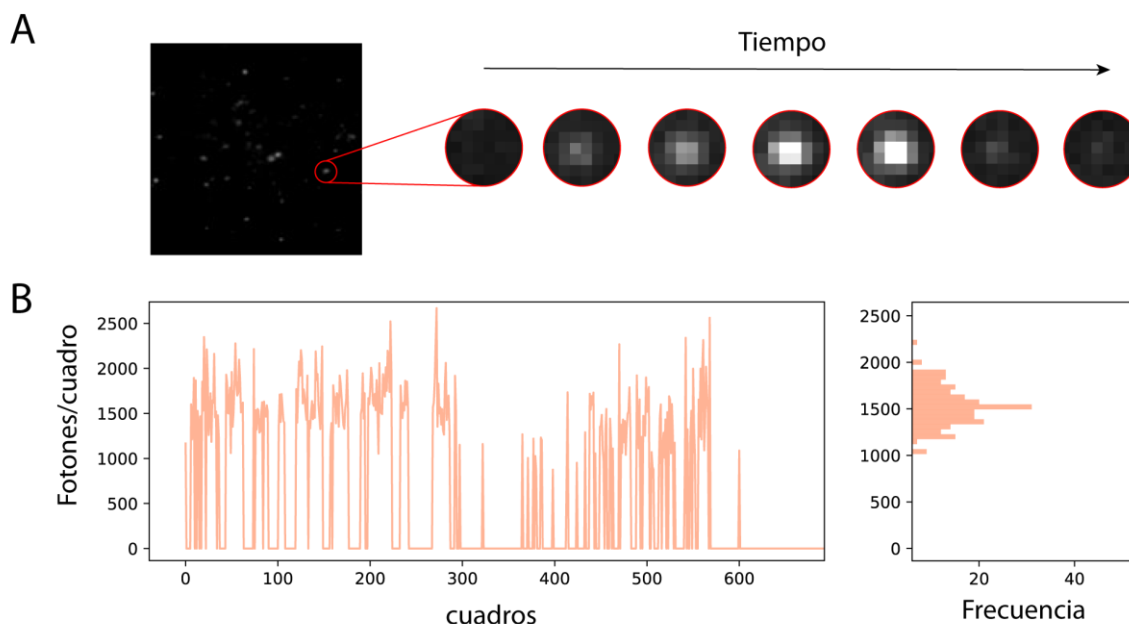


Figura 1. 16: (A) imagen de fluorescencia de campo amplio de partículas individuales. Se muestra ampliación de una partícula en cuadros sucesivos. (B) traza temporal de fluorescencia de una partícula de Cy5 y distribución de cuentas para cada valor de intensidad.

Las trazas de emisión en función del tiempo de moléculas individuales pueden analizarse para obtener los tiempos de cada evento de emisión t_{on} y de no emisión t_{off} , a partir de los cuales es posible analizar su distribución.

Si el tiempo de observación es suficientemente largo, también es posible observar los pasos de fotodegradación, que en el caso de tratarse de una sola molécula ocurre de manera instantánea, en un solo paso (*single-step photobleaching*), mientras que si la emisión proviene de más de un fluoróforo se observarían dos, tres o más saltos en la reducción de la intensidad a medida que los fluoróforos se van degradando. Del análisis de las trazas de emisión es también posible calcular el número de moléculas presentes en una determinada localización, por lo que se

podría estimar no sólo el promedio sino también la distribución de fluoróforos por partícula proteica.

Cy5

La Figura 1. 17 resume los resultados obtenidos del análisis de trazas de emisión de Cy5, KECy5, y KECy5DR.

En cuanto al número promedio de fotones por unidad de tiempo se encontró una distribución con pico principal en 1666 ± 416 fotones (Figura 1. 17). En esta distribución se observa una “cola” asimétrica hacia valores altos. Esto probablemente se deba a la contribución de agregados de 2 o más fluoróforos y puede ajustarse a una suma de 2 o más gaussianas.

Se encontró que las distribuciones de Ton y Toff (Figura 1. 17 B y C) son bien representadas por una función biexponencial (ecuación 1), revelando la presencia de eventos muy cortos (o rápidos) y eventos más largos (o lentos), de menor ocurrencia.

$$f(t) = A_1 * e^{-\tau_1/t} + A_2 * e^{-\tau_2/t} \quad \text{Ec. 1}$$

Ecuación 2: suma de dos distribuciones exponenciales

A partir de los valores medidos de estos últimos dos parámetros, es posible calcular la duración de un ciclo de trabajo o *duty cycle* (DC, Ec. 2), que para Cy5 en estas condiciones experimentales fue de 0.17.

$$DC = \frac{\langle \tau_{on} \rangle}{\langle \tau_{on} \rangle + \langle \tau_{off} \rangle} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

$$\langle \tau_{on} \rangle = \frac{A_1 * \tau_{on1} + A_2 * \tau_{on2}}{A_1 + A_2}$$

$$\langle \tau_{off} \rangle = \frac{A_1 * \tau_{off1} + A_2 * \tau_{off2}}{A_1 + A_2}$$

Los valores de τ_{on} , τ_{off} y DC para Cy5 se muestran en la Tabla 1.1:

Parámetro	1	2	Promedio pesado
ton (s.)	0.76	0.12	0.12
toff (s.)	3.40	0.56	0.59
DC	0.18	0.17	0.17

Tabla 1.1: resumen de valores de ton y toff para Cy5

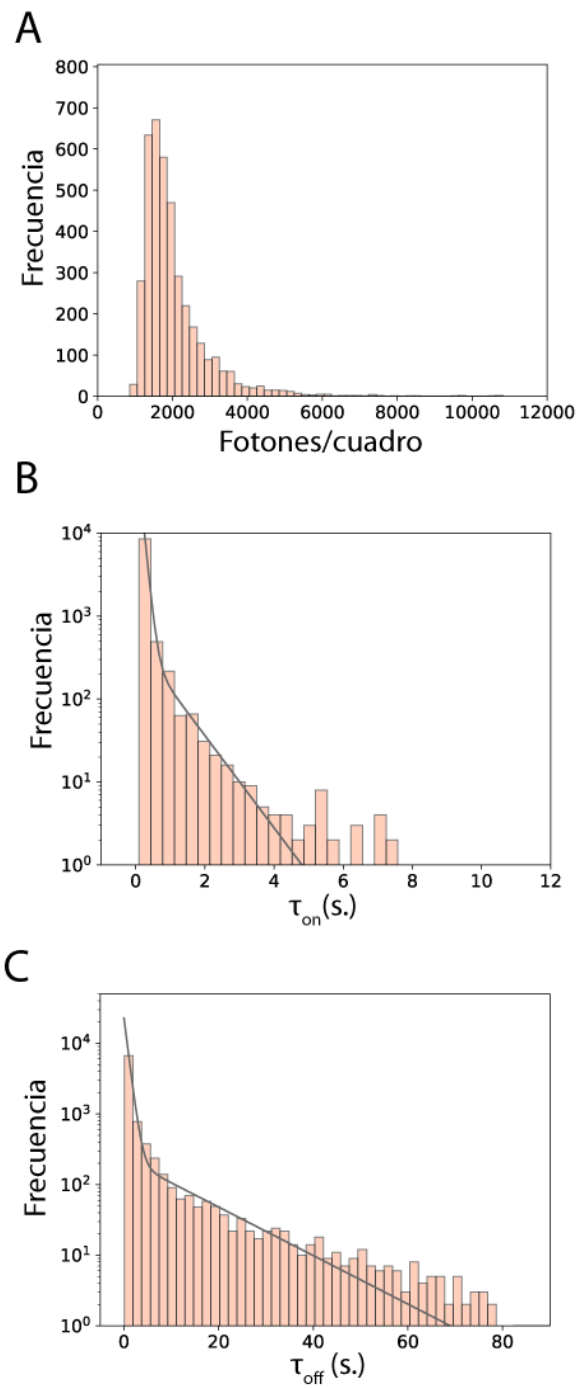


Figura 1. 17: Análisis de parámetros de trazas de fluorescencia de partículas únicas de Cy5. (A) distribución de fotones por unidad de tiempo (0.1s) en cada evento de fluorescencia (B) distribución de duración de eventos ON , ajustado a una función biexponencial (C) distribución de duración de eventos OFF , ajustado a una función biexponencial

En la sección anterior se había observado que Cy5 fluoresce mas dentro del decámero que dentro del pentámero. Habiendo descartado cambios en el tiempo de vida media, la siguiente hipótesis era que hay más moléculas emitiendo fluorescencia, aunque también podría deberse a un incremento en el *duty cycle*. Estas hipótesis pueden ser puestas a prueba analizando moléculas individuales. Si esto es correcto, la relación entre las intensidades de fluorescencia debería poder explicarse mediante la ecuación 5:

$$\frac{I_{KECy5+DR}}{I_{KECy5}} = \frac{|DC * F|_{KECy5+DR}}{|DC * F|_{KECy5}}$$

Donde $I_{KECy5+DR}$ y I_{KECy5} son las intensidades de fluorescencia normalizadas por la absorbancia a la longitud de onda de excitación de cada muestra, y F es el promedio de fotones por unidad de tiempo.

Se midieron los parámetros evaluados anteriormente para Cy5, pero ahora unido al pentámero (KECy5) y en el decámero cerrado (KECy5+DR). Los resultados se muestran en la Figura 1. 18. Al comparar la cantidad de fotones promedio emitidos por evento, se observa un aumento en la proporción de eventos que liberan mayor cantidad de fotones cuando se cierra el decámero. Por otro lado, los tiempos de encendido y apagado parecen no modificarse sustancialmente.

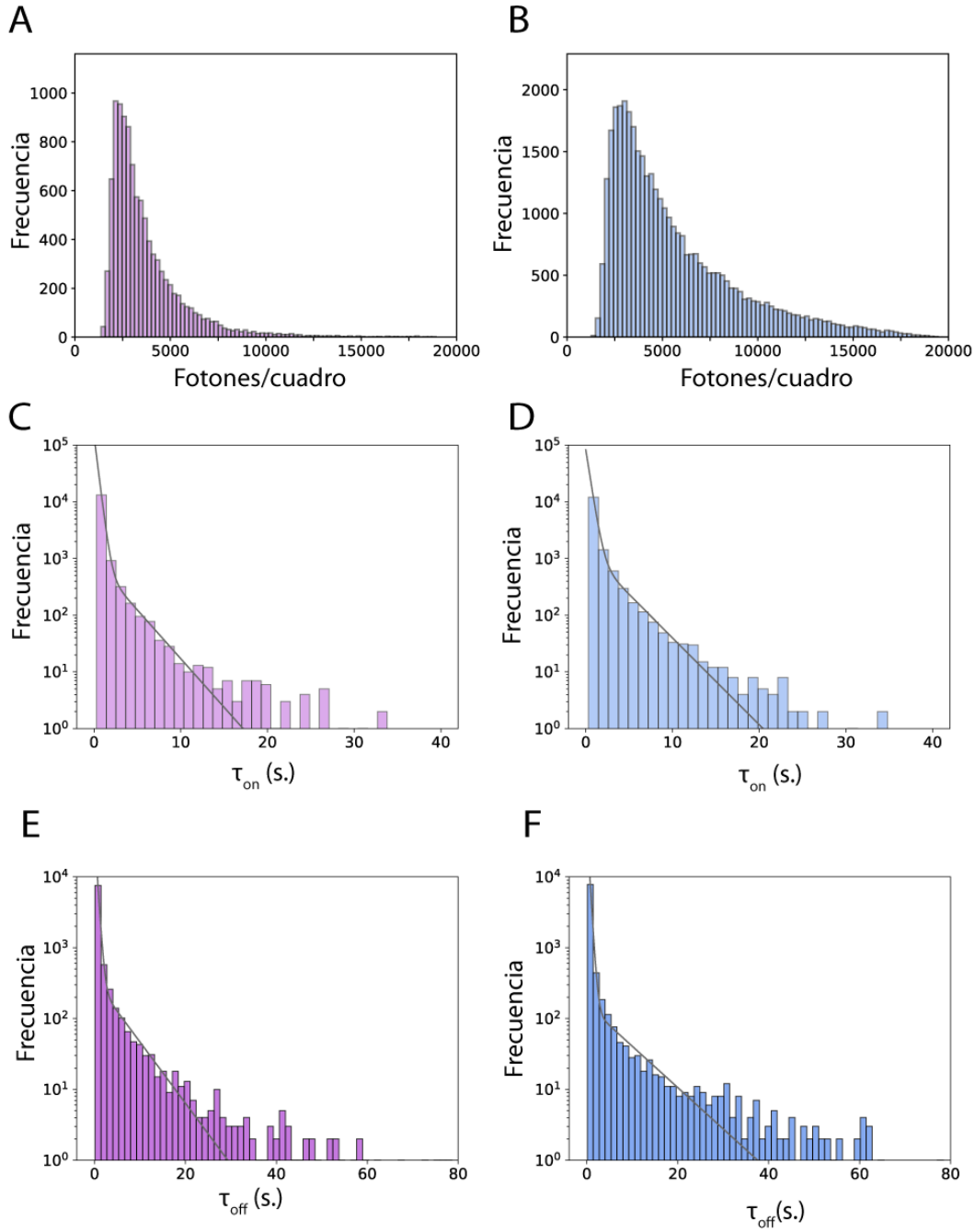


Figura 1. 18: Análisis de parámetros de trazas de fluorescencia de particulas únicas de KECy5 (violeta) y KECy5+DR (azul). (A y B) distribución de fotones por evento de fluorescencia (C y D) distribución de duración de eventos ON , ajustado a una función biexponencial (E y F) distribución de duración de eventos OFF , ajustado a una función biexponencial

Para determinar qué parámetro o parámetros explican mejor el aumento en la fluorescencia tras cerrar el decámero se cuantificaron los valores promedio de los mismos (Tabla 1.2). En el caso de Cy5 se observó un aumento relativo de fluorescencia de un 85% al cerrar la proteína, este aumento puede ser explicado en mayor medida por un aumento en el promedio de fotones por evento (53%) y en menor medida por un aumento en el ciclo de trabajo (17%), ambos parámetros juntos muestran una diferencia del 80% en la cantidad de fotones totales entre Cy5 dentro del decámero y el pentámero.

	KECy5	KECy5+DR	ratio
I_{em}^{650}/abs^{630}	179.70	332.70	1.85
Fotones/tiempo (F)	3676	5640	1.53
Ton (s)	2.74/ 0.42	2.83/ 0.44	1.09
Toff (s)	5.15/ 0.64	4.23/ 0.53	0.83
Ciclo de trabajo (DC)	0.40	0.47	1.17
DC*F	1475.41	2655.36	1.80

Tabla 1.2: Resumen de valores de principales parámetros de fluorescencia de partículas únicas y proporción (ratio) entre los valores obtenidos para KECy5+DR respecto a KECy5

Cy3

El caso de Cy3 muestra algunas diferencias respecto a Cy5 (Figura 1. 19). En primer lugar, al observar el número de fotones promedio por evento, se observa una distribución menos homogénea, lo que da indicio de la presencia de agregados de fluoróforos. El número promedio de fotones obtenidos por evento, ajustando el pico principal a una distribución gaussiana, es similar al obtenido por el otro fluoróforo (1700 ± 844 cuentas). Por otro lado, los tiempos característicos de encendido y apagado de este fluoróforo son más largos (ver Tabla 1. 3) y el ciclo de trabajo más grande (0.52).

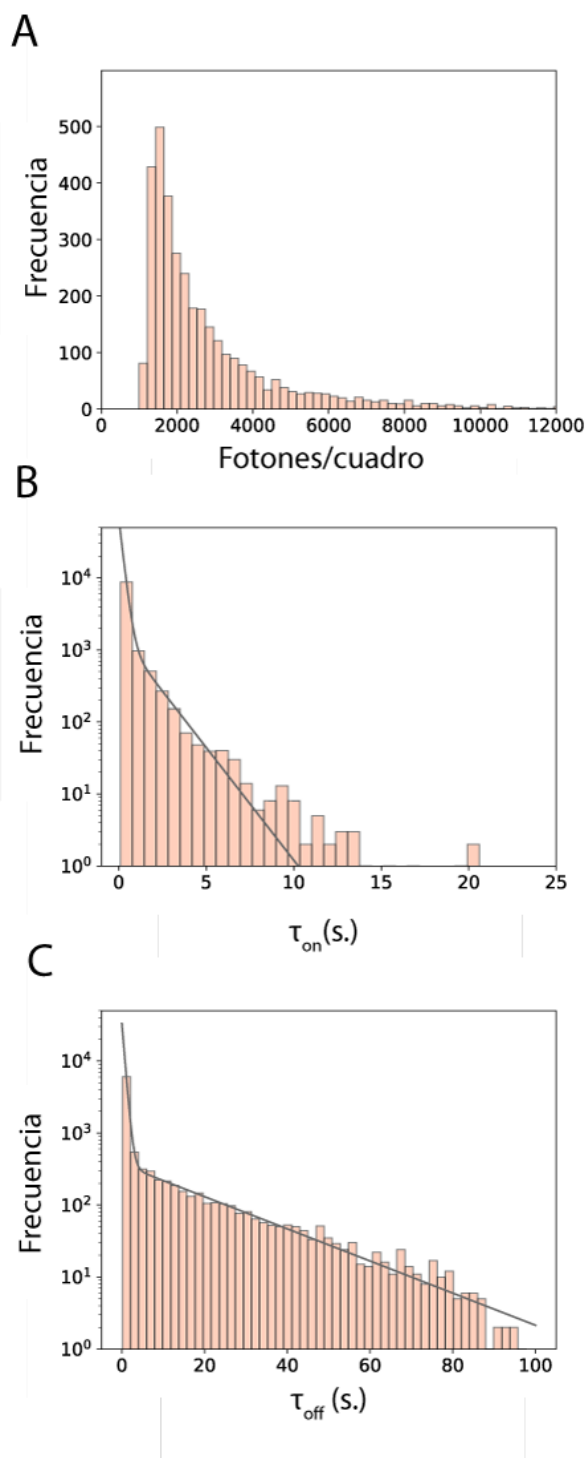


Figura 1. 19: Análisis de parámetros de trazas de fluorescencia de particulas únicas de Cy3. (A) distribución de fotones por evento de fluorescencia (B) distribución de duración de eventos ON , ajustado a una función biexponencial (C) distribución de duración de eventos OFF , ajustado a una función biexponencial.

Parámetro	1°	2°	Promedio pesado
τ_{on} (s.)	2.81	0.70	0.82
τ_{off} (s.)	18.17	0.75	0.87
DC	0.13	0.48	0.52

Tabla 1. 3: resumen de valores de τ_{on} y τ_{off} para Cy3

Al comparar el efecto de introducir Cy3 en el pentámero y tras cerrar el decámero (Figura 1. 20), se observa que en este caso ya no es el aumento en el número promedio de fotones emitidos por evento, sino la duración de los eventos (τ_{on}) lo que explicaría mayoritariamente el aumento en la intensidad de fluorescencia (Tabla 1. 4). Sin embargo, y a diferencia de lo ocurrido con Cy5, este parámetro solo no es suficiente para explicar la totalidad de aumento de intensidad en fluorescencia.

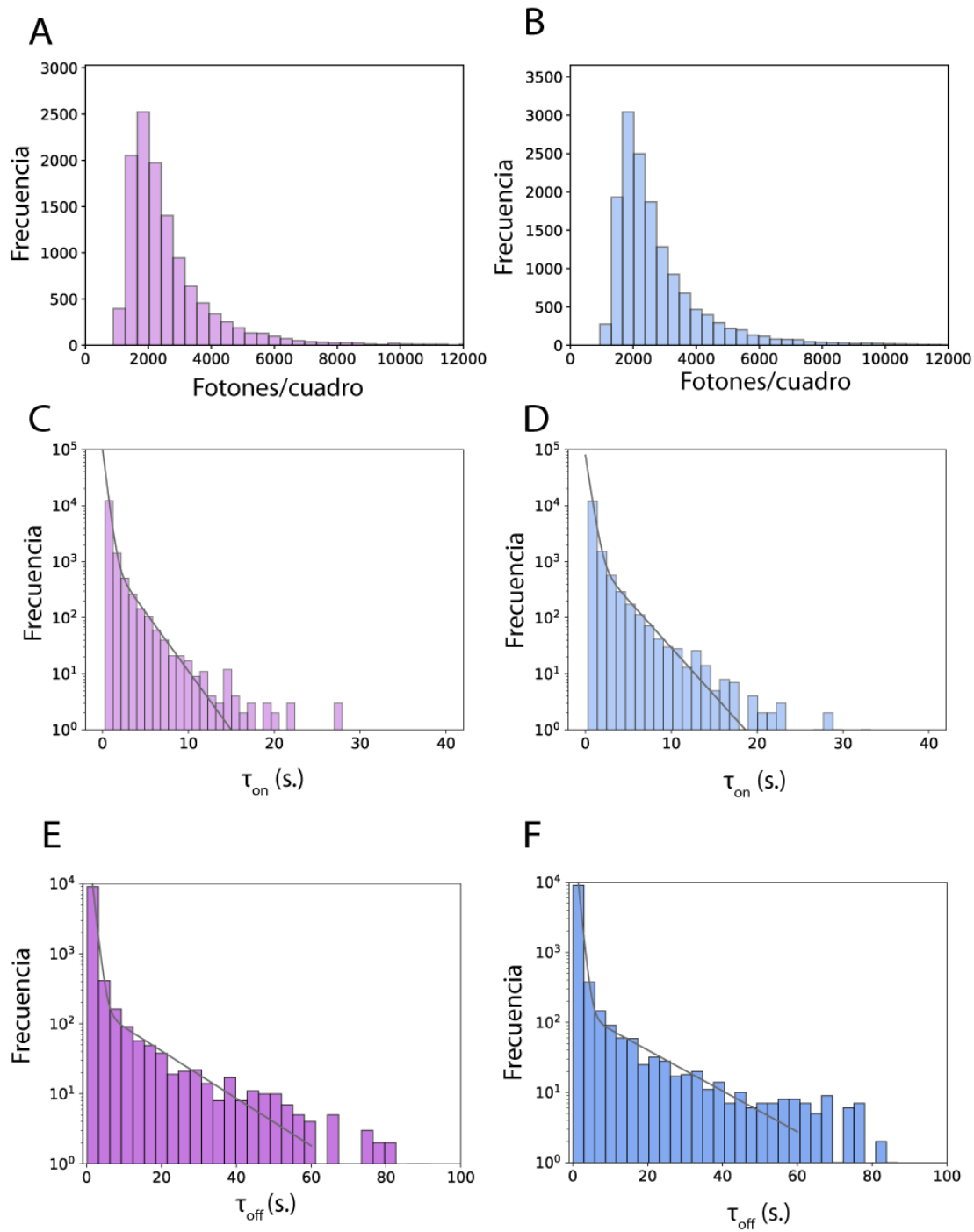


Figura 1. 20: Análisis de parámetros de trazas de fluorescencia de particulas únicas de KECy3 (violeta) y KECy3+DR (azul). (A y B) distribución de fotones por evento de fluorescencia (C y D) distribución de duración de eventos ON , ajustado a una función biexponencial (E y F) distribución de duración de eventos OFF , ajustado a una función biexponencial

	KECy3	KECy3+DR	ratio
$I_{em}^{550}/I_{abs}^{520}$	758.48	1322.08	1.74
Fotones/evento (F)	2645	2806	1.06
Ton (s)	2.41/0.45	3.83/0.80	1.74
Toff (s)	7.78/0.83	8.73/0.82	0.98
Ciclo de trabajo (DC)	0.35	0.49	1.40
DC*F	934.71	1383.45	1.48

Tabla 1. 4: Resumen de valores de principales parámetros de fluorescencia de partículas únicas y proporción (ratio) entre los valores obtenidos para KECy3+DR respecto a KECy3

Conclusiones parciales

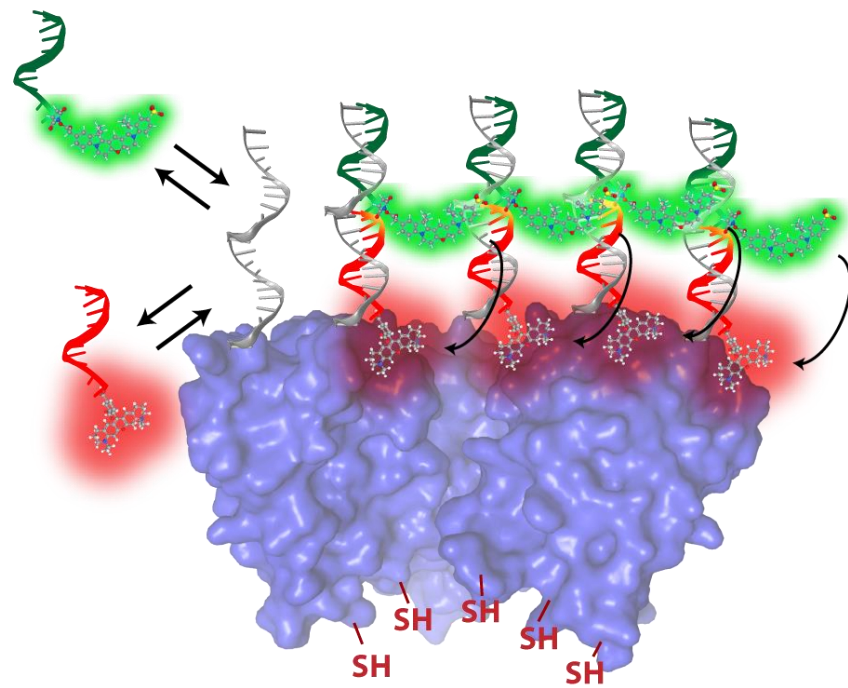
En este capítulo hemos demostrado que BLS puede funcionar como una caja proteica. A pesar de que existen múltiples proteínas que cumplen esta función, BLS goza de algunas características únicas que la distinguen para diversas aplicaciones: a diferencia de la mayoría de las cajas proteicas que tienen una simetría radial, BLS tiene una naturaleza cilíndrica. Además, trabajos previos nuestros han permitido controlar su ensamblaje y su trabajo de manera modular como una partícula del tipo Jano¹¹⁵.

Hemos podido incluir 2 fluoróforos de la familia de las cianinas con una estequiometría controlada sin afectar la estructura terciaria y cuaternaria de BLS. Si bien esta proteína posee 5 puntos de anclaje de fluoróforos, no es posible ocupar todos, posiblemente debido a impedimentos estéricos. Así mismo, hemos caracterizado las propiedades fotofísicas de dichos fluoróforos dentro de BLS, las cuales se ven modificadas en el interior de esta proteína: tanto el espectro de absorbancia como de emisión de fluorescencia sufren cambios apreciables. La intensidad de fluorescencia disminuye con el grado de marcación por lo que, dependiendo de las posibles aplicaciones, es probable que no convenga saturar los sitios de unión. Esto se debe a que, en particular, esta familia de fluoróforos forma dímeros no fluorescentes de tipo H y J. Por otro lado, se observaron diferencias

significativas entre los fluoróforos unidos a los pentámeros y los fluoróforos dentro de la caja cerrada (decámero). Es posible que el aumento de fluorescencia al formar el decámero se deba a la disrupción de los dímeros H y J antes nombrados.

Estudios de fluorescencia de molécula única revelaron que el aumento de fluorescencia al formar el decámero se debe principalmente a la cantidad de fotones emitidos por unidad de tiempo en el caso de Cy5 y la duración de los eventos en el caso de Cy3.

CAPÍTULO 2: BLS COMO SISTEMA DE ANDAMIAJE PARA DNA-PAINT



Colaboración: Alan Szalai y Lucía Lopez (DNA-PAINT)

DNA-PAINT

DNA-PAINT (acumulación de puntos para imágenes de topografía en la nanoescala, por sus siglas en inglés) es una de las técnicas de super-resolución más utilizadas¹⁷⁹. A diferencia de las tradicionales técnicas de SMLM en las cuales el encendido estocástico de fluoróforos se debe a procesos fotofísicas de los mismo, esta técnica emplea el pegado y despegado de 2 hebras de ADN como factor de *blinking* o parpadeo (Figura 2. 1). La primera hebra, llamada *docking* se encuentra unida covalentemente a la molécula que se desea localizar. La segunda hebra, llamada *imager* está unida a un fluoróforo y se encuentra libre en solución. Si la muestra es iluminada en TIRF, las hebras imaging solo serán visualizadas cuando se unan transitoriamente a las hebras *docking*. El intervalo de tiempo en el que el imager se encuentra unido a la hebra de *docking* y es posible detectar fluorescencia se denomina *ton* y el intervalo de tiempo en el cual la hebra *docking* se encuentra sola se denomina *toff*. Dado que el *blinking* depende de la cinética de unión de las dos hebras de ADN, la frecuencia y duración de los eventos depende ya no de las propiedades del fluoróforo sino de parámetros tales como el largo y la secuencia de los oligonucleótidos, la composición del *buffer* y la concentración de la hebra *imager* en solución. Al renovarse constantemente el fluoróforo en cada posición, se evita el fotoblanqueo y la cantidad de localizaciones se hace teóricamente infinita. Esto le otorga una ventaja respecto a otras técnicas tales como STORM y PALM. Si se tiene en cuenta que la resolución en estas técnicas depende de la precisión de cada localización y la cantidad de localizaciones, DNA-PAINT se posiciona como una técnica con posibilidad de acceder a resoluciones aún mejores que sus técnicas hermanas¹⁸⁰.

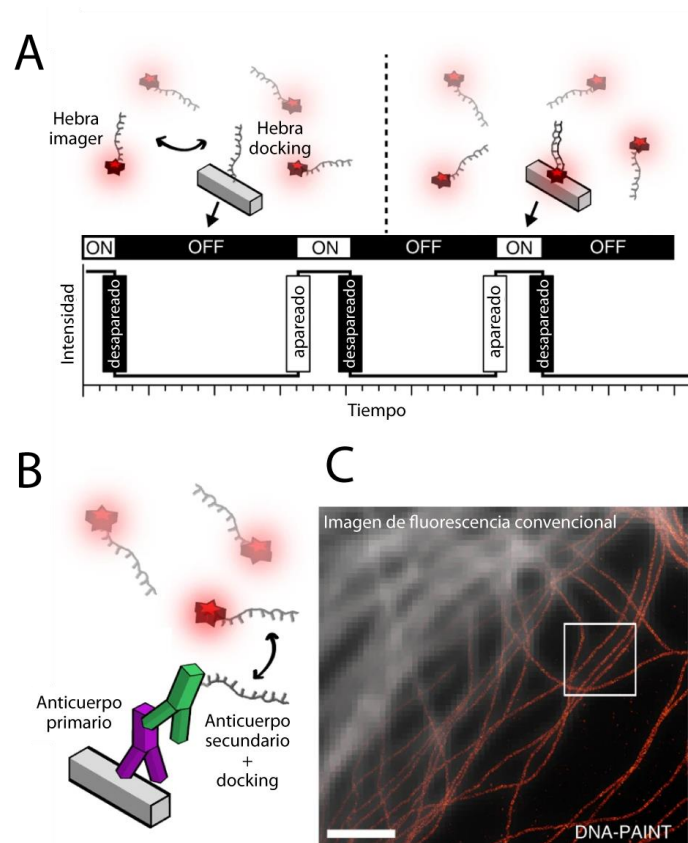


Figura 2. 1 (A) Principio de funcionamiento de DNA-PAINT (B) Esquema de marcación de una muestra con anticuerpos empleando DNA-PAINT (C) Comparación de imagen obtenida de actina con microscopía de fluorescencia convencional y con DNA-PAINT (adaptado de Schnitzbauer et al. 2017)

En la práctica la resolución alcanzable suele estar en el orden de los 10-20nm. Si se desea obtener resoluciones menores, existe una serie de consideraciones prácticas que deben tenerse en cuenta¹⁸⁰ (Figura 2. 2):

Requisito (1): Una alta precisión de localización. Esto se puede obtener mediante la recopilación de un alto recuento de fotones por localización de una sola molécula. La cantidad de fotones obtenidos de un fluoróforo depende de la cantidad de ciclos de excitación-emisión que puede realizar antes de degradarse. Para reducir las chances de degradación se pueden agregar a la solución sustancias que contrarresten los mecanismos de degradación, tales como *quencher*s del estado triplete y consumidores de oxígeno (oxygen scavengers)¹⁸¹.

Requisito (2): una relación señal/ruido alta en la imagen súper resuelta. Esto se puede lograr recopilando una gran cantidad de eventos de parpadeo y permite una separación clara entre dos regiones cercanos de la muestra. El aumento en la cantidad de localizaciones se puede lograr aumentando el tiempo de adquisición o aumentando la concentración de *imager*. Sin embargo, esto último debe hacerse con cuidado de no superponer espacialmente eventos de emisión y también tiene la desventaja que produce un aumento de la señal de fondo que atenta contra la precisión de localización. Existen varias estrategias que permiten aumentar la concentración de *imager* sin aumentar la señal de fondo, como estrategias de FRET-PAINT¹⁸²⁻¹⁸⁴ y sondas fluorogénicas¹⁸⁵.

Requisito (3): Una fracción baja de localizaciones inespecíficas. Esto se puede favorecer, a costa de mayores tiempos de medición, mediante tiempos largos de unión del *imager*. De este modo, los eventos específicos se diferencian mejor de los no específicos que suelen tener tiempos de unión más cortos.

Requisito (4): un mecanismo de compensación preciso para la deriva de la platina del microscopio¹⁸⁶. Teniendo en cuenta que los tiempos típicos de adquisición de DNA-PAINT son de orden de minutos a horas, se hace importante contar con un microscopio estable y tratar de que todos los elementos ópticos y la muestra se encuentren cubiertos para evitar movimientos de aire. A pesar de todos estos requerimientos, muchos microscopios siguen presentando derivas del orden de decenas de nm/min. Para corregir esta deriva se suelen usar marcas fiduciarias que no son más que partículas con una alta tasa de emisión de fotones a lo largo de toda la medición, cuya trayectoria es fácil de reconstruir^{187,188}.

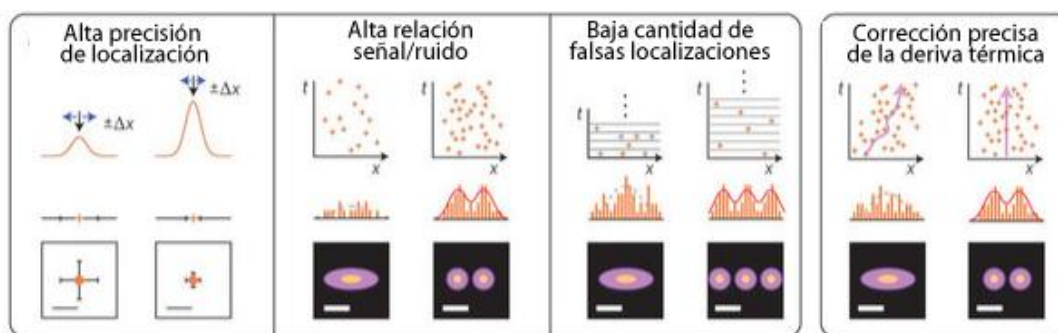


Figura 2. 2: requisitos para obtener imágenes de DNA-PAINT con resolución menor a 20 nm (adaptado de Dai et al. 2016)

smFRET y super-resolución

La transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET) es un fenómeno ampliamente utilizado como regla molecular para interrogar la estructura de biomacromoléculas^{189–192}. En las mediciones de FRET, el grado de transferencia de energía no radiativa entre dos fluoróforos, denominados donador y aceptor, informa la distancia entre ellos (Figura 2. 3A-C). Dicha transferencia suele ocurrir en el rango de 1 a 10 nm. Para que ocurra FRET entre dos fluoróforos, existe una serie de condiciones necesarias además de la distancia entre ellos: en primer lugar, el espectro de emisión del donador se debe solapar parcialmente con el espectro de excitación del aceptor. En segundo lugar, la eficiencia depende de la orientación relativa entre los dipolos. Esto cuando hay libre rotación de los fluoróforos no es un problema, pero cuando hay restricciones de movimiento es un factor que se debe tener en cuenta. La distancia a la cual la eficiencia de FRET es 0.5, es característica para cada par de fluoróforos y se la llama Radio de Förster (R_0). Existen múltiples maneras de calcular la eficiencia de FRET, basadas en los cambios en algún parámetro del donador o el aceptor (intensidad de emisión de fluorescencia, tiempo de vida media, entre otros).

Es posible observar FRET entre una sola molécula donora y una sola molécula aceptora. Existe un conjunto de técnicas que logran esto y se las denomina *single-pair* FRET (spFRET) o *single-molecule* FRET (smFRET)^{193–195} (Figura 2. 3Dy E). Esto permite acceder, por un lado, a la diversidad de comportamientos de una determinada población de moléculas^{193,196–198}. Por otro lado, también es posible estudiar procesos moleculares que involucren movimientos o cambios en distancias a lo largo del tiempo^{199,200}. Así, si se observa las trazas temporales de fluorescencia correspondientes a los canales del donador y al aceptor para una determinada posición espacial, es posible determinar la eficiencia de FRET a lo largo del tiempo. Algunos de los procesos moleculares que se pueden estudiar mediante esta técnica

son el plegamiento proteico^{197,201}, el movimiento de máquinas moleculares²⁰², cambios conformacionales¹⁹⁶, etc. Por último, también es posible aprovechar este fenómeno para mejorar la resolución en nanoscopías^{194,195}. Recientemente, se ha empleado el fenómeno de FRET para acortar los tiempos de adquisición de DNA-PAINT^{182–184} empleando un *docking* largo con capacidad de unión de 2 *imagers*: una con un fluoróforo donador y otra con un fluoróforo aceptor (Figura 2. 3F). En este esquema solo se observa señal cuando ambas hebras están unidas al sitio de unión. Esto permite aumentar mucho la concentración de *imagers*, dado que solo se excita al donador y sólo se visualiza al aceptor. Así, se han llegado a obtener imágenes de FRET-PAINT con buena resolución en el orden de los minutos e incluso segundos.

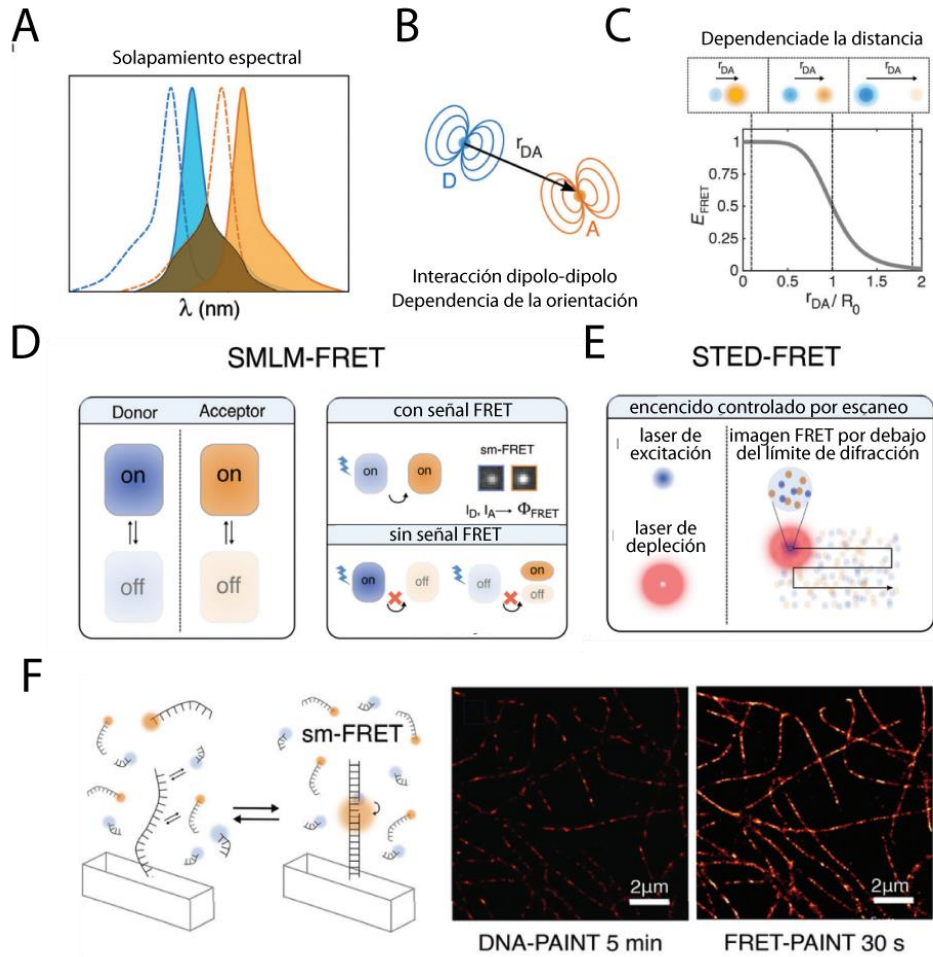


Figura 2. 3: (A) solapamiento espectral necesario entre donador y aceptor en un par de fluoróforos para que ocurra FRET (B) importancia de la orientación relativa entre dipolos para que ocurra FRET (C) dependencia del fenómeno respecto a la distancia entre fluoróforo (D) smFRET en técnicas de SMLM (E) smFRET en STED (F) principio de funcionamiento de FRET-PAINT y comparación de resultados con DNA-PAINT tradicional (adaptado de Szalai, Masullo y Stefani 2021).

Motivación y objetivos:

Tomando como base la experiencia de nuestro grupo para modificar BLS como sistema modular de marcación para microscopía de fluorescencia¹¹⁵, la estructura repetitiva de BLS ofrece una manera de multiplicar los sitios para DNA-PAINT. Nos

propusimos el objetivo de emplear un pentámero de BLS como estructura de andamiaje para DNA-PAINT y FRET-PAINT, en el que cada proteína marcada tenga hasta 5 hebras “docking” largas, con sitios de unión para 2 imagers (Figura 2. 4). La hipótesis de trabajo es que una partícula de BLS, al ofrecer hasta 5 sitios de unión para *imagers*, puede mejorar considerablemente los tiempos de visualización de una estructura blanco por FRET-PAINT respecto a un sistema tradicional (VHH, IgG, Fab) con 1 o 2 hebras de ADN.

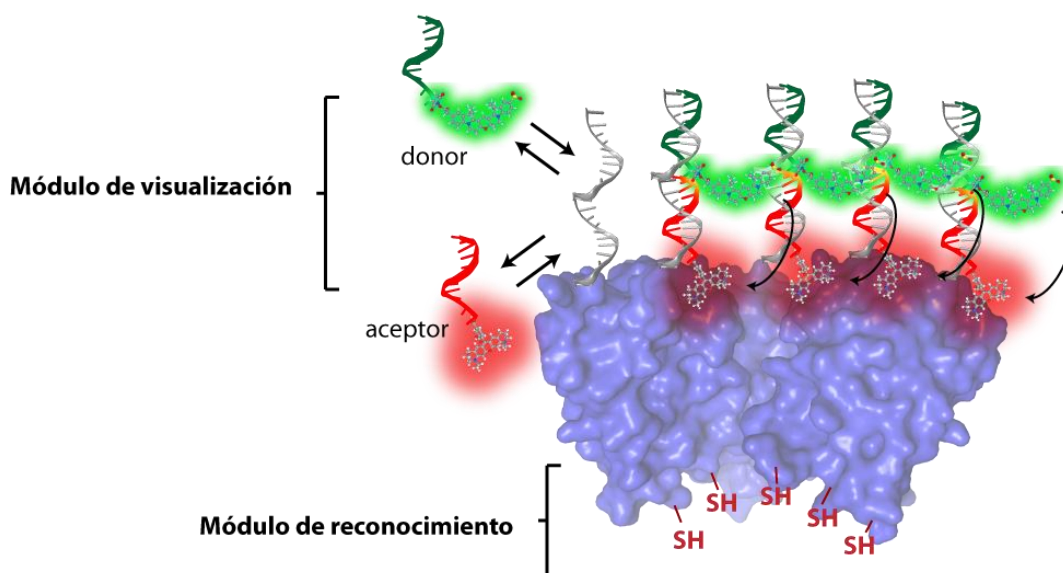


Figura 2. 4: esquema conceptual de BLS pentamérica como estructura de andamiaje para imágenes obtenidas por FRET-PAINT. En una cara se posiciona el “módulo de visualización”, empleando la química de amino terminal, y en la cara opuesta el “módulo de reconocimiento”, empleando la química del tiol de la cisteína insertada en la posición 88.

Estudios preliminares y diseño

Dado que la resolución típica de técnicas como DNA-PAINT se encuentra en el orden de magnitud del tamaño de las proteínas que se suele querer detectar, el tamaño de los complejos de detección, formado habitualmente por anticuerpos o nano-anticuerpos pasa a ser relevante. Es por esto que lo primero que nos propusimos fue hacer una comparación de las dimensiones de un pentámero de

BLS respecto a un nano-anticuerpo. En la Figura 2. 5 se puede observar que, si bien el pentámero de BLS es de un peso molecular considerablemente mayor al de un nano-anticuerpo, y similar a un anticuerpo, su tamaño es mucho menor y su geometría cilíndrica hace que su “altura” no difiera significativamente de la de un nano-anticuerpo.

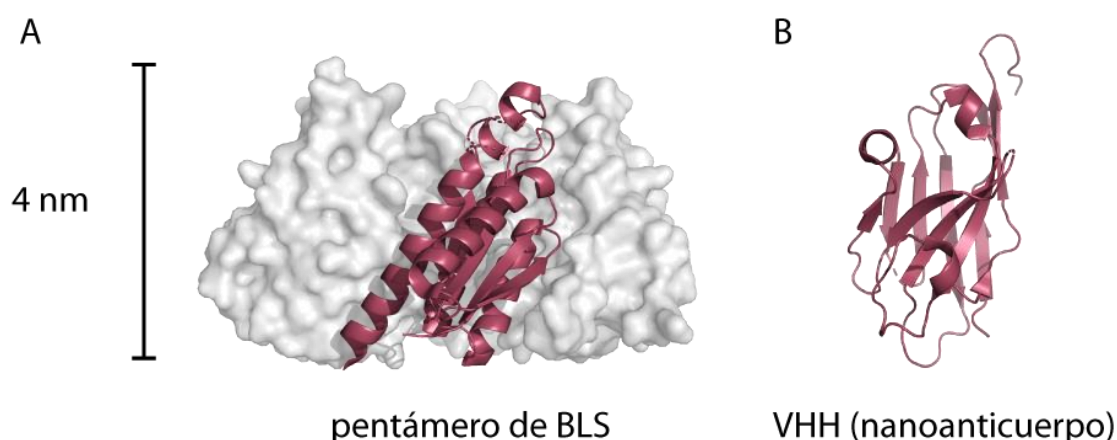


Figura 2. 5: Estructura cristalográfica de (A) BLS pentamérica - PDB 1XN1- y de (B) un nano-anticuerpo de camélido – PDB 5U64-. En rosado se muestran las representaciones “cartoon” de los monómeros de ambas proteínas. La altura de ambas estructuras es cercana a los 4 nm.

Como prueba de concepto se decidió emplear al pentámero de BLS como estructura de andamiaje para marcar actina. De un lado del pentámero se uniría el módulo de reconocimiento y del otro el módulo de detección. Para el reconocimiento se decidió emplear una pequeña molécula comúnmente empleada para detectar actina, llamada faloidina, la cual posee una alta afinidad por la forma fibrilar de dicha proteína^{203–205}. Dado que en el capítulo anterior se introdujo una cisteína en la cara de la cavidad de BLS, se decidió emplear la reactividad de dicho aminoácido para unir la faloidina a través de una molécula adaptadora. Para el módulo de detección se decidió replicar un el sistema FRET desarrollado previamente¹⁸⁴, el cual consiste en una hebra *docking* larga con sitios de unión para 2 hebras *imagers*: la primera

lleva un fluoróforo donador (en este caso Cy3b) y la segunda un fluoróforo aceptor (ATTO 655). Las secuencias de los oligonucleótidos y los espectros solapados de los fluoróforos empleados, se pueden observar en la Figura 2. 6. Cabe aclarar aquí que, en el diseño de los oligonucleótidos, los correspondientes al aceptor (10 bases) tienen una base más que el donador (9 bases). Esto fue diseñado así para que el donador se encuentre siempre (o la mayor parte de las veces) con un aceptor unido al sitio docking. Además, al igual que en un trabajo anterior, se decidió ubicar los *imagers* en sentido “cabeza cola” debido a que se observó que así se obtenía mayor eficiencia de FRET. Finalmente, se ubicó la hebra aceptora más próxima a la proteína que la donadora para que su posición sea lo más cercana posible a la estructura que se quiere revelar.

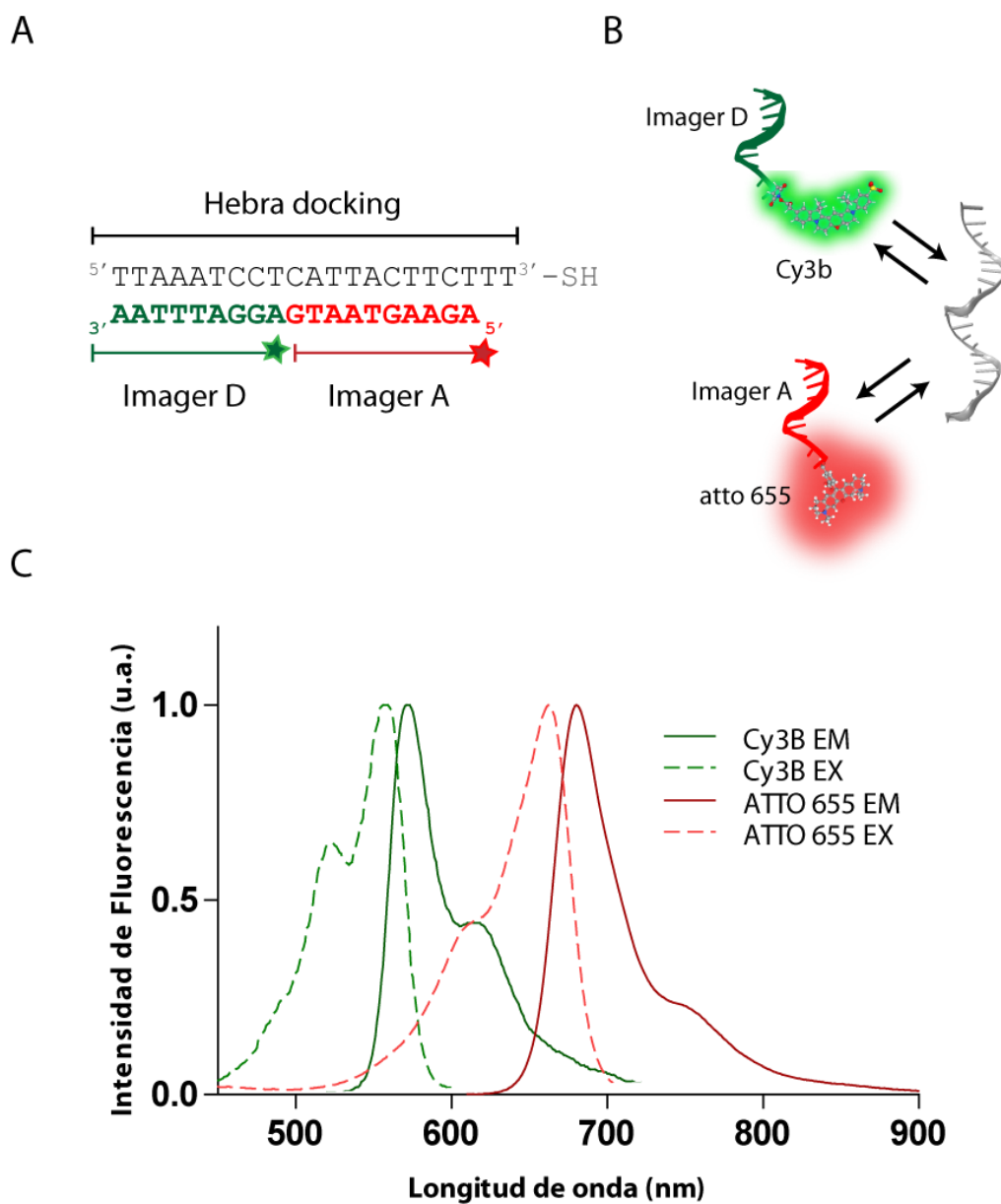


Figura 2. 6: (A) Secuencia y modificaciones en el extremo 5' de las hebras "docking" y las hebras "Imager", la D significa que allí se usó un fluoróforo donador (Cy3b) y la A un fluoróforo aceptor (Atto 655). (B) esquema conceptual de equilibrio de unión de las dos hebras imager. (C) espectros de excitación y emisión de los fluoróforos utilizados

La unión de BLS a la hebra de actina fue modelada empleando el software CCP4, a partir de las estructuras cristalográficas individuales de actina (PDB 6BNO) y BLS (PDB 1XN1). En la Figura 2. 7 se puede ver como se ubican 4 partículas de BLS

alrededor de la hebra de actina, obteniéndose un diámetro total esperado de 15/16 nm.

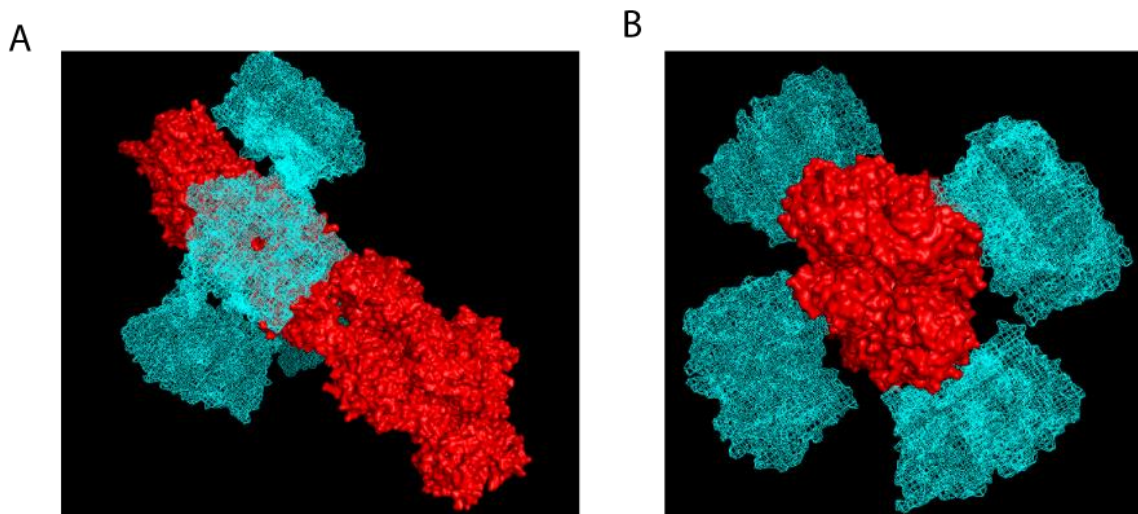


Figura 2. 7: modelado de (A) vista lateral y (B) vista frontal de unión de pentámeros de BLS (PDB 1XN1) derivatizados con faloidina a una hebra de actina (PDB 6BNO). La faloidina se une específicamente a la interfaz entre monómeros de actina.

Ensamblaje de BLS con faloidina y oligonucleótidos de DNA

Dado que se pretendía emplear la química de los tioles en la unión de la faloidina como de los oligonucleótidos, resultaba importante hacer un ensamblaje secuencial que permitiera tener control del lugar en el que cada elemento se une a BLS. Un correcto orden de ensamblado evitaría reacciones cruzadas. En este sentido, lo primero que debe hacerse es unir la faloidina-amino a las cisteínas 88 de BLS, de manera tal que la reactividad de estas últimas quede “bloqueada” en pasos siguientes. Para esto se empleó el adaptador mal-PEG2-NHS cuyos extremos reaccionan con tioles y grupos aminos respectivamente. Se unió secuencialmente el adaptador a las cisteínas por el extremo maleimida y luego la faloidina al extremo NHS del mismo. En una segunda etapa, se unieron los oligonucleótidos funcionalizados con tioles a los extremos N-terminal de la proteína empleando el

mismo adaptador (Figura 2. 8). Al igual que en la etapa anterior, primero se unió el adaptador a las aminas terminales de la proteína, pero esta vez por su extremo NHS y luego se hizo reaccionar el extremo maleimida con los tioles de los oligonucleótidos. A partir de aquí llamaremos OBF a la partícula compuesta por el oligonucleótido, la proteína y la faloidina.

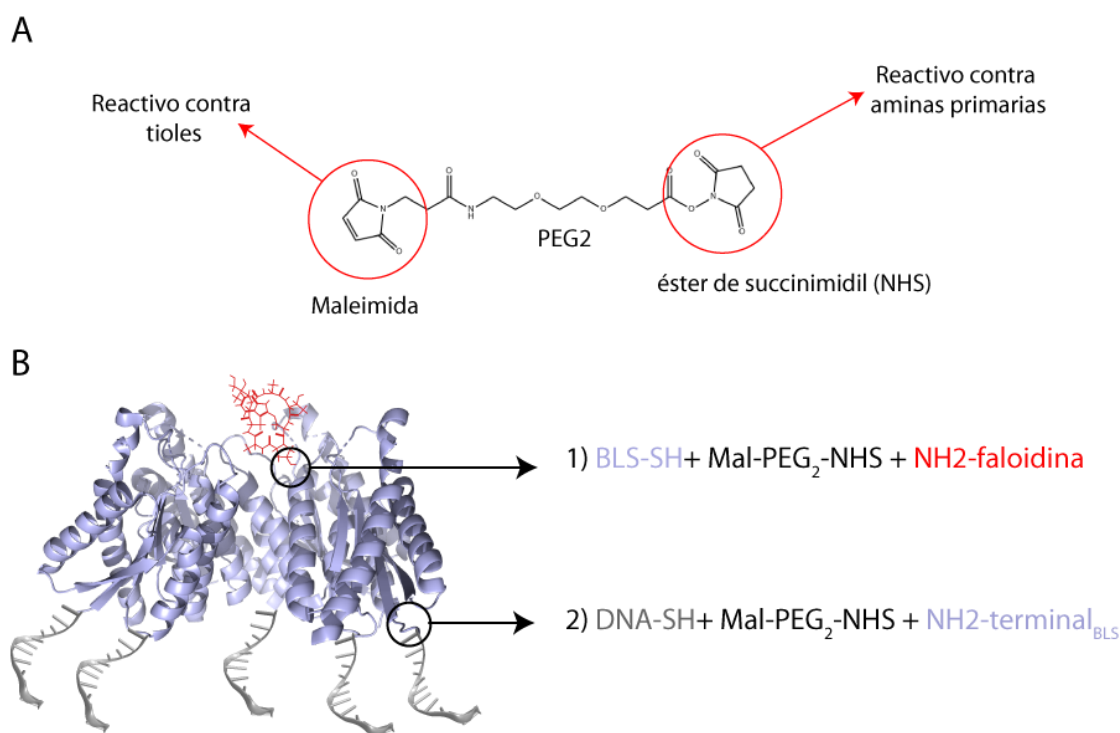


Figura 2. 8: Esquema de ensamblado en 2 pasos de la partícula de reconocimiento de actina para posterior visualización por FRET-PAINT. EN un primer paso se une faloidina (funcionalizada con un grupo amino) al aminoácido C88 mediante un adaptador mal-PEG₂-NHS. En un segundo paso se unen los oligonucleótidos (funcionalizados con un grupo tiol) al extremo N-terminal de BLS empleando el mismo adaptador.

En la Figura 2. 9A se puede observar el espectro de absorbancia típico de BLS (máximo en 280 nm), de faloidina (máximo en 290 nm con dos hombros a 280 y 310 nm) y de los oligonucleótidos (máximo en 260 nm). Estas diferencias permitieron monitorear los pasos de marcación por espectrofotometría. A medida que se fueran uniendo las moléculas, se esperaba que los espectros resultantes fueran una combinación de los espectros individuales. La marcación también fue seguida por

SDS-PAGE. En la Figura 2. 9B se puede observar un corrimiento de parte de los monómeros de BLS debido a la unión con faloidina, consistente con la suma de sus pesos moleculares. Sin embargo, aquí se puede ver que la reacción no es completa, sino que ronda el 50% de los monómeros. Este resultado es similar al observado en el capítulo anterior cuando se intentó unir fluoróforos a BLS en el mismo sitio. Nuevamente, la hipótesis es que la ocupación de los 5 sitios no puede ser completa debido a impedimentos estéricos. Tras unir el adaptador al extremo N-terminal, se observan 2 cambios: por un lado, un patrón de corrida menos definido y por otro la formación de lo que parecen ser dímeros o trímeros. Esto puede deberse a efectos de *crosslinking* inespecífico entre monómeros durante el calentamiento de la muestra previo al sembrado en el gel, debido al exceso de adaptador. Las especies de mayor peso molecular disminuyen en el paso final de agregado de los oligonucleótidos, soportando la hipótesis anterior.

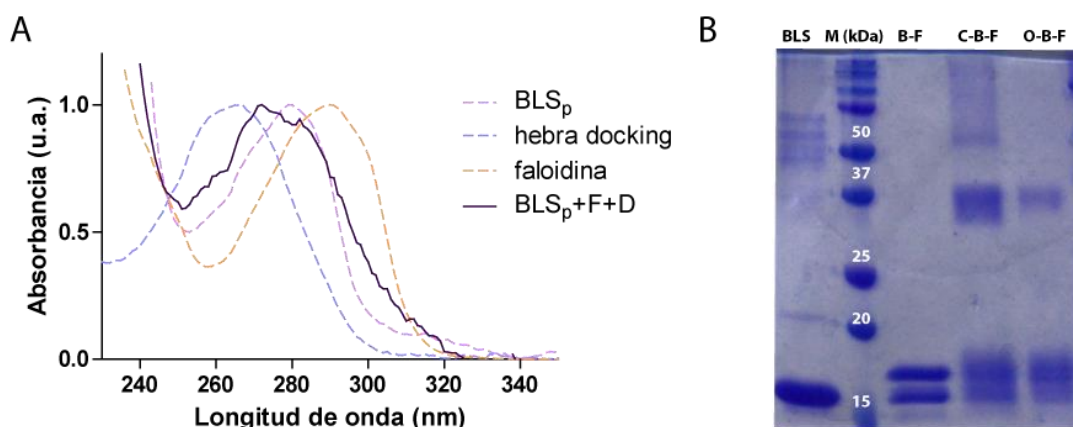


Figura 2. 9: (A) Espectro de absorbancia de BLS pentamérica, la hebra “docking” (oligonucleótido), la faloidina y la partícula compuesta por los 3 anteriores. (B) SDS-PAGE de BLS, BLS unida a faloidina (B-F), el producto intermedio derivatizado con el adaptador (C-B-F) y el producto final unido a la hebra docking (O-B-F).

Para tener una marcación de referencia, se unió faloidina a la secuencia *docking* de oligonucleótidos, empleando el mismo adaptador. Denominamos a este marcador OF. Dicha unión fue monitoreada por espectroscopía de absorción. En la Figura 2.

10 se observa la comparación entre los espectros separados y tras la unión de ambos componentes.

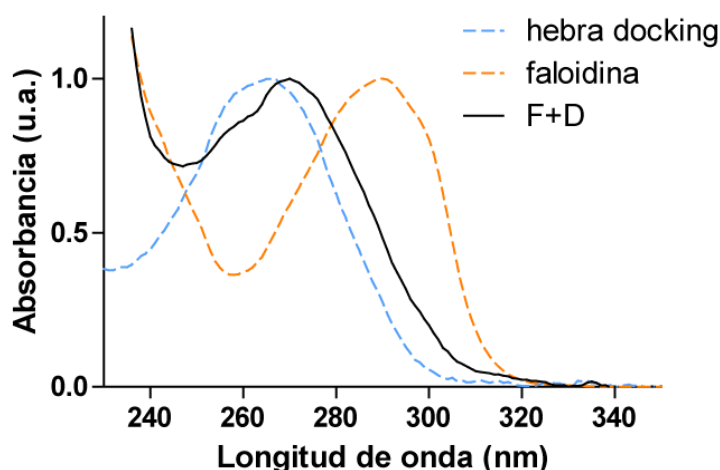


Figura 2. 10: Espectro de absorción de la hebra “docking” (oligonucleótido), la faloidina y la partícula compuesta por los 2 anteriores.

Para caracterizar el desempeño de los marcadores OBF y OF para DNA-PAINT, colocamos una solución muy diluida de cada muestra en un portaobjetos. Dicho portaobjetos estaba previamente recubierto con una capa de polímero positivo (PDDA), de manera tal que la proteína y la faloidina (cuyo punto isoeléctrico se encuentra por debajo del pH de trabajo) se pegaría inespecíficamente a la superficie por interacciones electrostáticas. Empleando la correcta combinación de *imagers*, láseres y filtros de emisión sería posible visualizar y caracterizar nubes de puntos sueltas correspondientes a marcadores individuales. En este caso, decidimos visualizar las estructuras por excitación directa del aceptor. En la Figura 2. 11 y en la Tabla 2. 1 se pueden ver una comparación de diámetros y ciclo de trabajo para OF y OBF. Ambos parámetros guardan una cierta proporcionalidad con el número de sitios *docking*. Dado que BLS posee hasta 5 sitios para *docking* se espera que el diámetro de las nubes de localizaciones de BLS sea mayor a las de faloidina. Por otro lado, como se explicó en el capítulo 1, el ciclo de trabajo (DC) depende de ton

y toff. Si para las dos muestras se usa el mismo par de oligonucleótidos *docking-imager*, cada *docking* se considera independiente de las demás y la concentración del *imager* en solución se mantiene invariante, se espera que el ton no se modifique y que el toff se reduzca cuántas más *dockings* haya disponibles. El menor toff se traduce en un mayor DC. Los múltiples dockings de OBF también pueden incrementar el ton si los imagers que se desprenden un *docking* y se pueden unir a otro aledaño antes de difundir lejos del marcador.

Experimentalmente se observa que el DC de OBF es 2.4 veces mayor que el de OF, principalmente producido por una reducción de toff, pero también debido a un incremento de ton.

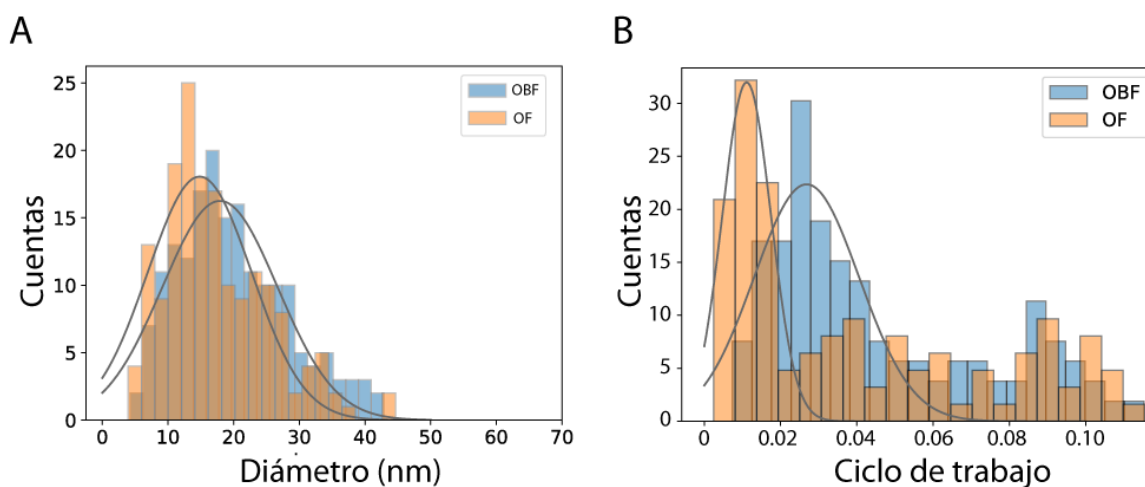


Figura 2. 11: Comparación de parámetros obtenidos para OF y OBF medidos por DNA-PAINT ([Imager A]= 0,5 nM; laser de excitación 635nm; potencia 10 mW; filtro de emisión 725/40). (A) distribución de diámetros para OF y OBF (B) distribución de ciclos de trabajo para OF y OBF

	OF	OBF
Concentración imager A (nM)	0.5	0.5
Laser excitación (nm)	635	635
Filtro emisión (nm)	725/40	725/40
Precisión (nm)	6.11±2.60	6.85±2.73
Diámetro (nm)	14.81±7.91	17.91±8.78
Ton (s)	1.16	1.25
Toff (s)	465	364.59
DC	0.011±0.006	0.027±0.014

Tabla 2. 1: Comparación de parámetros promedio medidos por DNA-PAINT de las partículas de faloidina sola (OF) y BLS-faloidina (OBF) reveladas por excitación directa del aceptor. En la tabla se indican también las condiciones de medición.

Caracterización de los imagers

Si se desea realizar imágenes por FRET-PAINT es necesario realizar previamente una serie de controles. En primer lugar, es necesario estar seguro de que lo que se ve es efectivamente FRET y no emisión directa del donador. Para esto es necesario seleccionar correctamente un filtro de emisión que deje pasar los fotones emitidos por el aceptor, pero no los del donador. Al fenómeno en el cual se observan fotones del donador pasando a través del filtro del emisor se lo suele llamar “sangrado”. Éste fenómeno suele ser bastante frecuente y si bien es difícil bloquear totalmente los fotones provenientes por excitación directa del donador, es deseable que los mismos sean mínimos. En la Figura 2. 12 se observa una muestra de OBF en presencia de imager donador y excitada con láser verde (correspondiente al donador). A la izquierda se ven las nubes de localizaciones obtenidas con el filtro de emisión que sólo deja pasar al donador y a la derecha se observa el mismo campo con el filtro correspondiente al aceptor. En ambos casos las nubes de localizaciones grandes corresponden a nanopartículas de oro de 100 nm que emiten a ambas longitudes de onda y sirve como marcas fiduciarias. De la Figura 2. 12 se puede concluir que efectivamente, aquellas localizaciones que se observen al excitar con láser verde y se revelan con el filtro 725/40, no pueden ser asignadas a emisión directa del donador.

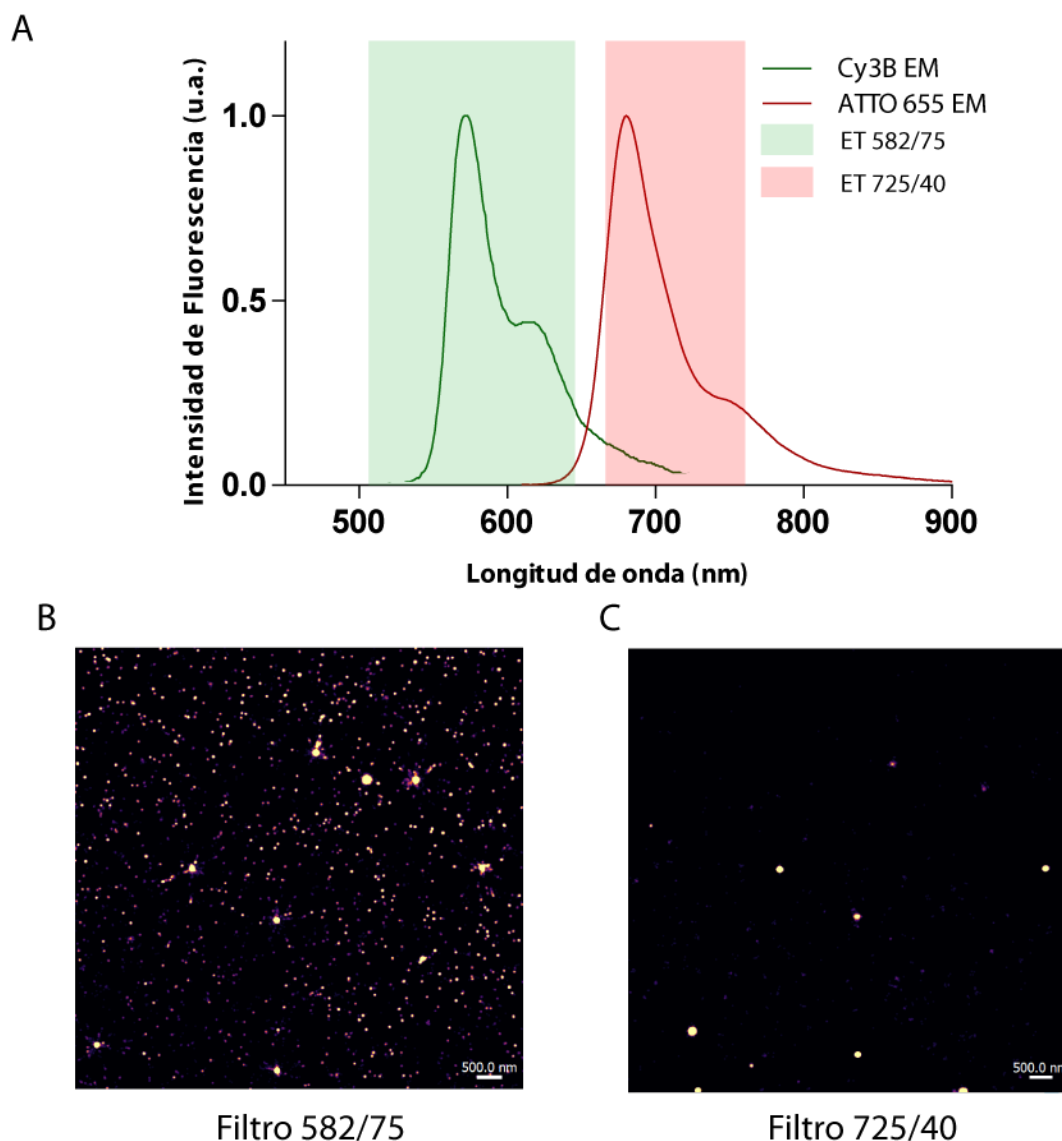


Figura 2. 12: Comparación de imágenes de súper-resolución por DNA-PAINT de un mismo campo de partículas de BLS ubicadas al azar sobre el vidrio iluminando con láser 532 nm y revelando con el imager D. En (A) se muestra la imagen obtenida con un filtro de detección 582/75 y en (B) se muestra la imagen obtenida con un filtro 725/40. En ambas imágenes se observan unos clústeres de gran tamaño correspondientes a nanopartículas de oro de 100 nm de diámetro, empleadas como marcadores fiduciarios.

Como segundo control, decidimos evaluar si el láser verde, a la potencia empleada es capaz de excitar directamente al fluoróforo aceptor. Para esto, preparamos una muestra sólo con *imager* aceptor y la excitamos con ambos láseres (verde y rojo), revelando sólo con filtro 725/40. En la Figura 2. 13 se observa que efectivamente,

el láser verde tiene poca capacidad de excitación directa al *imager* aceptor. Esto implica que todas las localizaciones observadas al excitar con láser verde deberían provenir de eventos de FRET, en el caso de que ambos *imagers* estén presentes en la muestra.

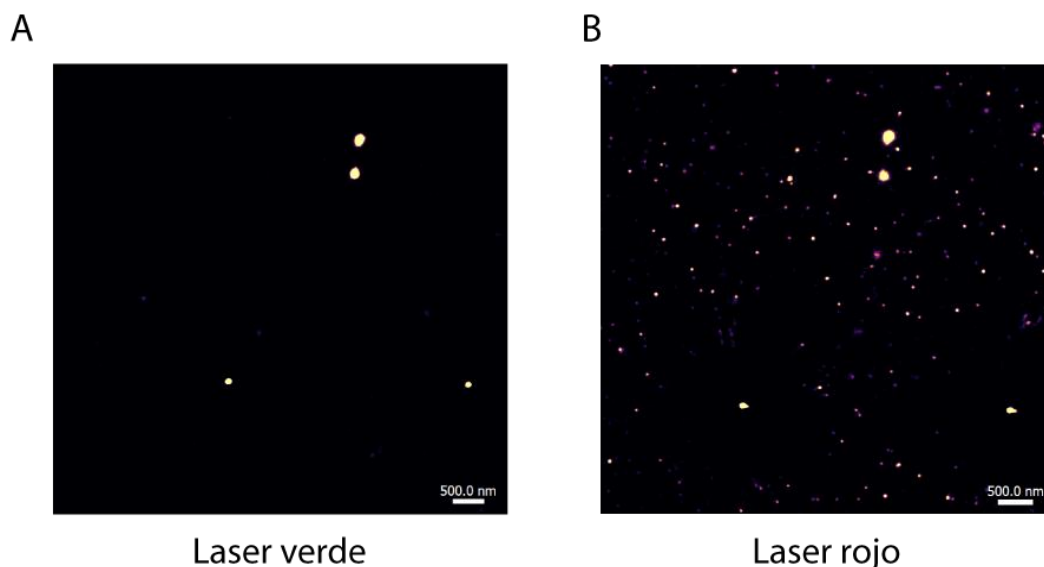


Figura 2. 13: Comparación de imágenes de súper-resolución por DNA-PAINT de un mismo campo de partículas de BLS ubicadas al azar sobre el vidrio iluminando con (A) láser 532 nm y (B) laser 642 nm, revelando con el imager A y empleando un filtro de detección 725/40. En ambas imágenes se observan unos clústeres de gran tamaño correspondientes a nanopartículas de oro de 100 nm de diámetro, empleadas como marcadores fiduciales.

Una vez hechos los controles correspondientes, procedimos a caracterizar las nubes de localizaciones obtenidas por excitación directa de ambos *imagers*. En ambos casos la potencia del láser de excitación correspondiente fue la misma (10 mW) y la concentración del *imager* también (2nM), valores relativamente altos para imágenes por DNA-PAINT. En la Figura 2. 14 se muestra la distribución de las variables estudiadas (precisión de localización, diámetro de la nube de localizaciones, tiempo de encendido y tiempo de apagado) y en la Tabla 2. 2 los promedios obtenidos de dichas distribuciones. No se observaron grandes diferencias en la precisión de localización y el diámetro de las nubes obtenidas con ambos *imagers*. Esto era de esperar dadas las condiciones de medición similares.

Cualquier diferencia podía ser asignada a las diferencias en las propiedades fotofísicas de los fluoróforos unidos a cada *imager*. Por otro lado, se observaron algunas diferencias sustantivas en los tiempos de encendido y apagado. Como se explicó previamente, el tiempo de encendido depende en primer lugar de la longitud de los oligonucleótidos y en segundo lugar de la secuencia (específicamente de la proporción de CG de la misma). Teniendo en cuenta que en el diseño de los oligonucleótidos el *imager* aceptor (10 bases) tienen un nucleótido más que el donador (9 bases), era esperable que permaneciera más tiempo unido al sitio *docking*. En trabajos previos reportaban una diferencia de un orden de magnitud entre ambas longitudes¹⁸⁴, mientras que en nuestro caso se observa una de 6 veces. Finalmente, se observó una diferencia significativa en el tiempo de apagado. No se esperaba que hubiera diferencias significativas en esta variable. La interpretación de esto es una falla en la cuantificación de la concentración de la solución madre de alguna de los dos *imagers*.

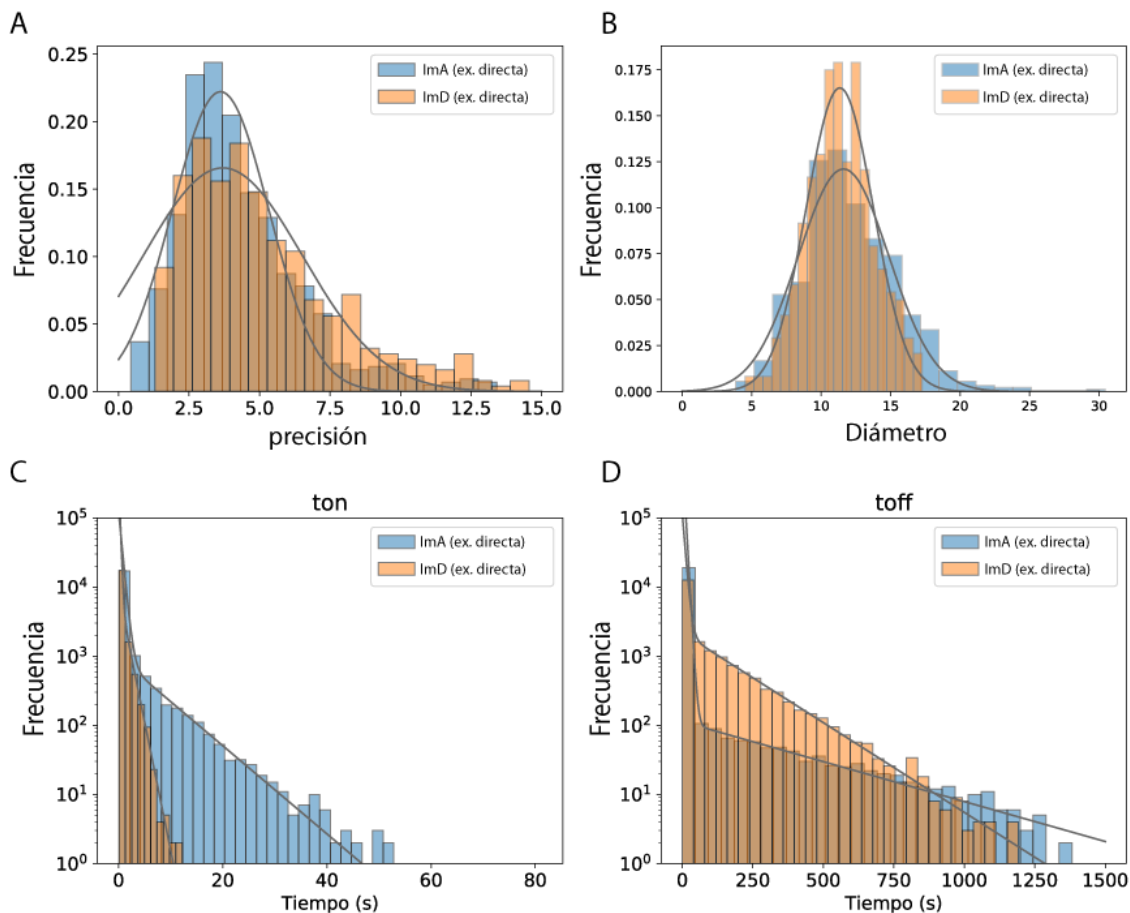


Figura 2. 14: Comparación de la distribución de parámetros medidos por DNA-PAINT de las partículas de BLS reveladas de manera separada con cada imager, excitados con sus correspondientes láseres y filtros de excitación y detección. (A) distribución de precisiones de localizaciones, (B) distribución de diámetro de clusters (C) Ton y (D) Toff

parámetro	Imager aceptor	Imager Donor
Concentración (nM)	2	2
Laser excitación (nm)	642	535
Filtro emisión (nm)	725/40	582/50
N (partículas)	1573	1778
Precisión (nm)	3.6 ± 1.7	3.7 ± 2.8
Diámetro (nm)	11.6 ± 3.3	11.3 ± 2.4
Ton (s)	6.65 / 0.64	1.14 / 0.15
Toff (s)	344.96 / 7.19	170.64 / 9.54

Tabla 2. 2: Comparación de parámetros promedio medidos por DNA-PAINT de las partículas de BLS reveladas de manera separada con cada imager, excitados con sus correspondientes láseres y filtros de excitación y detección. En la tabla se indican también las condiciones de medición de cada caso.

FRET-PAINT de partículas individuales

Hecha la caracterización de DNA-PAINT por excitación directa de ambos *imagers* y los controles necesarios para FRET, decidimos evaluar las condiciones para obtener imágenes por FRET-PAINT. Realizamos un barrido de concentraciones de ambos *imagers* y calculamos el toff para cada combinación de concentraciones. El objetivo fue encontrar la mayor concentración posible de *imagers* para poder tener imágenes de FRET-PAINT de resolución similar a DNA-PAINT, pero en tiempos menores. En la Figura 2. 15, se observan los resultados de dicho barrido y las tendencias observadas. En primer lugar, se puede decir que las variaciones en la concentración de ambos *imagers* no tienen el mismo efecto sobre la dinámica de FRET. Si bien es posible obtener imágenes de súper-resolución con concentraciones de aceptor de hasta 200 nM (2 a 3 órdenes de magnitud por encima de la concentración típica de DNA-PAINT), el aumento en la concentración del donador tienen un efecto negativo porque impide la ubicación de moléculas individuales y reduce la resolución. La dependencia del tiempo de resolución con la concentración de ambos *imagers* se observa en la Figura 2. 16. La forma de esta dependencia esta en concordancia con trabajos previos¹⁸².

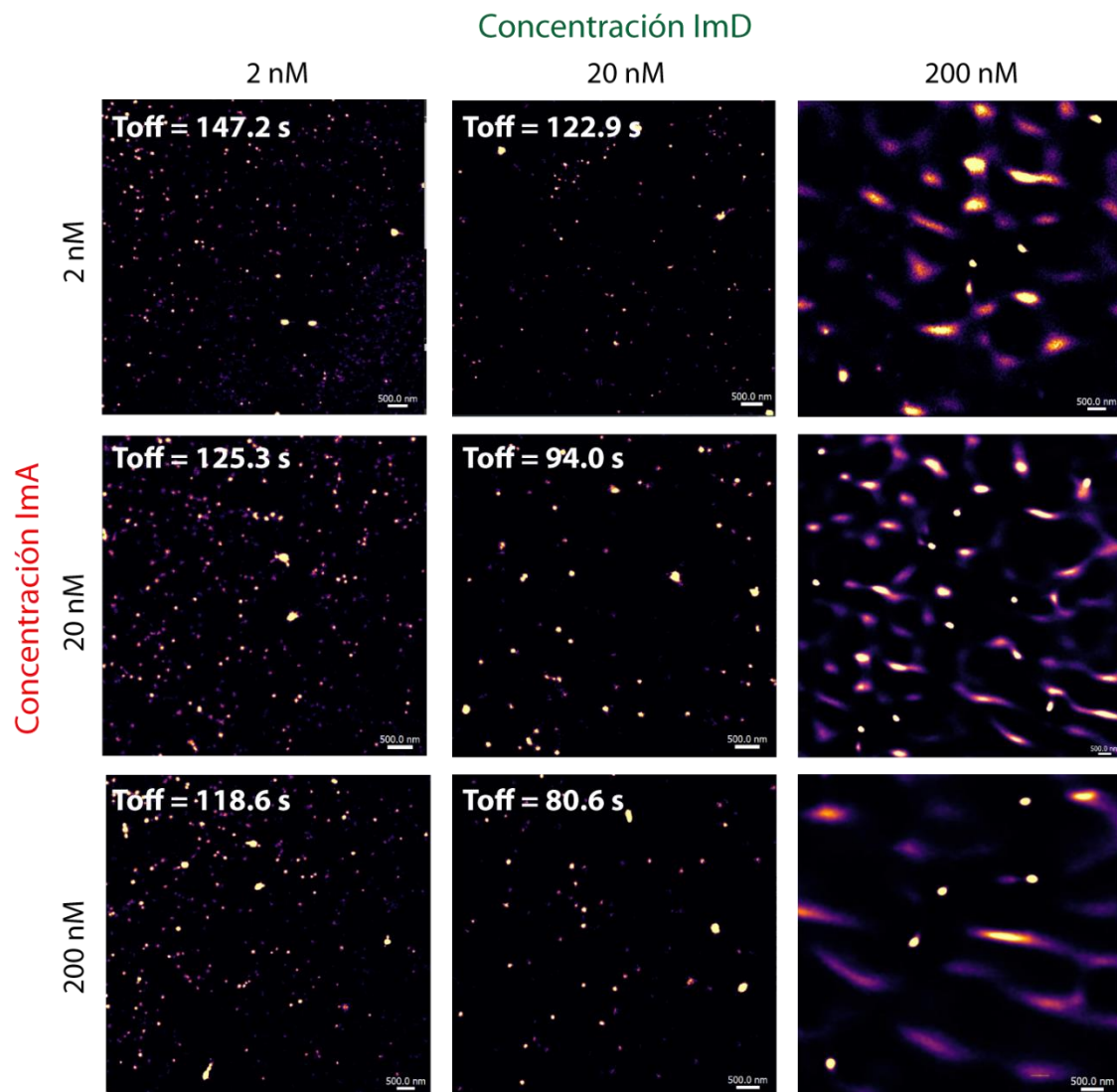


Figura 2. 15: Comparación de imágenes de súper-resolución por FRET-PAINT partículas de BLS ubicadas al azar sobre el vidrio en presencia de ambos imagers (A y D) en distintas relaciones de concentración. En todos los casos se excitó al imager D (laser 532 nm) y se detectó solo la señal del Imager A (filtro 723/40). Se indica en cada imagen el Toff promedio obtenido para cada combinación de concentraciones. EN los casos donde no fue posible obtener una imagen de súper-resolución, no se indica valores de Toff.

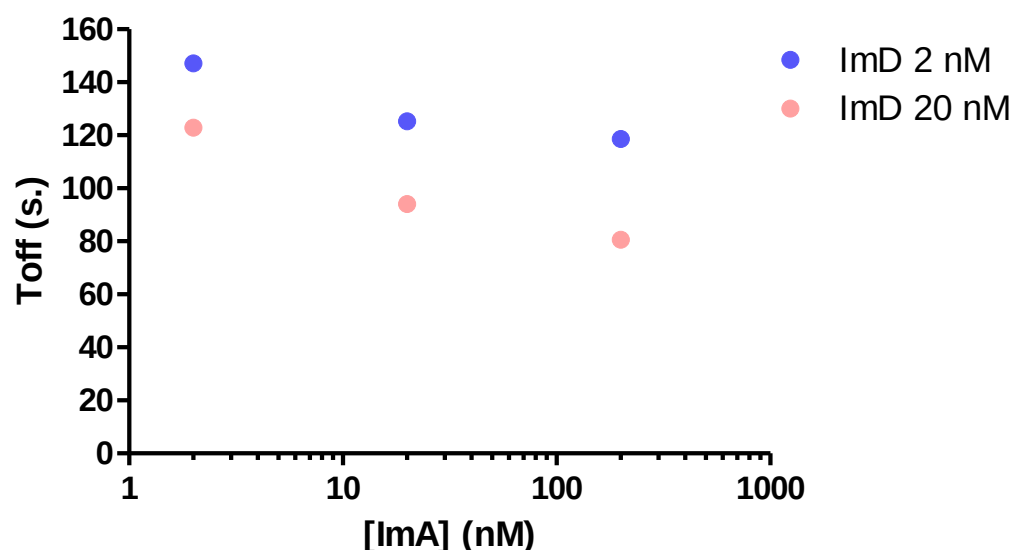


Figura 2. 16 toff en función de la concentración de imager Aceptor para dos concentraciones diferentes de imager Donor.

En base a los ensayos anteriores concluimos que la mejor combinación en términos de tiempo mínimo de adquisición para obtener una imagen de súper-resolución de partículas individuales es 200 nM de aceptor y 20 nM de donador. En la Tabla 2. 3 se muestra la comparación entre los parámetros medidos por excitación directa del *imager* aceptor y aquellos obtenidos por FRET. Si bien el tiempo de adquisición por FRET es unas 3 veces menor al necesario por excitación directa, se observa una disminución de la precisión de localización. Esto se puede corroborar midiendo en diámetro de las nubes de localizaciones que pasa de 11.6 nm (excitación directa) a 15.9 nm (FRET). Pese a esto, la precisión por FRET sigue siendo aceptable. Otra observación destacable es que el tiempo de encendido por FRET es un orden de magnitud menor que el medido por excitación directa. Esto es algo esperable, ya que para que el fenómeno FRET involucre, además de la distancia donador-aceptor, otros parámetros como la orientación relativa de los fluoróforos que pueden variar durante el tiempo de unión.

	ImA	ImA + ImD (10:1)
Concentración (nM)	2	200 – 20

Laser excitación (nm)	642	535
Filtro emisión (nm)	725/40	725/40
Precisión (nm)	3.6 ± 1.7	9.0 ± 2.0
Diámetro (nm)	11.6 ± 3.3	15.9 ± 3.3
Intensidad (u.a.)	739 ± 280	$565 \pm 161 / 1640 \pm 390$
Ton (s)	$6.65 / 0.64$	$0.6 / 0.1$
Toff (s)	$344.96 / 7.19$	$80.6 / 8.9$

Tabla 2. 3: Comparación de parámetros promedio medidos por DNA-PAINT y la condición elegida de FRET-PAINT de las partículas de BLS. En la tabla se indican también las condiciones de medición de cada caso.

Por otro lado, se decidió comparar los resultados obtenidos por FRET-PANT entre las partículas de BLS (OBF) y de faloidina unida a oligonucleótido (OF). Los resultados se muestran en la Tabla 2. 4. Se observa que para concentraciones similares de imager donador y aceptor, el toff de BLS mejora respecto a faloidina sola, pero no sustancialmente: se observó una mejoría en toff de tan solo un 20%. Esto está en concordancia con lo observado por excitación directa (Tabla 2. 1). Esto da la pauta de que tanto por excitación directa como por FRET, la velocidad de adquisición de imágenes mejora, pero no de manera directamente proporcional al número de hebras docking.

	OF	OBF
Concentración imagers (nM)	20 - 20	20 - 20
Laser excitación (nm)	535	535
Filtro emisión (nm)	725/40	725/40
Precisión (nm)	8.7 ± 2.3	8.5 ± 3.2
Diámetro (nm)	17.5 ± 2.3	16.6 ± 3.4
Intensidad (u.a.)	841 ± 231	$845 \pm 183 / 1609 \pm 336$
Ton (s)	$0.59 / 0.06$	$0.57 / 0.09$
Toff (s)	$118.15 / 7.5$	$96.22 / 12.37$

Tabla 2. 4: Comparación de parámetros promedio medidos por de FRET-PAINT de las partículas de faloidina (OF) y de BLS (OBF). En la tabla se indican también las condiciones de medición de cada caso.

Imágenes de actina por DNA-PAINT y FRET-PAINT

Una vez obtenido el sistema de marcación y visualización caracterizado, nos dispusimos a ponerlo a prueba en una muestra de células COS7. Brevemente, se fijaron y permeabilizaron células en un portaobjetos, las mismas fueron luego incubadas con nanopartículas de oro (marcador fiduciario) y con OF u OBF. Las muestras fueron primero reveladas por DNA-PAINT con una solución de *imager* aceptor diluida (0.5 nM). Los resultados se observan en la Figura 2. 17. Se compara la imagen de transmisión con la de súper-resolución. Tanto para OF como para OBF se puede observar la marcación específica de actina, aunque en ambos casos la marcación resultó ser incompleta, dado que solo se puede visualizar tramos entrecortados de fibra. El grado de marcación inespecífica fue muy bajo, ya que se observan pocas localizaciones por fuera de los márgenes de las células. Como se dijo en la caracterización previa, los tiempos de adquisición con OBF no mejoraron significativamente respecto a OF. El mismo campo fue visualizado por FRET-PAINT. Para esto, se cambió la solución de visualización por una que contuviera ambos *imagers*. A pesar de que en los estudios de partícula única se había encontrado concentraciones óptimas en términos de tiempos de adquisición, estas resultaron demasiado elevadas para una muestra biológica por lo que debieron ser diluidas hasta una concentración de 20 nM de ambos *imager*. Se puede observar que, a pesar de que por DNA-PAINT la actina pudo ser visualizada, al revelar por FRET-PAINT solo se observaron unas pocas localizaciones aisladas, sugiriendo que la cantidad de eventos de FRET-PAINT fue insuficiente para el objetivo propuesto. Esto debería poder mejorarse con una mejor densidad de marcación y con una nueva puesta a punto en células de concentraciones de *imagers* y tiempos de adquisición.

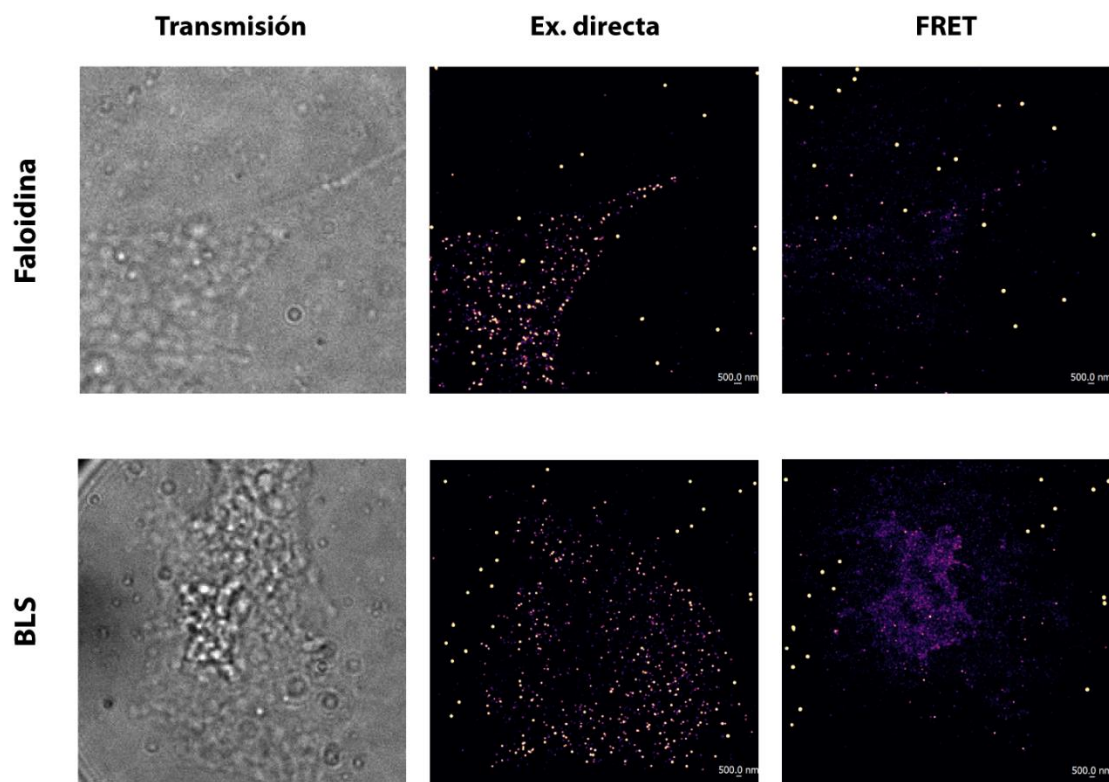


Figura 2. 17: imagen de supe resolución por DNA-PAINT de actina en Células COS7 marcadas con Faloidina o BLS visualizadas por excitación directa del fluoróforo aceptor o por FRET.

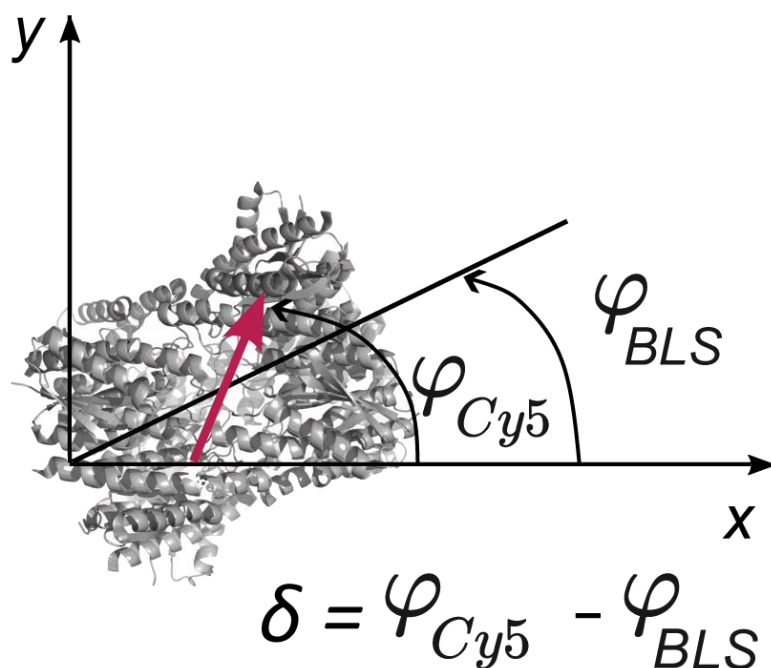
Conclusiones parciales

En este capítulo se ha propuesto el uso de una versión pentamérica de BLS como sistema de andamiaje modular para obtener imágenes de super-resolución de estructuras celulares por DNA-PAINT y FRET-PAINT. La hipótesis de trabajo es que BLS puede funcionar como una herramienta versátil para DNA-PAINT, dada su modularidad, y que en particular debería poder disminuir los tiempos de adquisición tanto por DNA-PAINT como por FRET-PAINT dada su estructura pentamérica. Para el caso de FRET-PAINT se podría esperar un efecto sinérgico entre hebras que aumente la probabilidad de eventos de FRET, dada la cercanía a la que estas quedan posicionadas en la estructura de BLS.

Si bien fue posible ensamblar correctamente y caracterizar la plataforma de DNA-PAINT basado en BLS, aún resta poner a punto las condiciones óptimas para la realización de imágenes de actina por excitación directa y FRET.

Por otro lado, mientras esta tesis era desarrollada aparecieron otras estrategias que optimizan los tiempos de adquisición por DNA-PAINT que valen la pena probar también en este sistema. La primera es la denominada *repetitive DNA-PAINT*, donde se usan secuencias de *docking* e *imagers* simétricas y repetitivas de modo de conseguir varios sitios de unión solapados para aumentar la probabilidad de unión²⁰⁶. La segunda es el uso de hebras fluorogénicas²⁰⁷ que permiten, al igual que en la estrategia basada en FRET, aumentar la concentración del imager sin perjudicar la precisión de localización. Estas dos estrategias ya fueron probadas y puestas a punto, incluso en nuestro laboratorio. En consecuencia, la opción de usar BLS para multiplicar los sitios de unión para DNA-PAINT no parece ser la más adecuada para seguir desarrollando.

CAPÍTULO 3: DETERMINACIÓN DE LA ORIENTACIÓN DE MOLÉCULAS INDIVIDUALES EN UNA CAJA PROTEICA MEDIANTE NANOSCOPIAS



Colaboración: Alan Szalai y Lucía López (microscopias y discusión de resultados), Juan Manuel Prieto y Marcelo Martí (dinámicas moleculares), Aleksandra Adamczyk y Guillermo Acuña (microscopía con luz polarizada)

Información estructural dinámica a partir de nanoscopías

Recientemente, la nanoscopía de fluorescencia y los métodos de fluorescencia de molécula única están avanzando en el campo de la biología estructural, abordando aspectos estructurales en condiciones biológicamente compatibles, incluso de forma dinámica. Por ejemplo, al analizar los desplazamientos nanométricos de marcadores fluorescentes con MINFLUX²⁰⁸ se reveló una rotación del tallo de la proteína motora kinesina-1 al caminar a lo largo de los microtúbulos. Los desarrollos adicionales de estos métodos tienen un enorme potencial para i) la observación directa de cambios conformacionales dinámicos de macromoléculas biológicas y su interacción con moléculas más pequeñas en condiciones compatibles con la vida y ii) el estudio de la función dinámica de nano estructuras naturales o artificiales, como dispositivos basados en origami de ADN.

En trabajos recientes se ha presentado una técnica para determinar la orientación de fluoróforos individuales respecto a estructuras de origami de ADN en las que estaban unidos^{209,210}. Primero, la orientación del dipolo de transición de absorción de la molécula se determinó a través de una medición de excitación resuelta por polarización. En segundo lugar, la orientación de la estructura del origami de ADN se obtuvo a partir de una medición de DNA-PAINT. Para esto último, se marcaron al menos 2 posiciones del origami, lo suficientemente alejadas entre sí como para resolverlas.

Teniendo en cuenta este antecedente, nos propusimos evaluar si esta técnica podría usarse en un sistema proteico, lo cual reviste de relevancia dadas las posibles aplicaciones en sistemas biológicos reales. Para eso, decidimos emplear como modelo de trabajo la construcción ensamblada en el capítulo 1, en la que obtuvimos partículas de BLS con un fluoróforo (Cy5) en su cavidad interior (Figura 3. 1). Las mediciones de las orientaciones absolutas de fluoróforos parecen reproducibles en nuestro sistema. Sin embargo, teniendo en cuenta que BLS (y las estructuras proteicas en general) es 1 orden de magnitud más pequeño que los

origami de ADN utilizados en trabajos anteriores e incluso más pequeño que la resolución típica de DNA-PAINT (10-20 nm), concluimos que es necesario realizar modificaciones a la técnica de manera tal de poder determinar la orientación del *scaffold* proteico. Por otro lado, y como será discutido más adelante, dada la naturaleza tridimensional del sistema y que las técnicas empleadas tienen muy baja resolución en el eje Z, fue necesario hacer adaptaciones y consideraciones que permitieran realizar mediciones confiables en 2 dimensiones.

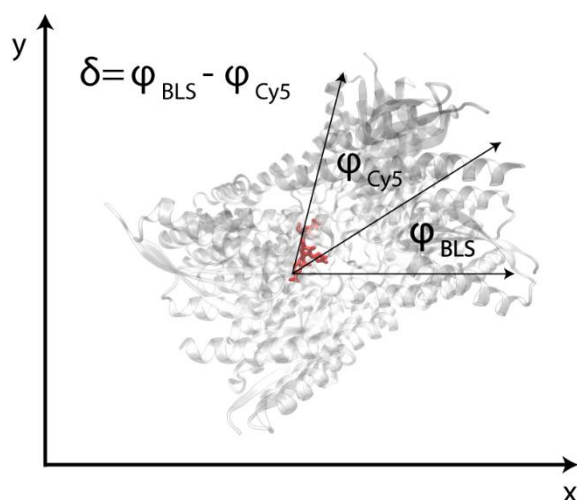


Figura 3. 1: esquema representativo de la orientación de la proteína (φ_{BLS}), del fluoróforo (φ_{Cy5}) y de la orientación relativa entre ambas (δ)

Orientación 2D de Cy5 en el plano por microscopía de fluorescencia con polarización resuelta en el tiempo

El uso de luz polarizada en microscopías en general y en nanoscopías en particular, permite acceder a información sobre la movilidad y la orientación de moléculas fluorescentes en una muestra^{211,212}. Considerando solo las transiciones de dipolos eléctricos, la probabilidad de absorción es proporcional a $|\mu \cdot E|^2$, donde μ es el momento dipolar de absorción de la molécula y E es el campo eléctrico de iluminación. Por lo tanto, una molécula será excitada más eficientemente con luz

linealmente polarizada en paralelo a su dipolo de absorción. La dependencia de la intensidad de la fluorescencia con respecto al ángulo θ entre la polarización de la luz y el dipolo de transición se rige por la Ley de Malus. Si un fluoróforo se encuentra fijo y se rota el plano de polarización de la luz, su intensidad de emisión oscilará con una dependencia de $\cos^2 \theta$. Por otro lado, si un fluoróforo se encuentra con libre rotación la emisión de fluorescencia no debería verse afectada por variaciones en la polarización. El caso intermedio (y tal vez el más frecuente) es aquel en el que el fluoróforo se encuentra anclado a un punto (por ejemplo, un anticuerpo o un oligonucleótido). En este caso, el mismo solo podrá tener una rotación cónica alrededor del punto de anclaje. Consecuentemente una variación en el plano de polarización de la luz afectará la emisión de fluorescencia, pero con menor amplitud que en el caso de un fluoróforo fijo.

Para medir la orientación de los fluoróforos, se realizaron mediciones de polarización resuelta en el tiempo en un microscopio de campo amplio de epifluorescencia (Figura 2. 2). Se usaron dos láminas de retardo. Una de cuarto de onda ($\lambda/4$) para pasar de luz circularmente polarizada a luz linealmente polarizada y una de media onda ($\lambda/2$) para rotar el plano de polarización de la luz. Esta última posee un motor para rotarla a velocidad constante. La velocidad de rotación del polarizador fue de 20°/s.

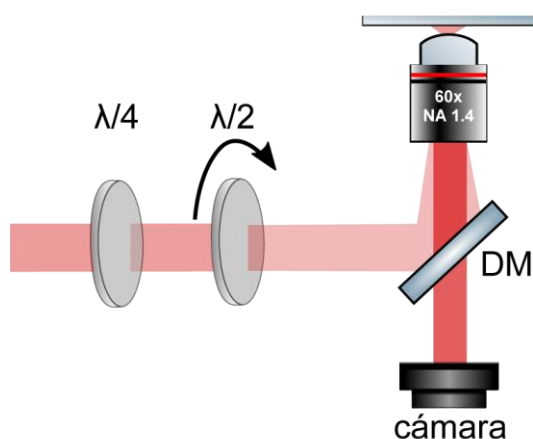


Figura 3. 2 set up experimental para la medición de polarización resuelta en el tiempo.

Se grabaron videos de las partículas fluorescentes hasta que se fotoblanquearon la mayor parte de los fluoróforos. Conociendo la dependencia de la intensidad con el ángulo de excitación, fue posible ajustar la señal y obtener el ángulo del fluoróforo desde las posiciones de máxima intensidad de emisión (momento en que dicho ángulo y el de excitación resultaban paralelos). Para esto, fue necesario conocer en todo momento la orientación del plano de orientación de la luz de excitación (Figura 3. 3).

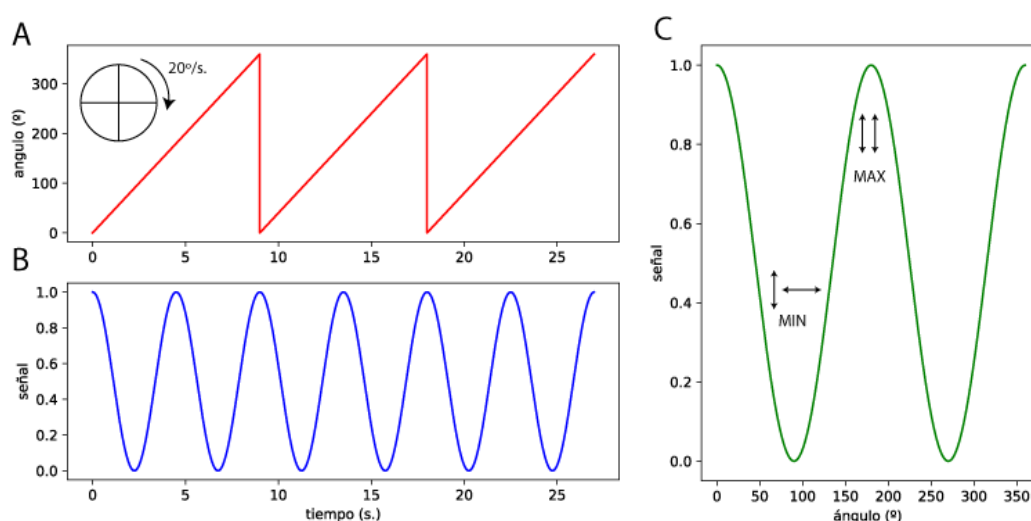


Figura 3. 3: (A) Ángulo del plano de la luz linealmente polarizada en función del tiempo. (B) Señal esperada por la ley de Malus en función del tiempo, asumiendo la orientación de un fluoróforo paralela al plano inicial de polarización. (C) señal de esperada en función del ángulo relativo entre el plano de la luz y la orientación del fluoróforo.

Dado que nuestro dispositivo experimental no nos permitía medir el ángulo del polarizador directamente, decidimos empezar los experimentos siempre con el plano de la luz paralelo al eje Y del portaobjetos de la muestra y en determinado momento iniciar manualmente la rotación del polarizador. Teniendo en cuenta esto, resultaba importante determinar experimentalmente dicho momento con exactitud. Para eso, decidimos emplear nanopartículas de oro que pueden observarse con una señal mucho mayor que la fluorescencia de un fluoróforo, tienen menos blinqueo

y tampoco se fotoblanquean. Si bien las nanopartículas empleadas eran esferas de 100 nm de diámetro, aquellas nanopartículas que no fueran perfectamente esféricas o que formaran agregados irregulares, serían sensibles al plano de polarización de la luz. Así, independientemente de su orientación, fue posible detectar el momento de inicio de la rotación de la luz debido al inicio de la oscilación de la señal (Figura 3. 4). Si se promedian varias nanopartículas, es posible determinar con cierto grado de precisión dicho momento.

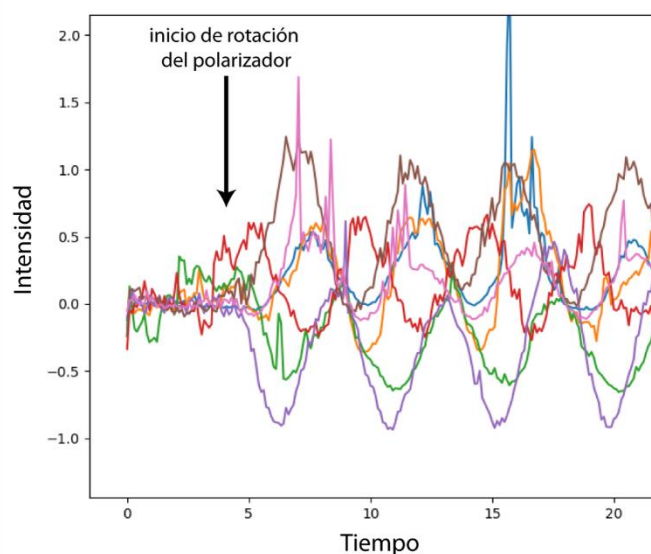


Figura 3. 4: trazas de luminiscencia (normalizada) en función del tiempo de distintas nanopartículas de oro de un mismo video. Con la flecha se indica el momento estimado en el cual se inició la rotación del polarizador de la luz

En las Figura 3. 5 y Figura 3. 6 se muestran dos ejemplos de trazas de fluorescencia de Cy5. El máximo de emisión de cada fluoróforo se alcanza cada vez que el polarizador coincide con la proyección en el plano del dipolo de transición del fluoróforo. Así, conociendo la orientación de la polarización en el plano de la muestra, del primer máximo de cada ajuste es posible obtener la orientación de cada fluoróforo. Para cada ciclo de rotación de la polarización, se ajustaron los datos y se obtuvo un valor de ángulo de Cy5 respecto al eje X de la muestra. Solo se tuvieron en cuenta las trazas con modulación superior a 0,2 y los ángulos obtenidos

con un buen ajuste ($r^2 > 0,6$). De esta manera, se obtuvo una distribución de ángulos de cada traza. En la mayoría de los casos, las distribuciones de ángulos fueron unimodales, lo que indica que el fluoróforo no se movió durante el experimento (Figura 3. 5). Sin embargo, algunos casos mostraron una distribución bimodal, lo que sugiere alternancia del fluoróforo entre 2 orientaciones diferentes (Figura 3. 6).

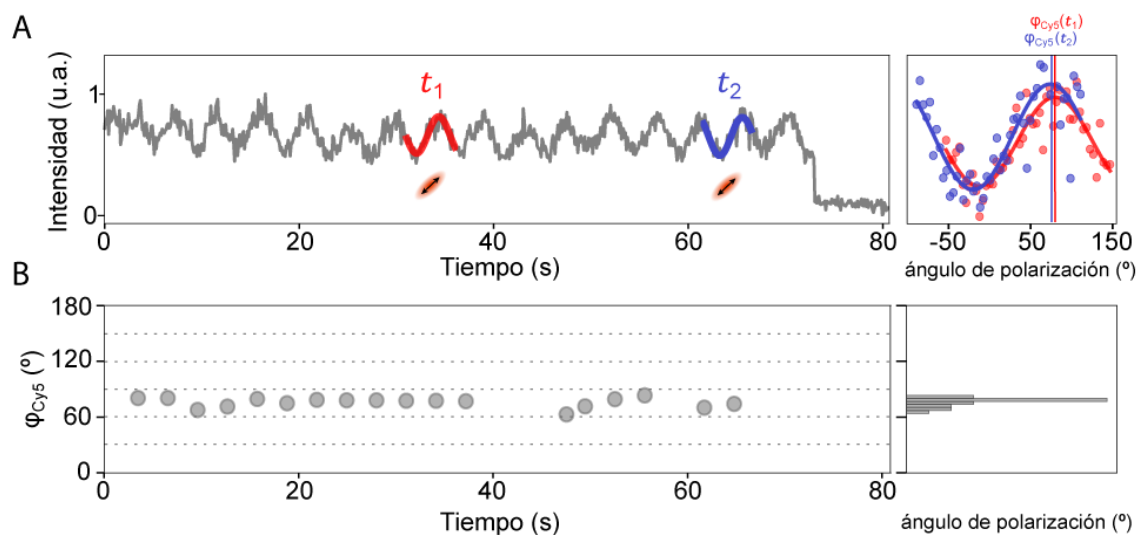


Figura 3. 5: Análisis de una traza con comportamiento unimodal (A) Trazas de fluorescencia en función del tiempo de una molécula de Cy5 dentro de BLS. En Rojo y azul se indican 2 ajustes a la ley de Malus en distintos momentos de la traza. A la derecha se muestran los dos ajustes superpuestos y el ángulo obtenido para cada uno. (B) Ángulos de cy5 obtenidos en función del tiempo. A la derecha se indica un histograma de los mismos.

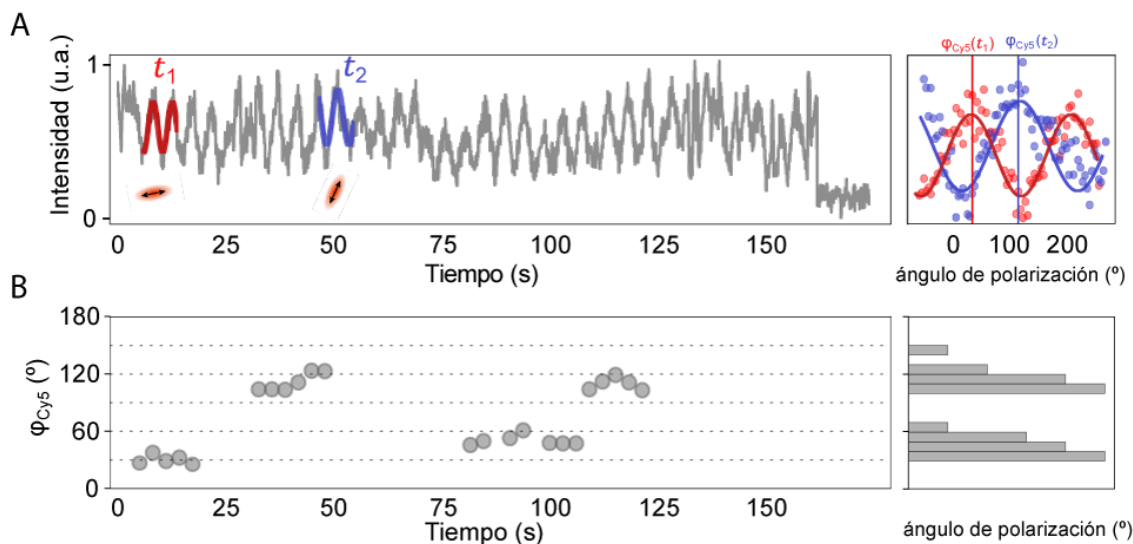


Figura 3. 6 Análisis de una traza con comportamiento bimodal (A) Trazas de fluorescencia en función del tiempo de una molécula de Cy5 dentro de BLS. En Rojo y azul se indican 2 ajustes a la ley de Malus en distintos momentos de la traza. A la derecha se muestran los dos ajustes superpuestos y el ángulo obtenido para cada uno. (B) Ángulos de cy5 obtenidos en función del tiempo. A la derecha se indica un histograma de los mismos.

Se probó una segunda condición experimental en la cual la velocidad de rotación del polarizador fue menor (5°/s.) para evaluar cual velocidad es más conveniente para obtener mejor calidad de datos. La comparación de trazas entre ambas condiciones se muestra en la Figura 3. 7. En la misma se observa que ambas condiciones tienen ventajas y desventajas: la condición rápida permite medir más cantidad de ciclos con menor cantidad de puntos por ajuste y la condición lenta permite obtener más cantidad de datos por ajuste, pero menor cantidad de ajustes por traza debido al fotoblanqueo de los fluoróforos. Dado que la calidad del ajuste a alta velocidad no es considerablemente peor que la de velocidad lenta y que la cantidad de ajustes por trazas es mayor, decidimos quedarnos con la rotación rápida (20°/s).

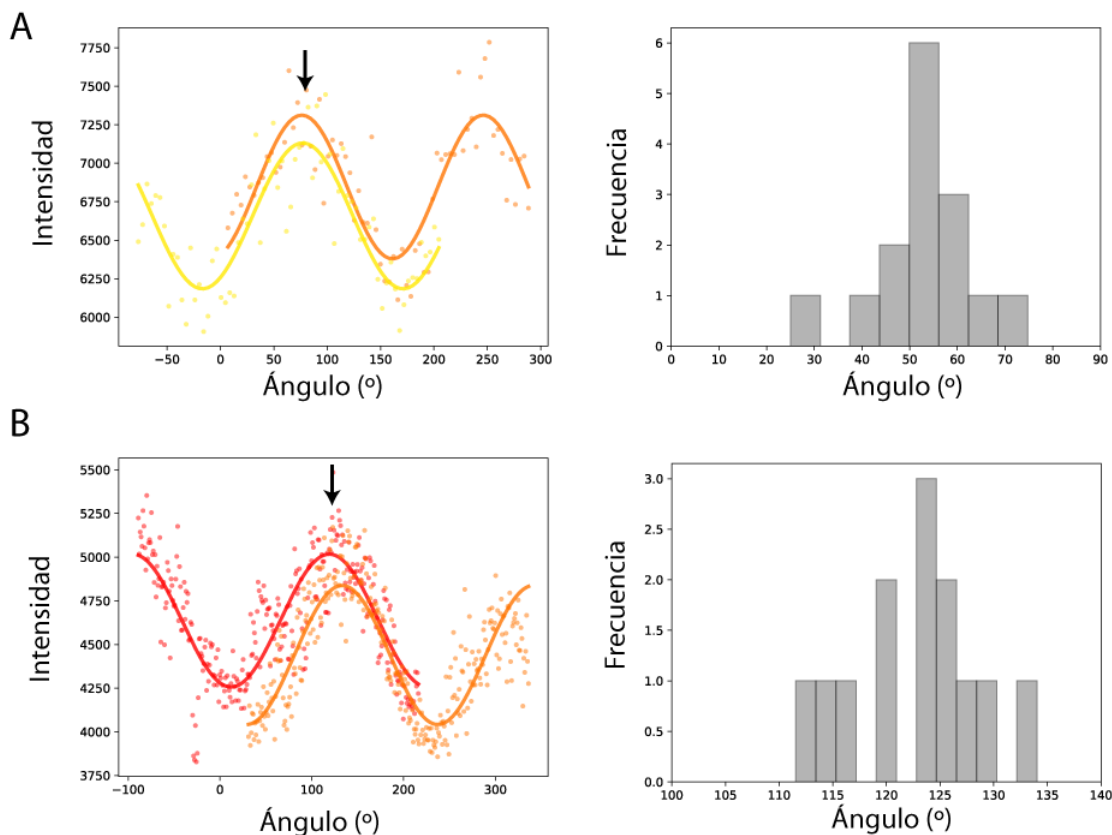


Figura 3. 7: Comparación de dos ajustes de trazas de fluorescencia de Cy5 y sus correspondientes histogramas medidas con 2 velocidades diferentes de rotación del polarizador de la luz (A) 20°/s. (B) 5°/s.

Orientación 2D de BLS por DNA-PAINT

Para determinar la orientación de las partículas de BLS por DNA-PAINT fue necesario marcar con oligonucleótidos los extremos de la proteína, de manera tal de poder definir un vector que refleje la orientación de la misma. Al igual que en el capítulo 2, se marcó a la proteína en los extremos N-terminales para tener en esta ocasión 2 polos de sitios de acoplamiento (de hasta 5 hebras de ADN), correspondientes a los extremos de cada pentámero (Figura 3. 8). En una situación ideal, se debería poder resolver dichos puntos y trazar una línea que refleje la orientación del eje mayor de la proteína. Sin embargo, existen diversos factores que afectan críticamente el uso de DNA-PAINT para resoluciones inferiores a 20 nm.

Las 2 más importantes son la precisión de localización y el control de la deriva térmica. Teniendo en cuenta que la distancia cristalográfica entre los extremos de BLS es de 8 nm, el estudio detallado y control de estas 2 variables resulta crucial para cumplir los objetivos propuestos.

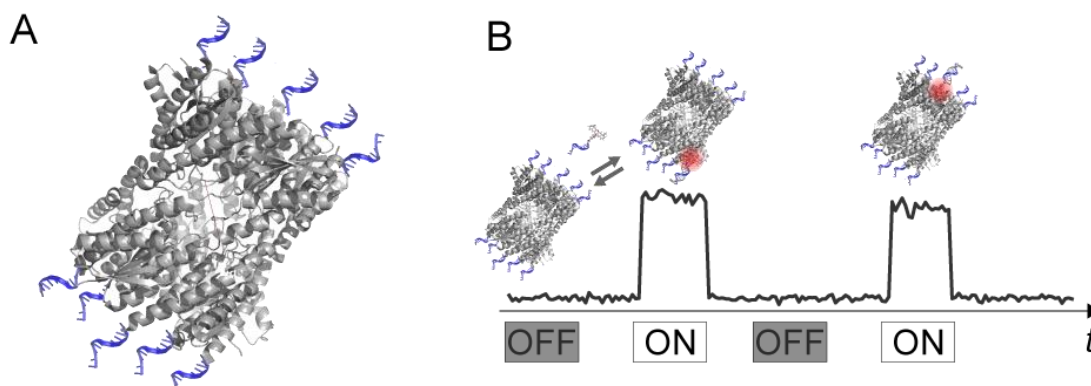


Figura 3. 8 (A) Esquema de marcación de BLS con oligonucleótidos de acoplamiento en los extremos N-terminal. (B) Representación de eventos de localización de BLS por DNA-PAINT.

Efecto de la Precisión de localización

Con el fin de explorar los alcances y limitaciones de DNA-PAINT para los objetivos propuestos, se realizaron simulaciones para evaluar la precisión mínima necesaria para resolver los extremos de BLS. Dichas simulaciones asumían la unión de oligonucleótidos en los 10 extremos N-terminales de BLS y la unión de hebras *imager* de manera tal que los fluoróforos quedaran del extremo lindante a la proteína. Como se ve en la Figura 3. 9, con una precisión de localización de 1 nm es posible resolver los dos extremos de BLS. Para precisiones peores, las nubes de localizaciones se funden en único clúster de forma ovalada. Típicamente, es muy difícil obtener precisiones de localización inferiores a 3 nm. Concluimos que las partículas de BLS serían visualizadas como nubes de puntos ovaladas.

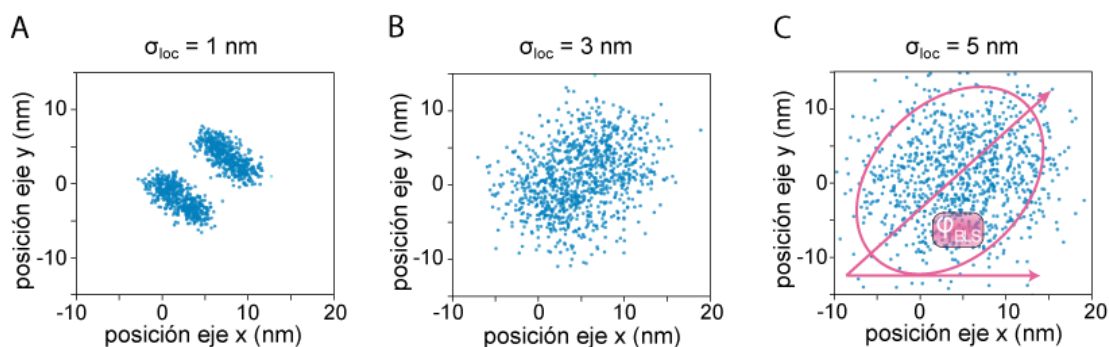


Figura 3. 9: Simulaciones de resultados obtenidos de DNA-PAINT para BLS marcada en sus extremos con diferentes precisiones de localización (A) precisión 1 nm (B) precisión 3 nm (C) precisión 5 nm, se muestra un esquema de la elipse de confianza empelada para calcular la orientación de la nube respecto al eje de coordenadas

Tomando en cuenta que la precisión de localización de nuestros experimentos es de entre 5 y 10 nm, estas simulaciones nos dieron la pauta de que las partículas de BLS se observarán con un diámetro promedio de entre 12 y 16 nm y una relación de aspecto de entre 1,10 y 1,20.

Como siguiente paso, usamos las simulaciones para ver si es posible determinar la orientación en el plano de las partículas de BLS a partir de un ajuste a la elipticidad de la nube de localizaciones. Abordamos este problema ajustando la nube de puntos a una elipse de covarianza (Figura 3. 10). Resumidamente, los pasos a seguir para obtener la orientación del eje mayor de la proteína son:

1. Ajustar las nubes de localizaciones a una elipse de confianza en 2D
2. Calcular la matriz de covarianza
3. Obtener los autovectores de dicha matriz
4. Obtener el ángulo del autovector de mayor módulo

Decidimos poner a prueba este método con nubes gaussianas simuladas de distintas relaciones de aspecto y distintos ángulos predefinidos. Los resultados se muestran en la Figura 3. 10. Como se puede observar, aun con una relación de aspecto casi circular (Figura 3. 10) es posible recuperar con buena precisión la orientación del cluster. Nótese que para el caso de ángulos cercaos a 0° y 180°

parece haber mucho error porque el ajuste devuelve alternativamente ambos valores, lo cual en principio no es un problema porque son equivalentes. Estos resultados, muestran que el método puede ser lo suficientemente robusto para nuestro sistema, aun en condiciones experimentales sub-óptimas.

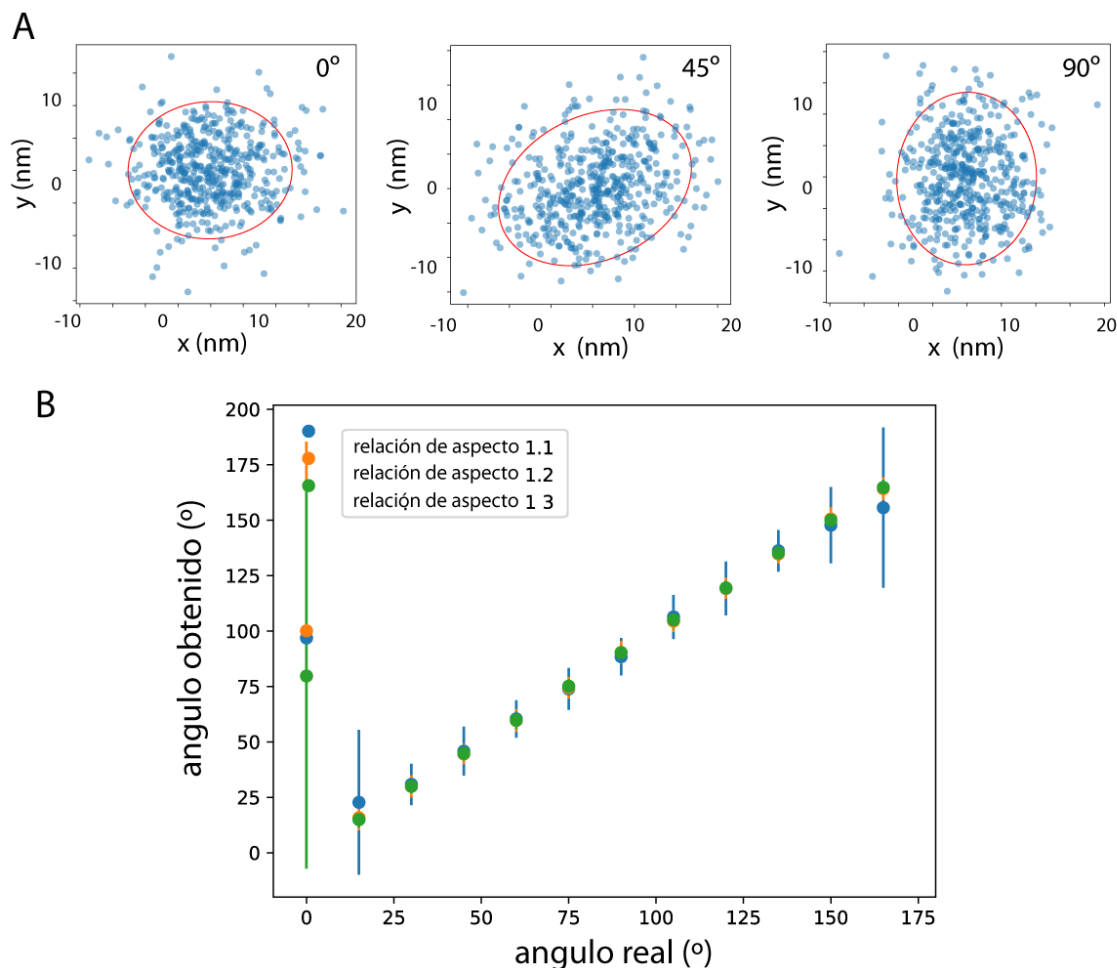


Figura 3. 10: Simulaciones de nubes de puntos elípticas rotadas de 0 a 180° (A) Nubes de puntos representativas de una relación de aspecto 1.2 rotadas y ajuste de sus correspondientes elipses de confianza. (B) Ángulos obtenidos por ajuste de elipses de confianza en función de los ángulos originales para distintas relaciones de aspecto (1.1-1.3). En todos los casos el número de simulaciones por punto fue 1000.

Estos resultados nos alentaron a realizar los primeros ensayos experimentales. Para ellos, primero tuvimos que decidir las condiciones óptimas de medición. Tomando como base las condiciones sugeridas en trabajos previos¹⁷⁹ para imágenes de ultra-resolución en DNA-PAINT, la muestra fue medida con una

concentración de imager relativamente alta (2nM) para obtener una buena frecuencia de eventos, en buffer Trolox+Glox para inhibir estados triplete y suprimir oxígeno, con una potencia de laser alta (10-12 mW) para obtener una buena precisión de localización y durante un período largo de medición para obtener suficientes localizaciones por clúster (1.30 hs). Para cada clúster se calculó el diámetro promedio, orientación del eje mayor, relación de aspecto y se graficaron las correspondientes distribuciones (Figura 3. 11).

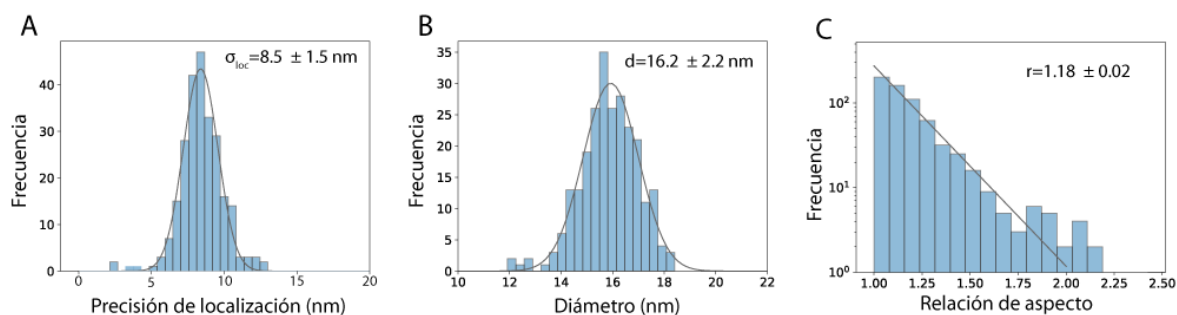


Figura 3. 11: Resultados de una medición de DNA-PAINT de una muestra de BLS (A) distribución de precisiones de localización (B) distribución de diámetros obtenidos para el conjunto de clusters. (C) distribución de relaciones de aspecto

Para medir la deriva de la muestra se utilizaron nanopartículas de oro como marcadores de referencia (Figura 3. 12).

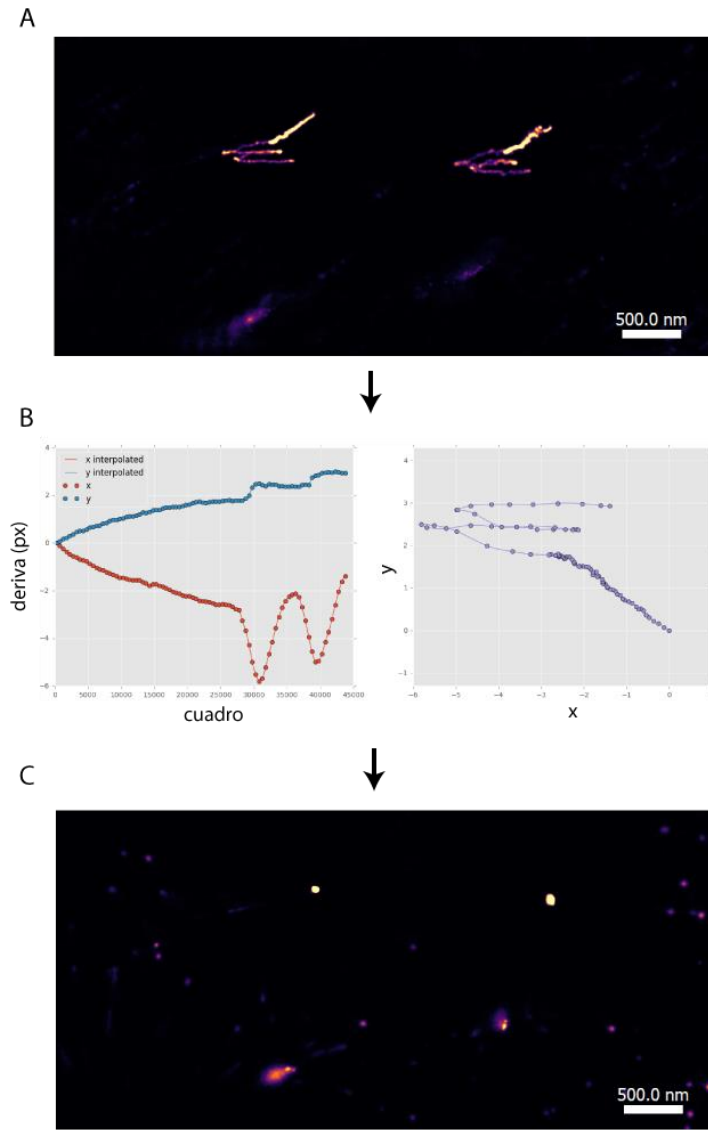


Figura 3. 12: (A) Trayectoria de 2 nanopartículas de oro en una medición de DNA-PAINT de 1 h 30 min. (B) posición promedio de las nanopartículas en función del tiempo. (C) imagen reconstruida de las nanopartículas tras corregir la deriva térmica.

Hecho esto, se calculó la orientación de todas las partículas de BLS y se chequeó que la distribución de las mismas fuera homogénea. Los resultados se muestran en la Figura 3. 13.

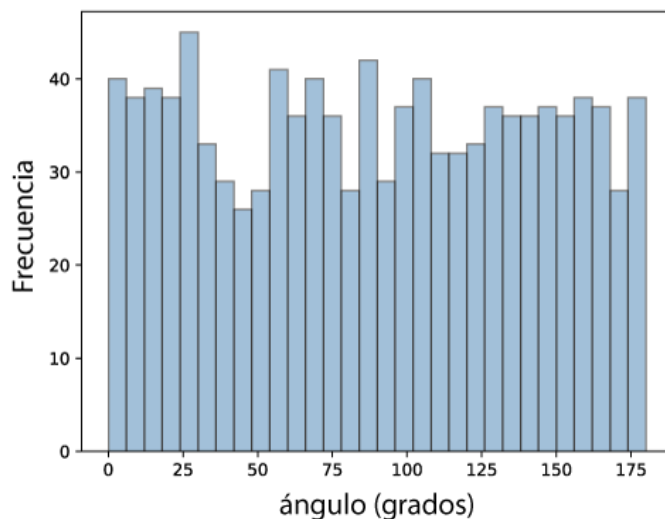


Figura 3. 13: histograma de distribución de ángulos encontrados para cada cluster de BLS

Orientación de Cy5 respecto a BLS por combinación de microscopías de molécula única

Una vez desarrollados los métodos de medición de orientación de fluoróforos y de orientación de BLS, se procedió a realizar ambos experimentos en tándem en la misma muestra. Ambas mediciones se alinearon empleando las nanopartículas de oro como fiducias y sólo aquellas partículas de BLS que también presentaron señales de Cy5 fueron consideradas en el análisis. En la Figura 3. 14 se muestra a modo de ejemplo un sector de campo en el que aparecen varias partículas con superposición de señal de ambos experimentos.

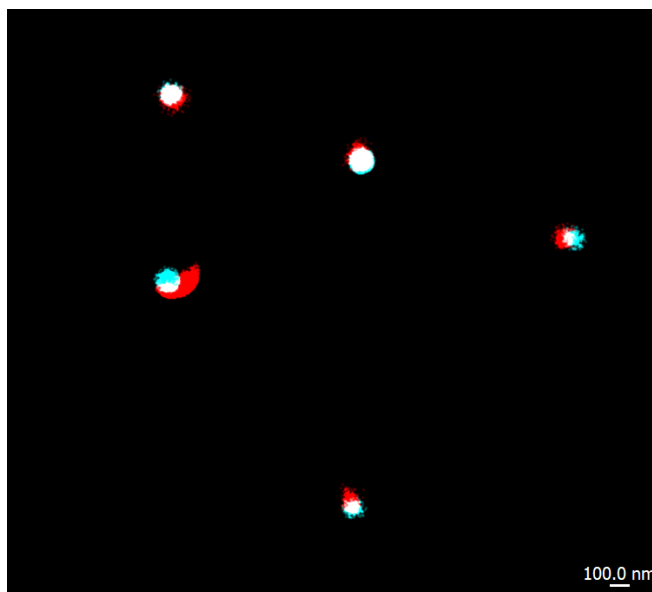


Figura 3. 14: superposición de imágenes obtenidas por polarización (rojo) y DNA-PAINT (cian).

Para analizar los datos, hay que tener en cuenta que las mediciones de polarización determinan la proyección de la orientación de los fluoróforos sobre el plano de la muestra. Por otro lado, la proteína y el fluoróforo dentro de la proteína pueden, en principio, tomar cualquier orientación en las tres dimensiones.

El hecho de que BLS pueda unirse de diversas maneras a la superficie impacta sobre la forma de la nube de localizaciones (Figura 3. 15): cuanto más perpendicular a la superficie se una, más redonda la nube y relación de aspecto más cercana a 1; mientras más paralela a la superficie se encuentre la proteína, más ovalada se verá la nube y la relación de aspecto será más cercana a 1,3 (relación de aspecto cristalográfica).

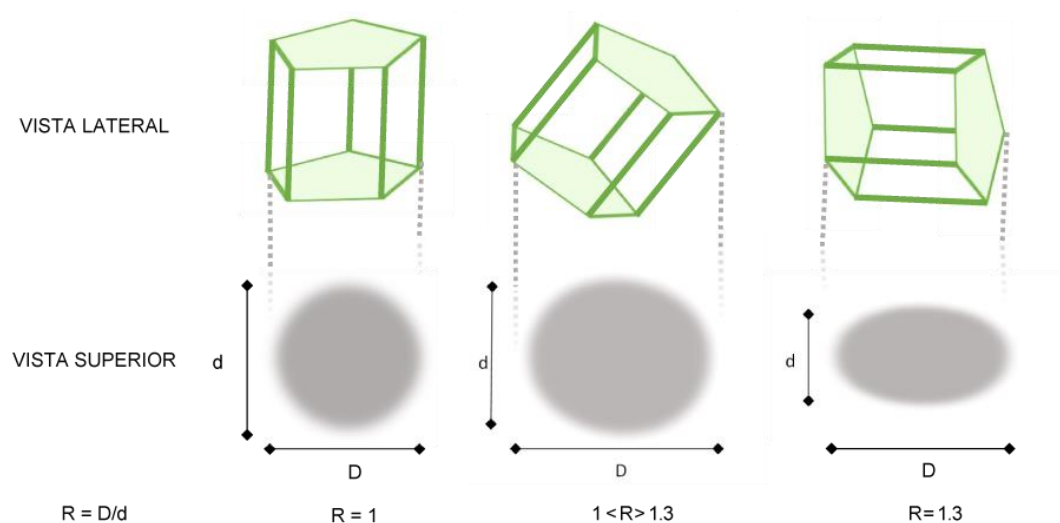


Figura 3. 15: Efecto de la orientación en Z de la proteína BLS sobre la forma de la nube de localizaciones observada por DNA-PAINT

Por otro lado, dado que el fluoróforo está unido a uno de los 5 monómeros, aun cuando la proteína esté paralela al sustrato, una rotación de la misma sobre su propio eje se vería reflejada en una variación sobre la proyección 2D de del ángulo del fluoróforo en el plano XY. Como ese ve en la Figura 3. 16, esta variación afecta más a ángulos grandes que a ángulos chicos. Consecuentemente, para ángulos grandes se podría encontrar experimentalmente una distribución grande de ángulos distintos que en realidad corresponden a la misma orientación.

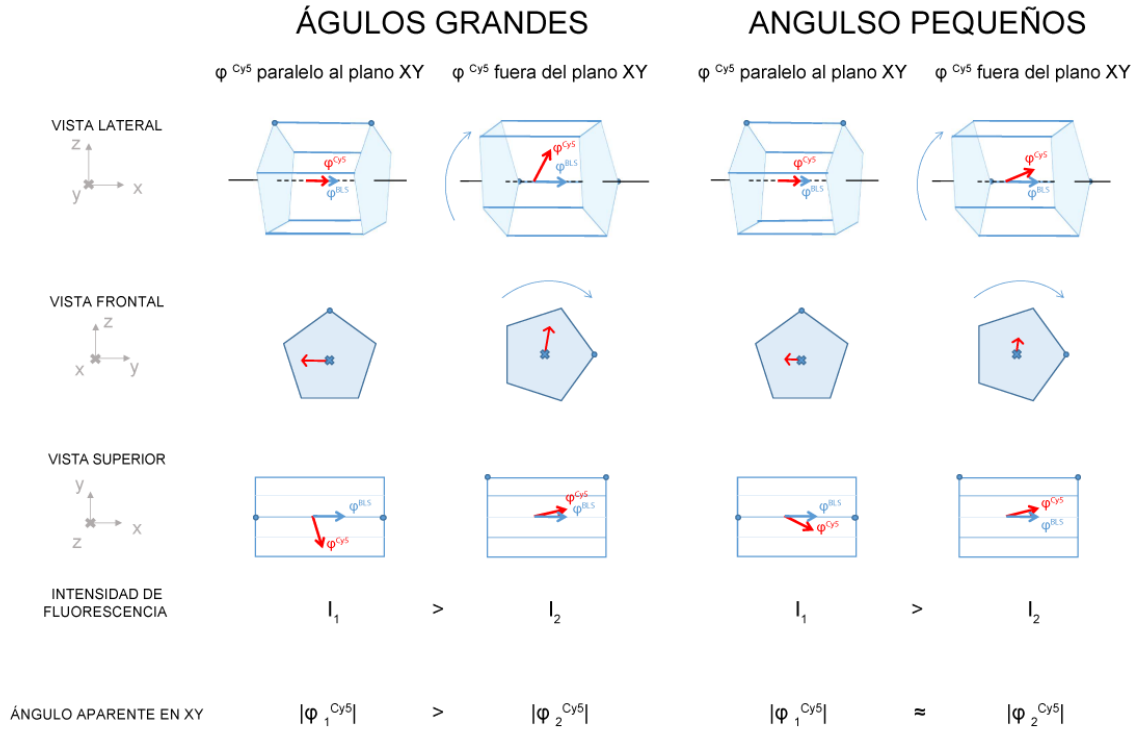


Figura 3. 16: Efecto de la rotación sobre su propio eje de partículas de BLS (azul) sobre el ángulo medido de Cy5 (rojo) para ángulos grandes (derecha) y chicos (izquierda). Se muestra Vistas lateral, frontal y superior.

Teniendo en cuenta estas observaciones decidimos aplicar 2 filtros a la selección de partículas a analizar. En primer lugar, seleccionamos partículas de DNA-PAINT cuya relación de aspecto (r) fuera mayor a 1.1, quedándonos así con aquellas que se encontraran lo más paralelo a la superficie posible. Se podría ser aún más estricto con este parámetro, pero esto va en detrimento de la cantidad de partículas disponibles para hacer estadística y obtener valores representativos. En segundo lugar, para los experimentos de polarización, seleccionamos aquellas trazas cuya intensidad máxima estuviera dentro de un desvío estándar de la intensidad máxima promedio de todas las trazas. Así, garantizamos eliminar las trazas de baja intensidad, que representan partículas en las que el fluoróforo se encuentra fuera del plano del sustrato y de la excitación de la luz. Nos quedamos entonces sólo con partículas en las que BLS y Cy5 se encuentran paralelas al plano del sustrato. De esta manera, los resultados obtenidos de la orientación 2D entre el fluoróforo y el

eje principal de la BLS resultan muestras confiables de esta orientación. Para cada una de estas partículas, se restó el ángulo obtenido en los experimentos de polarización (correspondiente a la orientación del fluoróforo) al ángulo obtenido por DNA-PAINT (correspondiente a la orientación de la proteína). Dado que lo que se está queriendo obtener es un ángulo entre dos vectores, cuyas orientaciones van de 0 a 180° (solo se puede conocer la dirección de cada vector, pero no su sentido), siempre se debe restar el de mayor modulo con el de menor módulo, siendo el resultado un ángulo de va de 0 a 90°.

Los resultados del análisis se pueden observar en la Figura 3. 17. Al graficar la distribución de ángulos relativos entre Cy5 y BLS, se encontró que dicha distribución no era homogénea, sino que existía picos de ángulos más poblados: $(35 \pm 16)^\circ$ y $(80 \pm 6)^\circ$. Esto es equivalente a decir que existen orientaciones preferenciales del fluoróforo dentro de esta proteína. Si se observan trazas individuales representativas de cada pico, se puede apreciar que, si bien los fluoróforos permanecen orientados alrededor de valores más o menos definidos, se pueden detectar en tiempo real pequeñas variaciones en la orientación del orden de los 20°. En la Figura 3. 17B se muestran los ejemplos de trazas de 2 partículas de BLS en las que se traduce la variación de intensidad a ángulos relativos adoptados por Cy5 dentro de BLS. La traza de la izquierda representa un claro ejemplo de la población que oscila alrededor de 80° mientras que la traza de la derecha representa un ejemplo en el que Cy5 se encuentra alrededor de 35° respecto a la proteína. En ambos casos se puede apreciar que, dada la precisión de la técnica, se pueden detectar sub-conformaciones: en el primer caso Cy5 parece alternar entre estar a 60° y estar a 80° y en el segundo caso se puede observar un barrido de orientaciones entre 0° y 40°. Esto último coincide con el hecho de que el pico de menores ángulos es más ancho que el segundo. Una posible explicación es que en estas conformaciones el fluoróforo tiene más grados de libertad para moverse, ya sea por menor impedimento estérico o por interacciones más débiles con los aminoácidos lindantes.

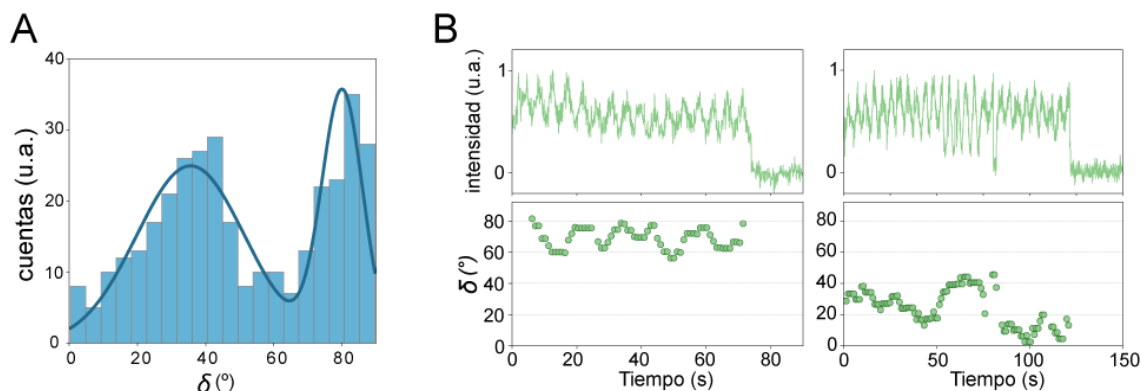


Figura 3. 17: (A) Distribución de ángulos relativos entre Cy5 y BLS (B) ángulo relativo entre Cy5 y BLS para dos partículas representativas de ambos picos principales. En los paneles superiores se observa las trazas de fluorescencia y en los inferiores los algunos obtenidos. En los mismo se ve en tiempo real las pequeñas variaciones en la orientación de los fluoróforos. El número total de partículas analizadas fue 12 y el número de ajustes totales 341.

Dinámicas moleculares y comparación con resultados experimentales

Resulta interesante comparar las orientaciones de Cy5 dentro de BLS obtenidas experimentalmente con simulaciones de dinámica molecular. Esta parte del trabajo fue realizada junto a Juan Manuel Prieto y Marcelo Martí del laboratorio de bioinformática del instituto IQUIBICEN. Cy5 es un fluoróforo que puede transicionar dinámicamente entre dos conformaciones isoméricas. Las simulaciones de dinámica molecular clásica no permite incluir la isomerización cis-trans, puesto que este tipo de movimiento implica ruptura y formación de los enlaces en una nueva configuración. Dado que solo el isómero *trans* de Cy5 es fluorescente, las simulaciones se realizaron para esta conformación. El enlace maleimida-tiol con la cisteína 88 se modeló *in silico* a partir de la estructura cristalográfica de la proteína y de Cy5. Con el fin de evaluar las configuraciones iniciales del fluoróforo dentro de BLS, se realizó un estudio de docking que arrojó 2 conformaciones más probables. Teniendo estas conformaciones iniciales equiprobables se eligió una y se corrieron 3 dinámicas moleculares con condiciones iniciales diferentes, de una duración de

100 ns. Todas las dinámicas mostraron una movilidad bastante restringida. Calculamos el ángulo diédrico (γ) dado por cuatro coordenadas: dos puntos que definen el eje principal de la estructura decamérica BLS (centros de masas de cada pentámero) y dos puntos que definen el sistema conjugado (dipolo de absorción) de la molécula Cy5 (Figura 3. 18).

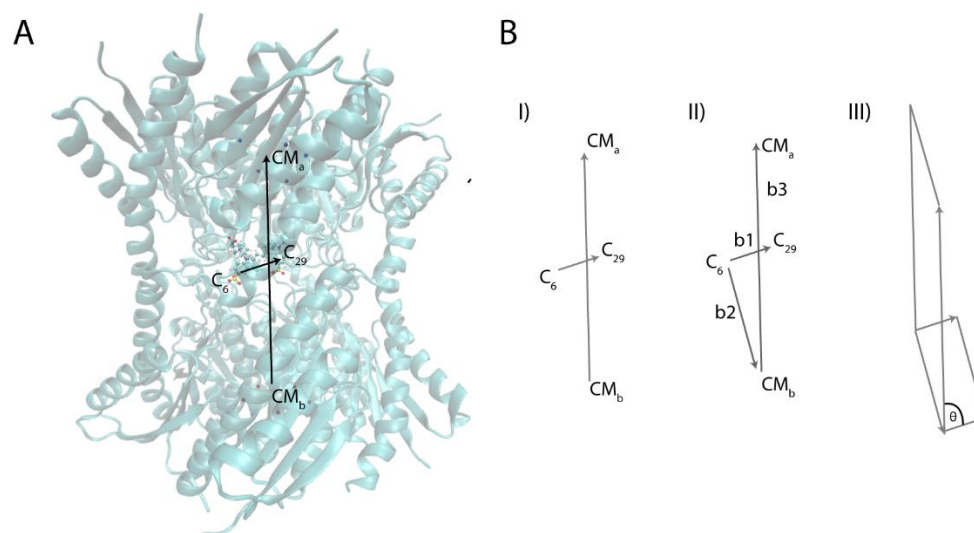


Figura 3. 18 (A) Representación del decámero BLS, donde los cinco átomos de carbono utilizados para definir CMA están marcados en azul y los utilizados para definir CMB están marcados en rojo. También se destacan los átomos de carbono utilizados para definir la dirección del dipolo de absorción de Cy5 (C6 y C29). (B) Esquema que muestra cómo se conectan las cuatro coordenadas para definir el ángulo diédrico (γ).

La Figura 3. 19 muestra la distribución de γ de una de las simulaciones. Se encontraron cuatro orientaciones preferenciales, centradas en $47^\circ \pm 2^\circ$, $75^\circ \pm 1^\circ$, $115^\circ \pm 1^\circ$ y $150^\circ \pm 1^\circ$ (las incertidumbres reportadas reflejan los errores en los valores medios de cada distribución determinados usando un ajuste a una función gaussiana). Para comparar estos resultados con los experimentos, es necesario contraer la distribución de γ al rango de 0° - 90° calculando los ángulos agudos (a este ángulo lo llamamos δ_{MD}). Cuando se hace esto, sólo quedan dos picos, centrados en $31^\circ \pm 3^\circ$ y $74^\circ \pm 3^\circ$. Para las otras dos simulaciones, los histogramas de δ_{MD} mostraron dos picos centrados en $37^\circ \pm 3^\circ$ y $77^\circ \pm 1^\circ$ en un caso y un solo pico en $77^\circ \pm 1^\circ$ en el otro.

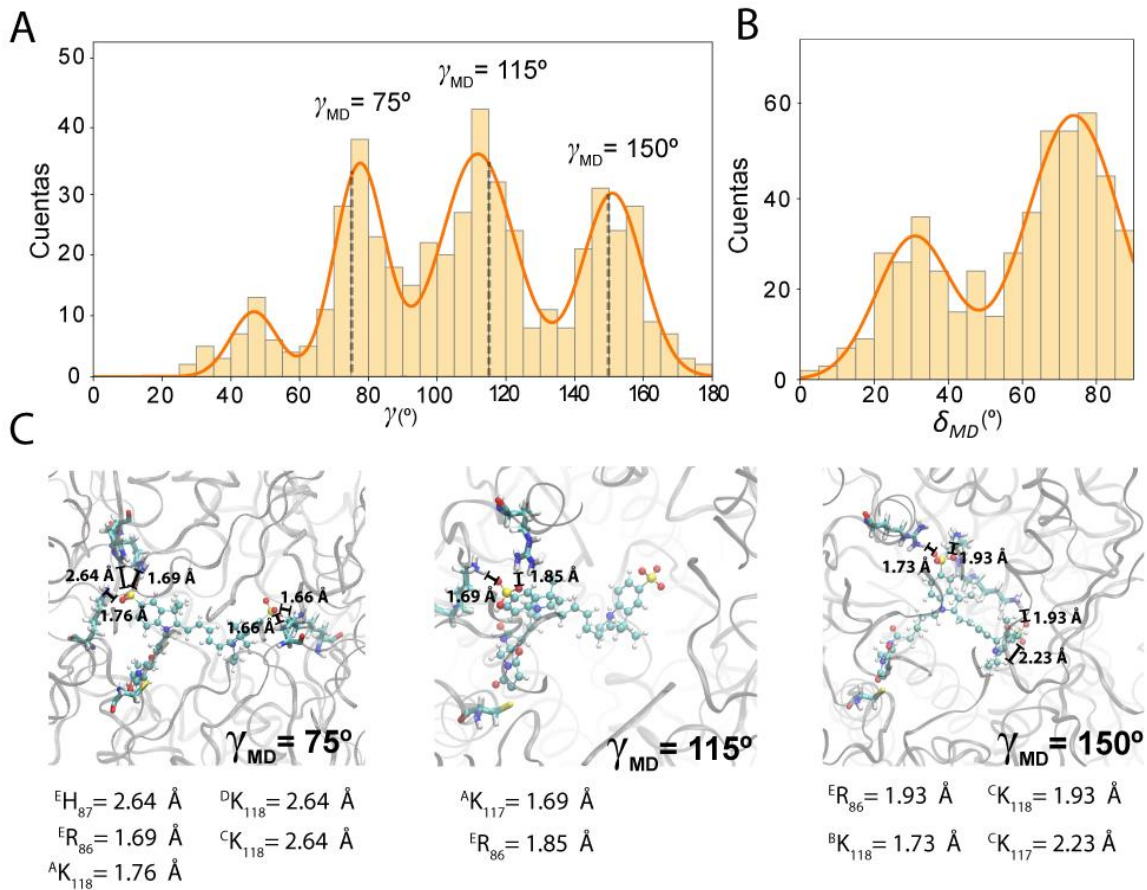


Figura 3. 19: Resultados de Dinámica molecular clásica de Cy5 unido a BLS. (A) Distribución de ángulos relativos entre Cy5 y BLS por MD (γ). Los picos principales se ajustan a distribuciones gaussianas (B). histograma de los ángulos diédricos colapsados en el rango de 0°-90° (δ_{MD}), junto con un ajuste gaussiano de dos picos. (C) ampliación de Cy5 y su entorno proteico en 3 momentos representativos. Se muestran los aminoácidos a una distancia menor a 8 Å de Cy5. El superíndice presenta la cada de cada aminoácido y el subíndice la posición dentro de cada cadena.

La notable concordancia entre las orientaciones encontradas *in-silico* y en los experimentos valida la identificación de las interacciones más relevantes presentes en las conformaciones estables. Analizamos los aminoácidos de BLS que están a menos de 8 Å del fluoróforo. En la Figura 3. 19C, mostramos imágenes representativas de las simulaciones para las tres conformaciones estables de Cy5 encontradas *in-silico* y experimentalmente (la conformación con $\delta_{MD} \approx 45^\circ$

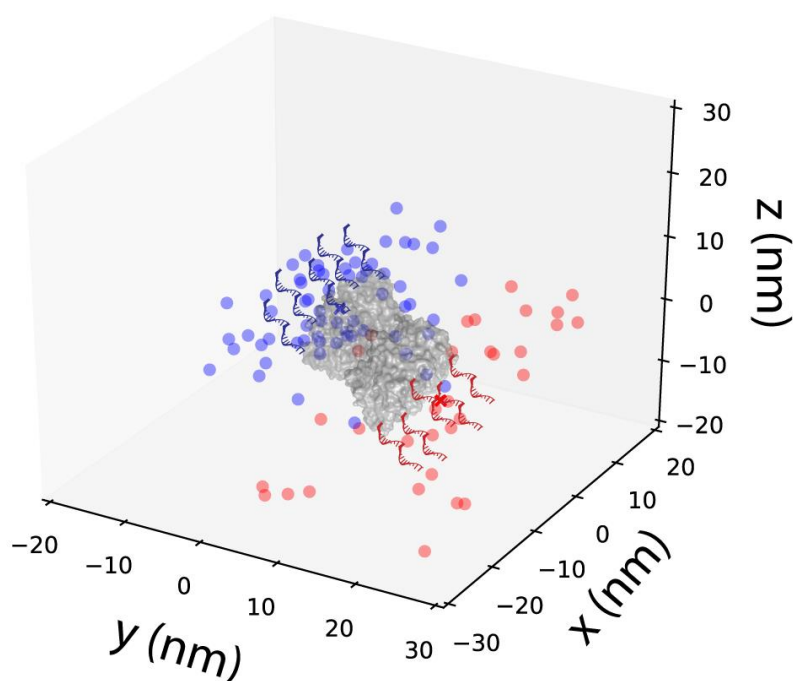
corresponde a $\delta \approx 45^\circ$ y no se observa experimentalmente). Sorprendentemente, algunos de los aminoácidos circundantes muestran orientaciones y distancias compatibles con puentes de hidrógeno formados con los sulfonatos de Cy5. La comparación con las simulaciones muestra que la conformación observada experimentalmente con $\delta \approx 30^\circ$ ($\delta_{MD} = 150^\circ$) se establece mediante tres enlaces de hidrógeno que involucran ambos sulfonatos del Cy5. La conformación con $\delta \approx 65^\circ$ se correlaciona con dos conformaciones encontradas *in-silico* con frecuencia similar, una que involucra enlaces de hidrógeno con ambos sulfonatos ($\delta_{MD} \approx 75^\circ$) y la otra deja un sulfonato libre ($\delta_{MD} \approx 115^\circ$).

Conclusiones parciales

En este capítulo hemos demostrado cómo la nanoscopía de fluorescencia en combinación con mediciones de orientación de una sola molécula proporciona un nuevo enfoque potente y versátil para estudiar aspectos estructurales de las interacciones entre biomoléculas y moléculas pequeñas. La metodología se lleva a cabo en un microscopio de fluorescencia de campo amplio convencional, funciona en condiciones fisiológicamente compatibles y da acceso a transiciones dinámicas entre conformaciones. Al contrastar las orientaciones obtenidas experimentalmente con las simulaciones, es posible identificar conformaciones que ocurren naturalmente y las interacciones que las estabilizan. Si bien nos centramos en las conformaciones de una molécula pequeña con grupos sulfonato dentro de una cavidad proteica, las aplicaciones potenciales van mucho más allá. Por ejemplo, la identidad y las posiciones de los grupos funcionales, así como el tamaño de la molécula pequeña, pueden variarse para sondear diferentes entornos proteicos. Se podrían utilizar otras proteínas y también se puede aplicar la ingeniería de proteínas para probar interacciones con residuos de aminoácidos específicos. Si bien en este caso el fluoróforo está unido covalentemente a la proteína huésped, este enfoque también podría aplicarse a sistemas en los que el tinte fluorescente se une transitoriamente a una bolsa específica de una proteína. Implementaciones futuras mejoradas podrían incluir métodos de localización de una sola molécula más

precisos, como como RESI²¹³, MINFLUX²¹⁴ y métodos relacionados, así como técnicas para medir la orientación tridimensional de una sola molécula.

CAPÍTULO 4: MEDICIÓN DE DISTANCIAS INTRAMOLECULARES EMPLEANDO NANOSCOPIÁS CON RESOLUCIÓN SUB-10 NM EN 3D



Colaboración: Alan Szalai, Lucía Lopez y Luciano Masullo (RESI y SIMPLER)

Nanoscopías con resolución sub-10 nm

En condiciones ambientales o biológicamente compatibles, las nanoscopías de primera generación alcanzan una resolución típica de 20 a 40 nm debido principalmente a la fotoestabilidad limitada de los fluoróforos²⁶. Este límite experimental de resolución ha motivado el desarrollo de una segunda generación de métodos de nanoscopía de fluorescencia que llegan a resoluciones en el rango de 1 a 10 nm, alcanzando el tamaño típico de las proteínas y proporcionando resolución molecular^{213–217}. Conceptualmente, hay dos formas posibles de eludir la limitación impuesta por la fotoestabilidad: obtener más fotones de fluorescencia de una posición determinada en la muestra o extraer más información del número limitado de fotones. Recientemente, ambas estrategias han sido exploradas con éxito, permitiendo alcanzar resoluciones inferiores a los 10 nm. Entre los métodos que obtienen más información a partir de un número limitado de fotones se destacan MINFLUX y sus técnicas derivadas^{213,214,217–219}. Por otro lado, DNA-PAINT y sus derivados^{179,180,206,207} es la principal técnica que permiten obtener más fotones de una dada posición. Recientemente un trabajo ha logrado resolver mediante DNA-PAINT distancias intramoleculares de 6 nm introduciendo en la secuencia proteica aminoácidos no naturales²²⁰.

El método RESI (resolución mediante imágenes secuenciales, por sus siglas en inglés), derivado de DNA-PAINT permite llegar hasta una resolución de 1 nm²¹³. El mismo se basa en ajustar el centro de un conjunto de localizaciones que pertenecen a un mismo blanco (Figura 4. 1). Cuando dos o más puntos no se pueden distinguir claramente usando SMLM, se generan distribuciones de localizaciones que se superponen, lo que dificulta la asignación precisa de cada localización a su sitio blanco correspondiente. No obstante, si fuera posible medir cada blanco específico usando un color o algún otro marcador molecular, entonces se podría realizar la agrupación por separado sin confusiones (Figura 4. 1A). Esto puede lograrse experimentalmente empleando la técnica conocida como “Exchange-PAINT”^{221,222} en la cual se utilizan secuencias de ADN ortogonales combinados con ciclos de imágenes y lavado para permitir el multiplexado secuencial de sitios objetivo.

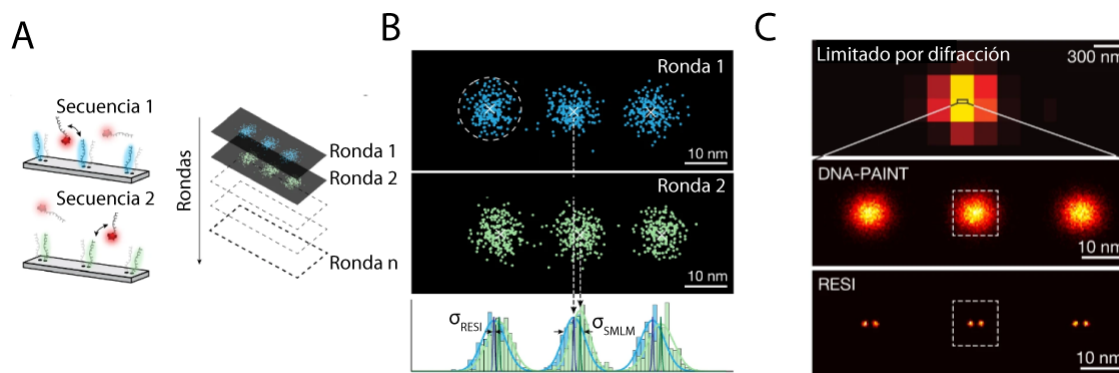


Figura 4. 1 Fundamentos del método RESI. (A) esquema experimental en el cual se realiza SMLM (en este caso DNA-PAINT) de manera secuencial para los distintos blancos. (B) una vez obtenidas las localizaciones, se estima el centro de cada cluster de cada ronda con una precisión mucho mayor a la de SMLM. (C) Comparación de las imágenes obtenidas por campo amplio, DNA-PAINT y RESI para una muestra de un origami con dos blancos distanciados a 2 nm entre sí. (Adaptado de Masullo et al 2023)

Por otro lado, la resolución axial (comúnmente llamada resolución en eje Z) en las nanoscopías de fluorescencia es a menudo de 2 a 5 veces peor que la resolución lateral (resolución en XY)²⁶. Hasta la fecha, sólo un pequeño grupo de técnicas han podido lograr resoluciones axiales en el rango de 1 a 10 nm. Algunas, como la detección interferométrica de moléculas individuales en la configuración 4Pi^{223–225} y 3D MINIFLUX²²⁶ permiten alcanzar una resolución axial de alrededor debajo de 10 nm, pero a expensas de una alta complejidad técnica. Otras lo hacen aprovechando las propiedades del sustrato, empleando el fenómeno de transferencia de energía a un film metálico (MIET)^{227,228} a grafeno (GET)^{229,230}. Finalmente, SIMPLER²¹⁶ (localización fotométrica z de microscopía de iluminación supercrítica con resolución mejorada, por sus siglas en inglés) es una técnica capaz de alcanzar una resolución axial mejor que 10 nm con un microscopio de reflexión interna total (TIR) convencional, mediante la calibración de la señal dependiente de z de emisores individuales considerando la excitación a través del campo evanescente y la modulación del patrón angular de emisión por la interfaz. La estimación en Z de un emisor depende en este caso de una calibración previa realizada con dicho emisor depositado directamente en la superficie del portaobjetos (Figura 4. 2). De esa medición es posible obtener el número de fotones en la superficie (N_0). Mediante un

método teórico (Figura 4. 2) se llega a una dependencia del número de fotones respecto a la posición en z , empleando dos constantes (α_F y d_F) que pueden ser calculadas a partir algunos parámetros tales como la longitud de onda de excitación (λ), el ángulo de incidencia (θ) y la apertura numérica del objetivo (NA).

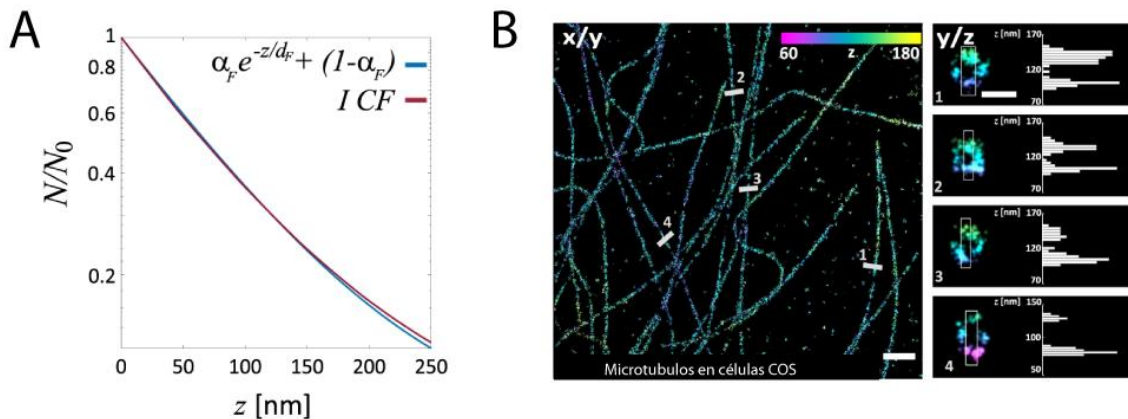


Figura 4. 2: (A) Señal de fluorescencia en función de z (representada en escala logarítmica) de moléculas individuales expresada como la relación entre el número de fotones detectados en una posición z dada (N) y el número de fotones de un emisor idéntico colocado en $z = 0$ (N_0). α_F y d_F son parámetros dependientes de las condiciones experimentales. (B) Microtúbulos en células COS-7. Izquierda: vista superior. Derecha: vistas laterales ampliadas a lo largo de las líneas numeradas en la vista superior, junto con el perfil axial de las áreas enmarcadas. Las vistas superior y lateral tienen la misma escala de color z . (Adaptado de Szalai et al. 2021)

Uso de nanoscopías para biología estructural

La resolución alcanzada por estas nuevas técnicas de nanoscopía habilita el uso de microscopías de súper-resolución para responder preguntas no sólo en el campo de la biología celular sino también en el campo de la biología estructural. La biología estructural ha avanzado a pasos agigantados en las últimas décadas, en parte por los avances experimentales y en parte por la aparición de programas predictivos basados en Inteligencia Artificial tales como AlphaFold2 o RoseTTAFold²³¹. Hoy en día es común combinar varias técnicas para tener información estructural más completa. Incluso la información proveniente de una técnica puede servir para refinar la interpretación de los datos obtenidos con otra. A este enfoque se lo llama

“biología estructural integrativa”²³². Las técnicas clásicas de biología estructural se pueden clasificar en dos grandes grupos según el tipo de resolución:

- a. Técnicas de alta resolución, las cuales permiten obtener información atómica con resoluciones incluso menores a 1 Angstrom. Entre ellas se puede nombrar cristalografía de rayos X, Crio-microscopía electrónica (Cryo-EM) y Resonancia magnética nuclear. A pesar de la resolución atómica, la mayoría de ellas tienen la desventaja de precisar equipamiento costoso y condiciones de medición muy diferentes a las naturales.
- b. Técnicas de baja resolución (mayor a 10 nm), las cuales tienen menor complejidad y permiten obtener información del tipo: dimensiones, forma, estado de oligomerización, volumen y peso molecular. Entre ellas se puede nombrar las técnicas basadas en dispersión de luz (DLS, SLS, SAXS y SANS).

Con excepción de Cryo-EM, ninguna de estas técnicas se basa en estudios de moléculas individuales, y consecuentemente en todos los casos lo que se obtiene es una señal promedio de la muestra. Incluso en el caso de Cryo-EM se necesita promediar la señal de muchas partículas para poder tener resoluciones deseadas. Un caso particular son las técnicas basadas en FRET, las cuales dan idea de distancias típicamente menores a 10 nm, aunque no dan información respecto a posiciones exactas (ver capítulo 2). Dentro de estas, existe una combinación con microscopías de molécula única denominada smFRET que puede dar información estructural dinámica, muy útil a la hora de estudiar interacciones, cambios conformacionales, etc^{194,196,198,199}.

La ventaja de emplear nanoscopías para resolver preguntas de biología estructural, radica en que las mismas permiten obtener información a nivel de moléculas o partículas individuales y en condiciones compatibles con la vida (en solución y a temperatura ambiente). Esto permite tener información más allá del promedio de ensamble, como detectar sub-poblaciones, o incluso obtener información dinámica, como se mostró en el capítulo 3.

Tanto RESI como SIMPLER son técnicas con resolución nanométrica que podrían ser empleadas para el estudio de distancias intramoleculares en proteínas. Hasta ahora las mismas han sido puestas a prueba en Origamis de ADN y en algunas estructuras proteicas modelo (anillos de espectrina, complejos de poro nuclear y microtúbulos en el caso de SIMPLER y receptores de membrana CD20 en el caso de RESI) y nunca han sido combinadas para obtener resoluciones sub-10 nm en 3 dimensiones.

En el capítulo anterior se mostró las limitaciones que presenta DNA-PAINT para medir distancias (en nuestro caso, orientaciones) en una proteína como BLS. La incorporación de RESI+SIMPLER podría resolver estas limitaciones y obtener información sobre las distancias y orientaciones de BLS.

El objetivo de este capítulo es entonces aprovechar las herramientas desarrolladas durante esta tesis en control del ensamblado de BLS para medir distancias intramoleculares y orientaciones en 3D combinando RESI y SIMPLER.

Diseño molecular y ensamblado de la muestra

Para resolver distancias con RESI, es necesario marcar con 2 secuencias de *docking* diferentes los extremos de BLS. Utilizamos dos secuencias para DNA-PAINT repetitive empleadas en trabajos anteriores (Figura 4. 3A) y optimizadas para aumentar 5 veces la frecuencia de eventos por unidad de tiempo²³³. La desventaja de esta estrategia para aplicaciones de biología estructural es que las secuencias repetitivas son más largas. En consecuencia, las distancias medidas por RESI serán algo mayores que las cristalográficas (Figura 4. 3C). Las hebras *imager* complementarias a ambas secuencias se encuentran conjugadas al mismo fluoróforo, Cy3B (Figura 4. 3B).

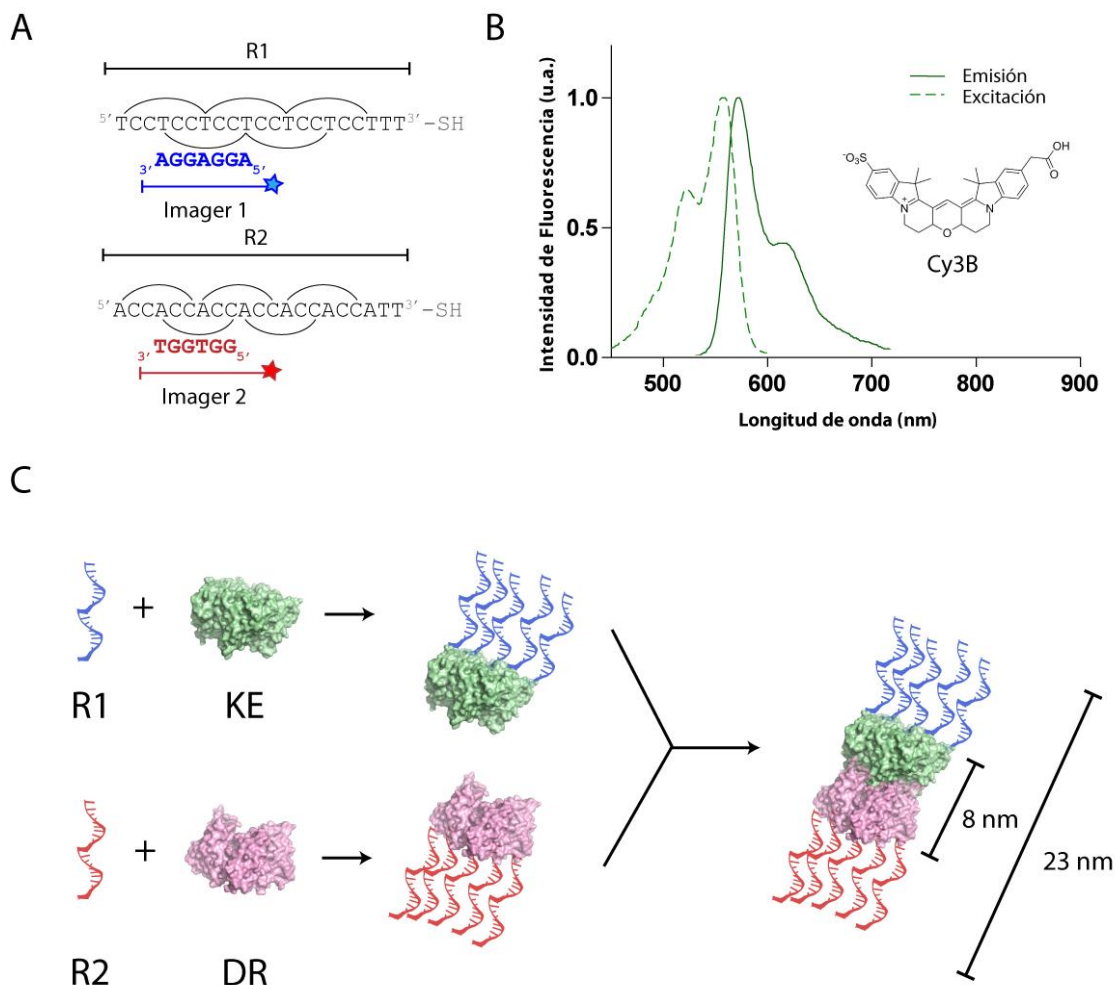


Figura 4. 3 (A) Par de hebras de docking (R1 y R2) e Imagers (Im1 e Im2) empleados para RESI, se marcan con arcos los sitios repetitivos de unión de cada Imager a su hebra complementaria. (B) espectro de excitación, emisión y estructura molecular de Cy3B. (C) Estrategia de ensamblado de BLS para resolución de distancias intramoleculares por RESI.

Para marcar los extremos de BLS, hemos diseñado un protocolo de marcación en dos pasos:

- 1) Se marca cada pentámero en sus extremos N-terminales con una secuencia *docking* diferente (R1 para el pentámero KE y R2 para DR), como muestra la Figura 4. 3C. El protocolo de marcación empleado es el mismo descrito en los capítulos 2 y 3. Brevemente, se emplea un adaptador que tiene un grupo funcional que reacciona con aminos primarias de la proteína de un lado y otro

grupo que reacciona con los tioles de los oligonucleótidos de las secuencias *docking*. La marcación se realiza de manera secuencial: en un primer paso se hace reaccionar exceso de adaptador con la proteína, luego se filtra el excedente de adaptador y se hace reaccionar con exceso de oligonucleótidos. Luego se purifica la proteína y se monitorea mediante espectroscopia de absorbancia. Los resultados de la marcación se muestran en la Figura 4. 4. En la misma se puede observar un corrimiento espectroscópico en la proteína cuyo máximo de absorbancia se corre del 280 nm a 260 nm, típico de hebras de ADN. Dado que la absorción molar del ADN es mayor a la de las proteínas, el espectro obtenido termina siendo muy parecido al del primero.

- 2) Se ensambla el decámero, co-incubando los resultados de ambas marcaciones (KE-R1 y DR-R2) en proporciones equimolares.

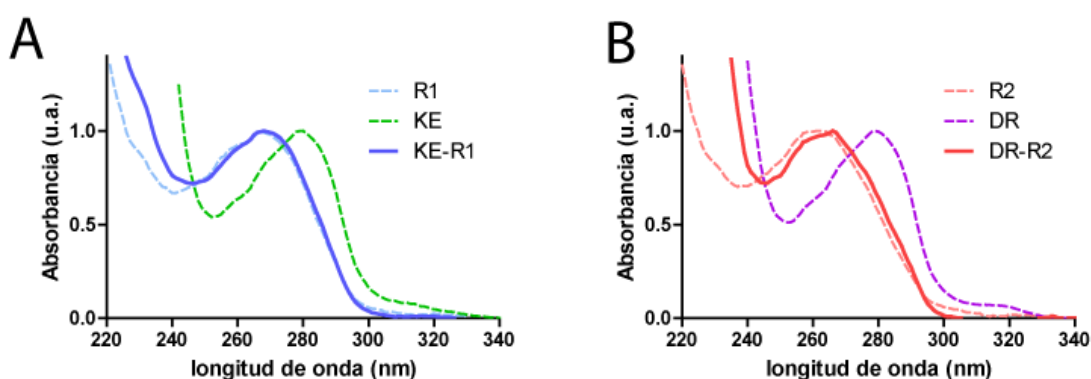


Figura 4. 4: Resultado de ensamblado de Pentámeros (A) KE con R1 y (B) DR con R2, monitoreados por espectroscopía de absorbancia

Medición de BLS por RESI+SIMPLER

La muestra es diluida lo suficiente como para ver partículas individuales sobre un portaobjetos (concentración 10-100 pM). Las mismas son inmovilizadas sobre el vidrio mediante interacción electrostática con un polímero de carga positiva (PDDA)

que recubre dicho portaobjetos. La muestra es revelada primero con *Imager1*, luego lavada sin mover la muestra del microscopio y finalmente revelada con *Imager2* (Figura 4. 5A). En ambos casos la concentración de *imager* es de 0,5 nM, la duración de cada cuadro fue 100 ms, el tiempo de adquisición es de 30 minutos y la muestra es excitada con un láser de 532 nm a una potencia de 8 mW.

Los videos son procesados con el software PICASSO¹⁷⁹ para encontrar las localizaciones y las imágenes de súper-resolución obtenidas para cada *Imager* son superpuestas para identificar casos de co-localización (Figura 4. 5B). Esto se hizo primero de manera manual para analizar casos individuales y luego de manera automática mediante un algoritmo de primeros vecinos.

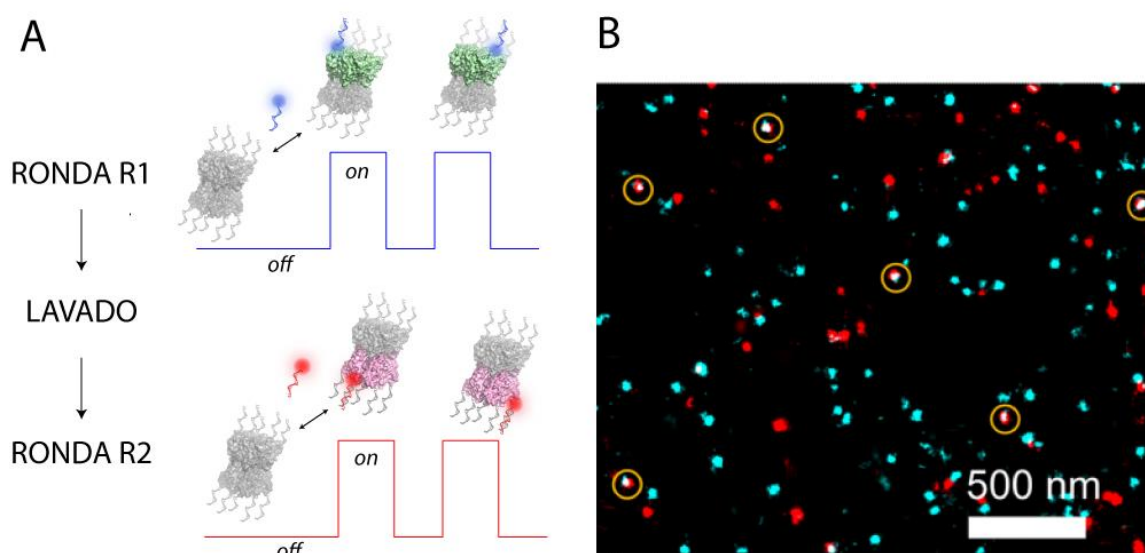


Figura 4. 5: (A) Esquema conceptual de medición secuencial de BLS con *Im1* e *Im2* (B) superposición de imágenes de súper-resolución de partículas de BLS reveladas secuencialmente con *Im1* e *Im2*.

Para cada clúster obtuvimos la posición en X e Y de su centro por RESI y la posición en Z por SIMPLER. En todos los casos la precisión (calculada como desvío estándar) en Z fue de 2-3 nm y en XY de 1-2 nm. Los pasos para este análisis, así

como la calibración de SIMPLER se pueden leer en la sección de materiales y métodos.

Posteriormente realizamos un análisis de primeros vecinos: para R1 buscamos el clúster más cercano de R2 y lo mismo a la inversa. En la Figura 4. 6 se puede observar un pico pronunciado a unos 15 nm, seguido de una distribución ancha de vecinos a mayores distancias. El primer pico refleja todas las partículas decaméricas, mientras que el segundo es un número no menor de partículas en estado pentamérico. Una posible explicación de la existencia de tantas partículas en estado pentamérico es que la dilución, la cual se encuentra en el orden picomolar, esté por debajo de la K_d de formación del decámero, favoreciéndose así la disociación del mismo. En este sentido, esta técnica podría emplearse adicionalmente para estimar la K_d de formación de estructuras cuaternarias. Esto podría lograrse realizando el experimento a distintas concentraciones de proteína y cuantificando el número de decámeros en relación al número total de pentámeros.

Dado que las hebras *docking* poseen varios sitios de unión para las hebras *imager* (Figura 4. 3), la distancia euclídea observada entre los polos de BLS debería ser una distribución entre 8 y 18 nm, con un promedio de 13 nm. Esto está en consonancia con los 15 nm observados en el análisis de primeros vecinos.

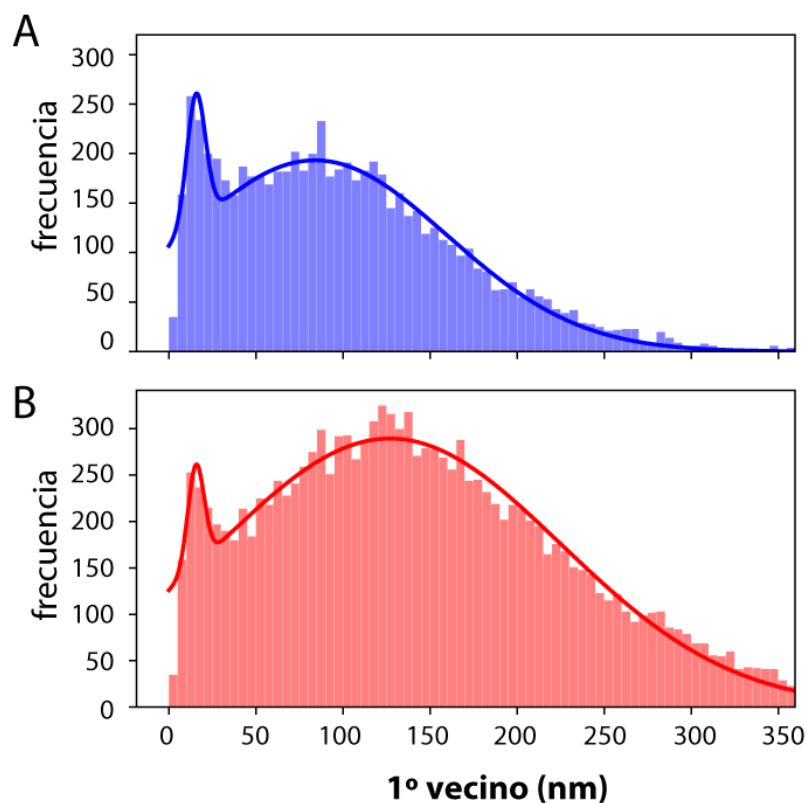


Figura 4. 6 Histogramas de distribución de primeros vecinos de (A) R1 respecto a R2 y (B) R2 respecto a R1. Los datos fueron ajustados a la suma de dos gaussianas. en ambos casos se observa un primer pico centrado en 15,5 nm.

Asumiendo que BLS se puede ubicar en todas las orientaciones posibles sobre el vidrio, a partir de la distancia XY entre clusters o la distancia en Z, es posible estimar la orientación de cada partícula, el mínimo de distancia XY (o máximo de Z), correspondiente a BLS “parada” (Figura 4. 7A) y el máximo de distancia XY (o el mínimo de Z) correspondiente a BLS “acostada” (Figura 4. 7C), pasando por todas las situaciones intermedias (Figura 4. 7B).

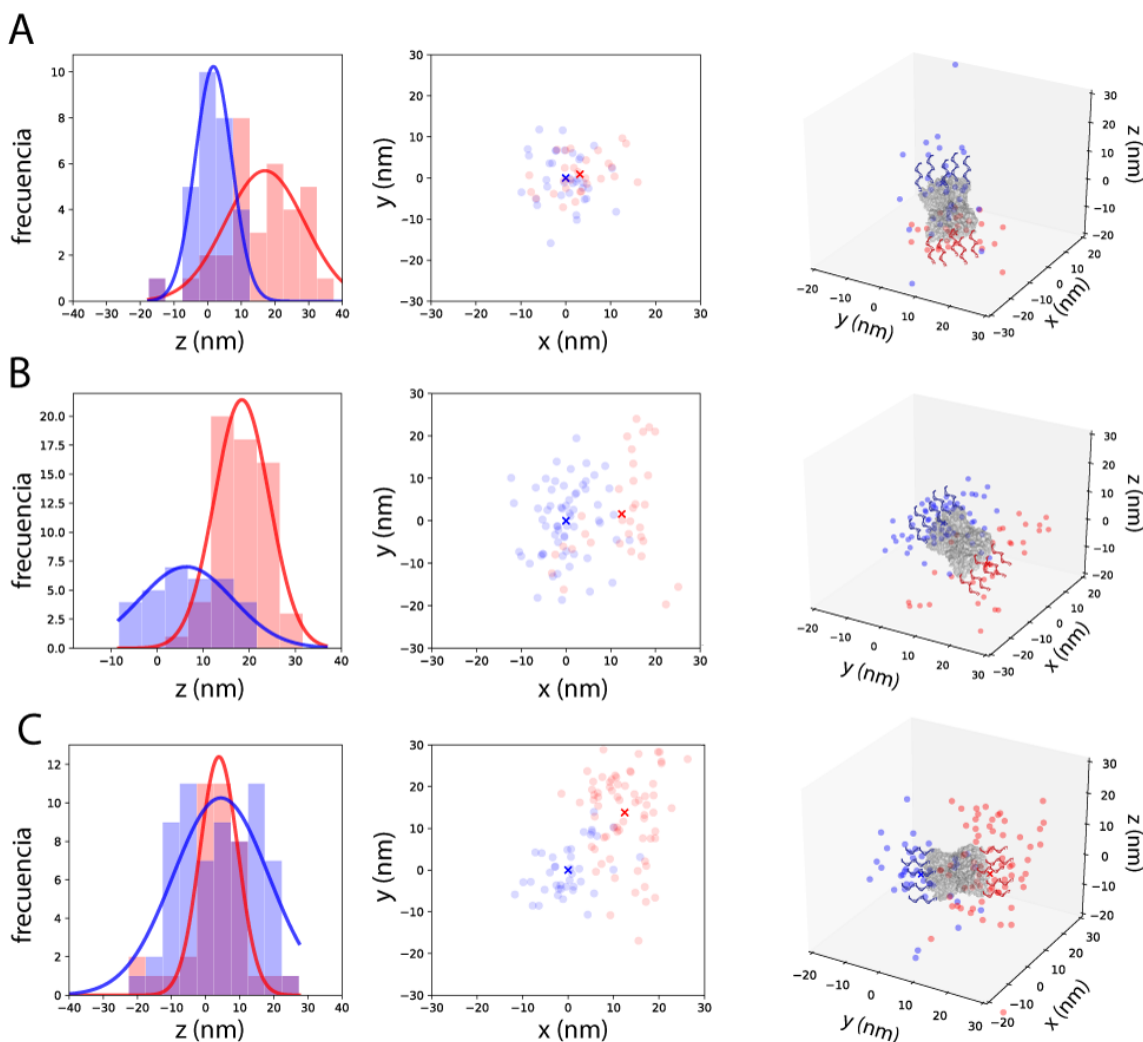


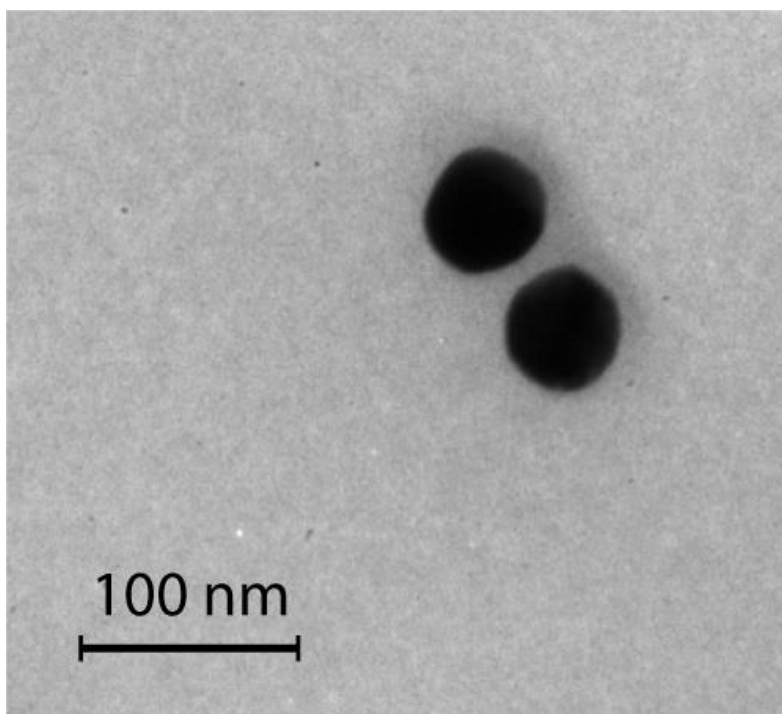
Figura 4. 7: Ejemplos de localizaciones de R1 (azul) y R2 (rojo) en 3D de partículas individuales de BLS. (A) par una partícula parada; (B) para una partícula en diagonal y (C) para una partícula acostada. En los 3 casos, de izquierda a derecha se muestran un histograma de distancias de localizaciones de R1 y R2 en Z respecto al centro de masas de R1 obtenidas por SIMPLER; localizaciones en XY obtenidas para R1 y R2 respecto al centro de masas de R1; y localizaciones en XYZ obtenidas para R1 y R2 respecto al centro de masas de R1. En todos los casos se muestra con una x el centro obtenido por ajustes gaussianos en 1D, 2D o 3D, respectivamente.

Conclusiones Parciales

En este capítulo hemos empleado por primera vez una combinación de 2 técnicas de super-resolución para medir distancias intramoleculares de una proteína con una

resolución de 1-3 nm en XYZ y determinar la orientación de partículas individuales de BLS respecto a la superficie soporte. Cabe destacar que las técnicas empleadas (RESI+SIMPLER) fueron realizadas en condiciones compatibles con la vida (en solución y a temperatura ambiente) y en un set-up de baja complejidad instrumental (microscopio de fluorescencia de campo amplio equipado para medir en TIR). Esto abre la posibilidad a aplicaciones en biología estructural, complementarias a las técnicas tradicionales de este campo. En particular, estas mediciones permitirían mejorar los resultados obtenidos en el capítulo 3 de determinación de la orientación de BLS respecto al portaobjetos.

CAPÍTULO 5: BLS COMO ANDAMIAJE DE OLIGÓMEROS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO



Colaboración: María Laura Cerutti (DLS), Ianina Violi y Luciana Martínez (Impresión óptica, SEM y TEM)

Propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas

Las Nanopartículas (NPs) metálicas tiene la particularidad de poder interactuar con el campo electromagnético gracias a un fenómeno denominado resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR, por sus siglas en inglés)^{234,235}. En los metales, los átomos se organizan en una red cristalina de núcleos cargados positivos y un mar de electrones deslocalizados capaces de moverse libremente por la red. Cuando una nanopartícula metálica es iluminada, el campo electromagnético de la luz induce una oscilación coherente colectiva de los electrones libres (electrones de la banda de conducción) del metal. Ésta causa una separación de carga con respecto a la red iónica, formando un dipolo a lo largo de la dirección del campo eléctrico de la luz (Figura 5. 1A). La amplitud de la oscilación alcanza su máximo en una frecuencia específica, llamada resonancia plasmónica superficial localizada (LSPR). La LSPR induce una fuerte extinción de la luz incidente y, por lo tanto, puede ser medida utilizando un espectrómetro UV-Vis (Figura 5. 1B). Este fenómeno ocurre principalmente para nanopartículas de metales nobles, especialmente Au y Ag, en los cuales las resonancias plasmónicas pueden ajustarse en la zona visible e infrarrojo cercano del espectro. La intensidad y longitud de onda de las LSPR dependen de los factores que afectan la densidad de carga electrónica en la superficie de la nanopartícula, como el tipo de metal, el tamaño, (Figura 5. 1B), la forma (Figura 5. 1C), y la constante dieléctrica del medio circundante, tal como se describe teóricamente por la teoría de Mie^{236–238}. Debido a la LSPR, la absorción y la dispersión de moléculas en las inmediaciones de una nanopartícula se pueden potenciar²³⁹ entre 5 y 6 órdenes de magnitud para la mayoría de las moléculas orgánicas que absorben la luz y las moléculas fluorescentes^{235,240–242}, respectivamente.

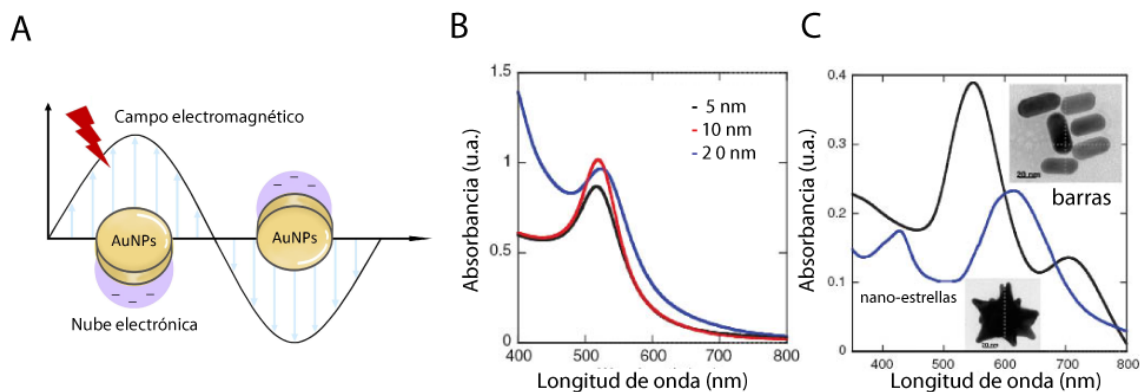


Figura 5. 1: (A) Esquema representativo de la oscilación del plasmón superficial localizado de una nanopartícula de oro. (B) espectros de extinción de nanopartículas esféricas de oro de diferentes tamaños (C) espectros de absorción de nanopartículas de oro de diferentes formas (adaptada Spadavecchia et. al 2013)

Estrategias para el ordenamiento espacial de nanopartículas y fluoróforos

Conociendo las propiedades emergentes de la interacción entre la luz y partículas plasmónicas con fluoróforos ha surgido una prolífica producción de trabajos en los que se muestran diversas estrategias para organizar en 1, 2 y 3 dimensiones diversas combinaciones de nanopartículas y fluoróforos (Figura 5. 2). Entre ellas la estrategia *bottom up* más versátiles son las basadas en origamis de ADN^{243,244} aunque también existen algunos ejemplos en los que se usan cápsides virales²⁴⁵ u otras estructuras proteicas²⁴⁶ a modo de andamiaje. Estas estrategias de ensamblado jerárquico abren la posibilidad de diseñar nano-estructuras muy diversas con posibles aplicaciones en el diseño de dispositivos plasmónicos para el sensado de sustancias⁴⁴, captación, transformación y transmisión de energía^{50,247}, entre otros.

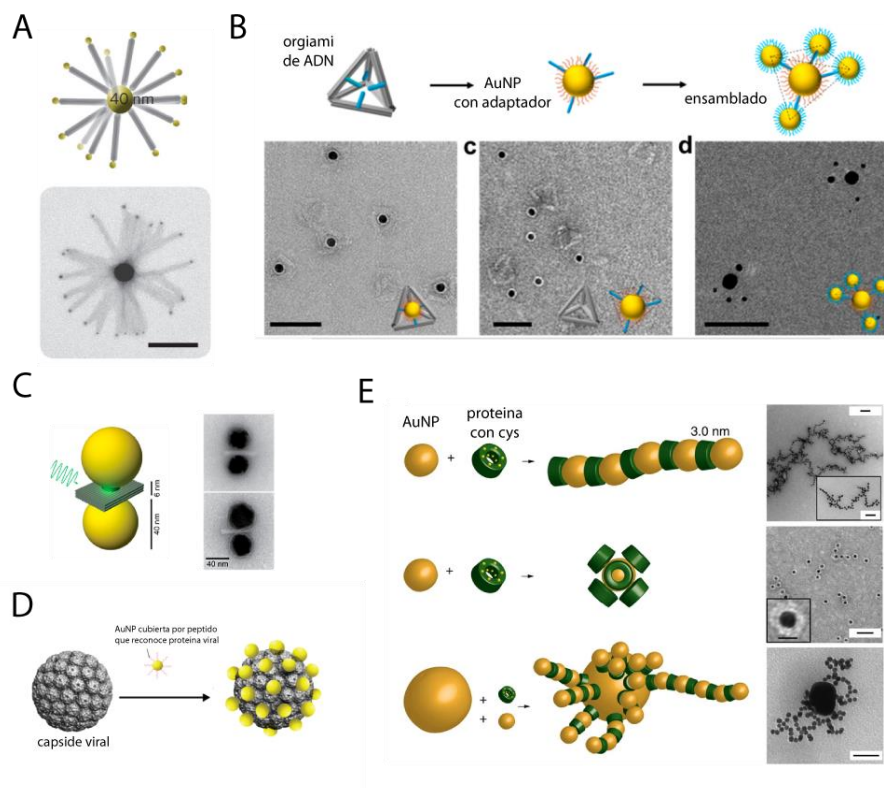


Figura 5. 2: Uso de biomoléculas para el ordenamiento espacial de nanopartículas de oro. (A) modelo estrella con una nanopartícula central y muchas pequeñas en los extremo de "rayos" de oligonucleótidos. (B) tetraedro usando un origami de ADN como molde (C) nanoantena formada por un dímero de nanopartículas de oro ensambladas con un origami de ADN (D) decorado de una cápside viral con nanopartículas de oro (E) diversas geometrias de proteína-nanopartículas. (adptado de Schreiber et al. 2015)

Caracterización de nanopartículas esféricas de Oro

Elegimos trabajar con nanopartículas esféricas de oro dado que son ampliamente utilizadas en las nanociencias, especialmente en el campo de la nanofotónica. En particular, dadas las dimensiones de BLS (8 nm de alto por 6 nm de diámetro), elegimos nanopartículas que estuvieran en el mismo orden o un orden de magnitud mayor a la misma dado que la distancia generada por una partícula de BLS podría generar efectos ópticos de interés. Las nanopartículas empleadas en esta tesis son esferas de 20 nm, 40 nm, y 60 nm de diámetro, todas de origen comercial.

Decidimos caracterizarlas con técnicas que permitieran luego detectar procesos de oligomerización^{248–251}.

En la Figura 5. 3a se pueden observar los espectros de extinción medidos para cada una de estas 3 nanopartículas. Estos espectros dan información dependiendo de la longitud de onda que se analice. Entre los 400 y 450 nm se puede apreciar una meseta que tiene origen en transiciones interbanda del Au , cuya absorbancia es proporcional a la cantidad de Au presente y por lo tanto a la concentración (partículas en suspensión/litro) de partículas del mismo tipo y tamaño²⁵². En segundo lugar, las nanopartículas esféricas de oro suelen tener un pico entre los 500 y los 600 nm: las más pequeñas suelen tener el máximo hacia los 500 nm y las de mayor tamaño suelen tener el máximo cerca de los 600 nm. Como se ve en la figura, las nanopartículas de 20 nm tienen un máximo de absorbancia a 524 nm, mientras que las nanopartículas de 40 y 60 nm poseen un máximo a 526 nm. Finalmente, a longitudes de onda mayores a 900 nm se pueden detectar bandas más anchas que reflejan la formación de agregados.

En la Figura 5. 3b se muestra el diámetro medido por dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés). Esta técnica no solo permite medir el promedio de diámetro de nanopartículas en suspensión, sino que es capaz de detectar diversas poblaciones de partículas y calcular el promedio de tamaño de cada una de ellas. Esto es importante cuando se quiere tener información de la heterogeneidad de una muestra.

Finalmente, En la Figura 5. 3c se observa un patrón de corrida de una electroforesis en gel de agarosa (2%) para cada una de estas partículas. Dado que las nanopartículas comerciales vienen recubiertas por citrato, un compuesto de carga negativa a pH mayor a 3.15, y que el patrón de corrida en una electroforesis depende de la relación carga/masa, las nanopartículas de oro más pequeñas recorrerán mayor distancia que las grandes, bajo las mismas condiciones de corrida. Asimismo, los oligómeros correrán más lentamente que los monómeros, siempre y cuando su diámetro les permita atravesar la malla de agarosa.

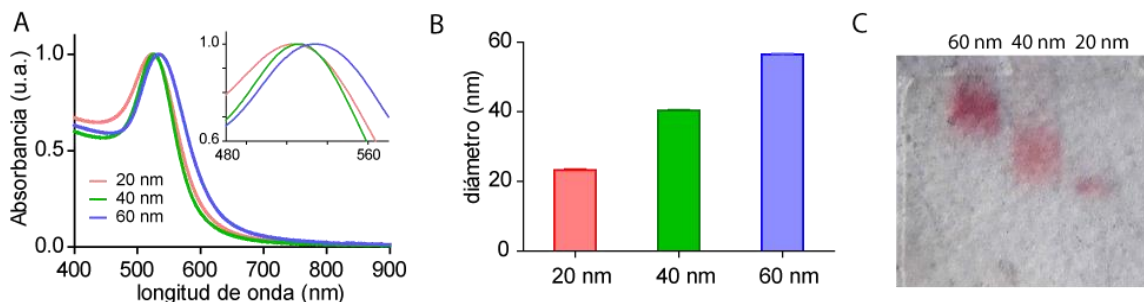


Figura 5. 3 caracterización de nanopartículas esféricas de oro de 20 (rojo), 40 (verde) y 60 (azul) nm en agua (A) espectro de absorbanza (B) diámetro promedio medido por DLS (C) patrón de corrida por electroforesis en gel de agarosa

Teniendo una caracterización estándar (en agua pura) de las nanopartículas de oro, nos propusimos conocer el efecto de las condiciones de distintos buffers sobre las mismas, tanto del pH como de la fuerza iónica. En la Figura 5. 4 se observan espectros de absorbanza de los 3 tamaños de nanopartículas a 3 pHs distintos y 2 o 3 concentraciones salinas diferentes. En todos los casos se observa un efecto más pronunciado en la variación de la fuerza iónica que en la variación del pH, dentro de los rangos estudiados. En particular, se observa que concentraciones de buffer mayores a 10 mM ya promueven una fuerte agregación. Al analizar las mismas muestras por DLS (Figura 5. 5), se observa en los 3 tamaños de nanopartícula que, en un buffer de concentración salina baja, el diámetro hidrodinámico obtenido tiende a aumentar levemente con el aumento del pH. Teniendo en cuenta que estas nanopartículas están estabilizadas con citrato, es posible que estos cambios de diámetro se deban a cambios en el estado de protonación del mismo. Por otro lado, se observa que la cantidad de partículas en suspensión a un mismo pH (7) disminuye con el aumento de la concentración de sales, teniendo en todos los casos la totalidad de la muestra precipitada cuando la muestra se encuentra en una concentración salina de 50 mM.

Estos estudios muestran que, para estas nanopartículas, si bien se puede trabajar casi indistintamente con un rango de pHs de 6 a 8, es importante mantener la concentración de buffer idealmente por debajo de 20 mM.

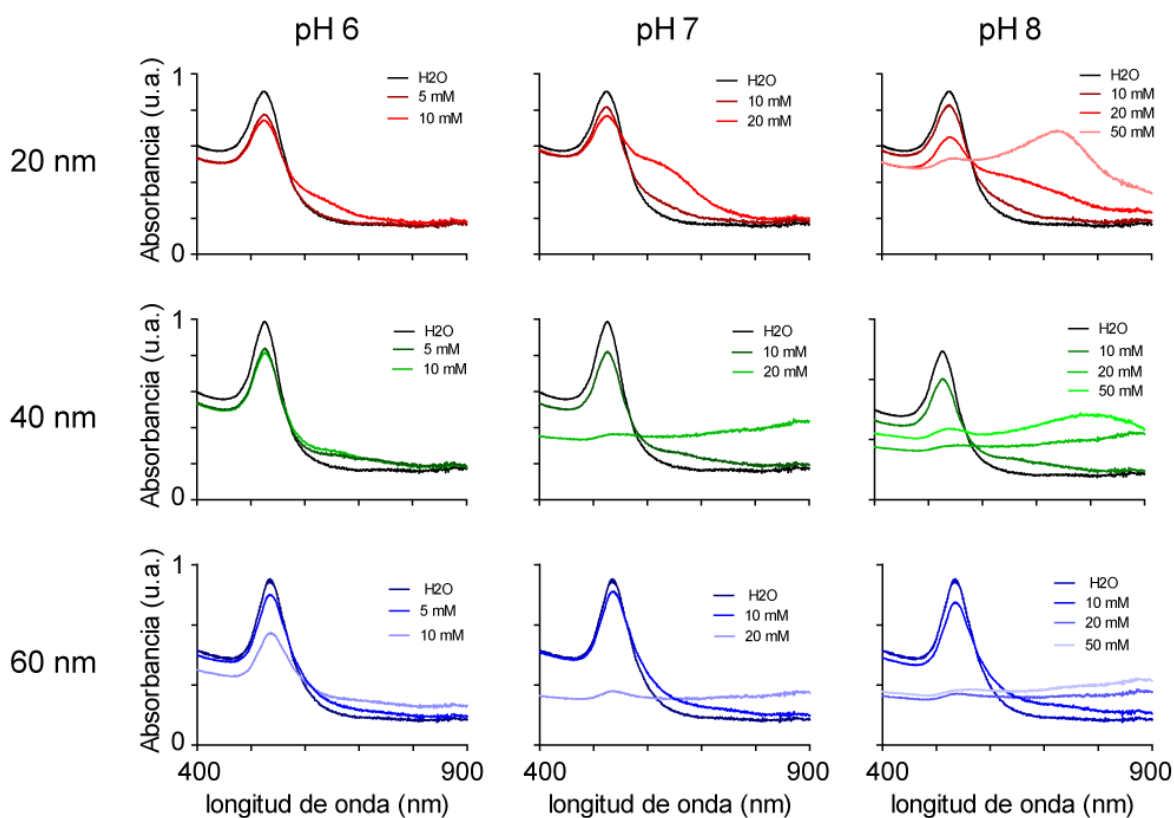


Figura 5. 4: efecto del pH y la fuerza iónica sobre la estabilidad de las nanopartículas de oro de 20 (rojo), 40 (verde) y 60 (azul) nm, monitoreado por espectroscopia de absorbancia. El buffer empleado para regular el pH en 6 fue citrato/fosfato y a pH 7 y 8 fue buffer fosfato, ambos sin agregado extra de sales. La fuerza iónica fue calculada en base a la concentración del buffer.

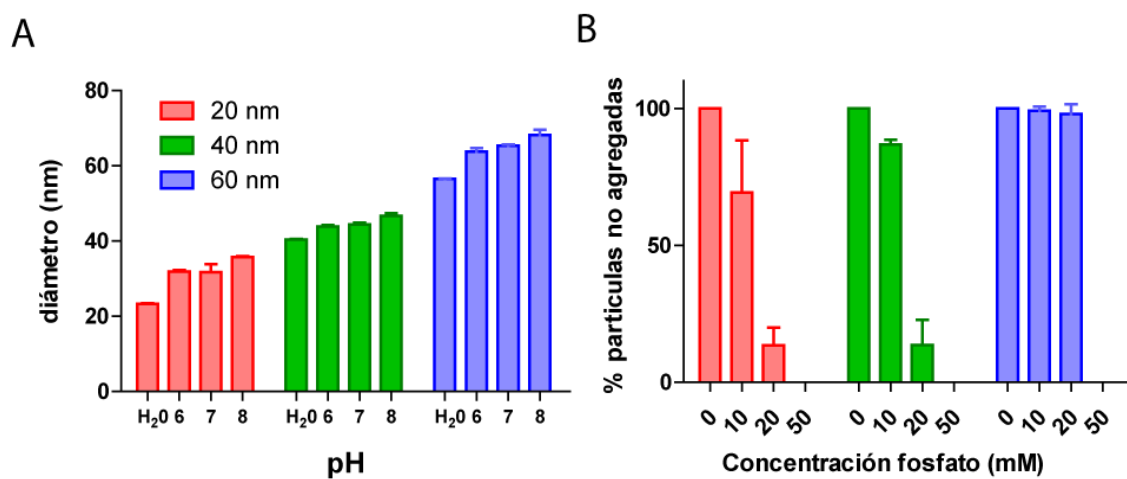


Figura 5. 5: efecto del pH y la fuerza iónica sobre la estabilidad y el diámetro de las nanopartículas de oro de 20 (rojo), 40 (verde) y 60 (azul) nm, monitoreado por

espectroscopia DLS. diámetros observados para distintos pH son a fuerza iónica constante ([buffer]=10 mM)

BLS para el ensamblado de nano-antenas ópticas

El diseño y la construcción de estructuras plasmónicas formadas por nanopartículas metálicas espacialmente ordenadas sigue siendo un desafío. Es de particular interés la construcción de nano-antenas ópticas capaces de captar, transformar y emitir luz^{50,253,254}. En ese sentido nos propusimos construir nano-antenas empleando a BLS como sistema de andamiaje de nanopartículas. Si bien existen ya diversas estrategias para lograr esto, BLS cuenta con algunas características estructurales que la dotan de especial versatilidad para este tipo de propósitos. En primer lugar, la estructura cilíndrica con extremos N-terminal libres, facilita el ensamblado de dímeros de nanopartículas. Por otro lado, la posibilidad de controlar la unión entre pentámeros de esta proteína ha abierto la puerta a trabajar de manera modular, permitiendo así la unión de nanopartículas de diferentes características (tamaños, formas y materiales) a ambos lados del decámero. Finalmente, habiendo podido incorporar fluoróforos en su interior (ver capítulo 1), se puede pensar en la construcción de nano-estructuras super-fluorescentes. Dada la versatilidad que BLS puede aportar a la construcción de nano-estructuras plasmónicas, nos hemos propuesto como primer objetivo emplear a esta proteína para la construcción de dímeros de nanopartículas de oro.

Estrategia 1: ensamblaje basado en interacción directa tiol-oro

EL enfoque inicial para la construcción de dímeros y otros oligómeros de nanopartículas de oro empleando BLS como elemento de anclaje es aprovechar la reactividad del grupo tiol de las cisteínas con los átomos de oro (Figura 5. 6). Esta reacción ya ha sido ampliamente utilizada con estos propósitos²⁵⁵. Teniendo en cuenta que la versión *wild type* de BLS posee una única cisteína cerca del extremo

N-terminal, no sería necesario hacer ninguna mutación nueva. Por otro lado, sabemos por trabajos previos de nuestro laboratorio que dicha cisteína es muy reactiva y que de hecho es necesario mantenerla reducida para que las partículas de BLS no reaccionen entre si y precipiten. Además, se sabe que las proteínas tienden a adsorberse a la superficie de las nanopartículas por medio de interacciones débiles, lo que en nano-medicina se llama comúnmente “efecto corona”^{256,257}. Es por esto que es necesario tener un control de que los procesos de ensamblaje se deban a la química de las cisteínas y no a otro tipo de interacciones. Para esto, decidimos trabajar inicialmente con dos versiones de BLS: BLS_{WT} (con cisteína en la posición 5) y BLS_{C5S} (mutante en la que se reemplazó la cisteína por una serina). Siendo la presencia de cisteína la única diferencia entre ambas, todas las diferencias experimentales se pueden adjudicar exclusivamente a la reactividad de ésta. Estas dos versiones de BLS ya habían sido producidas previamente en nuestro laboratorio.

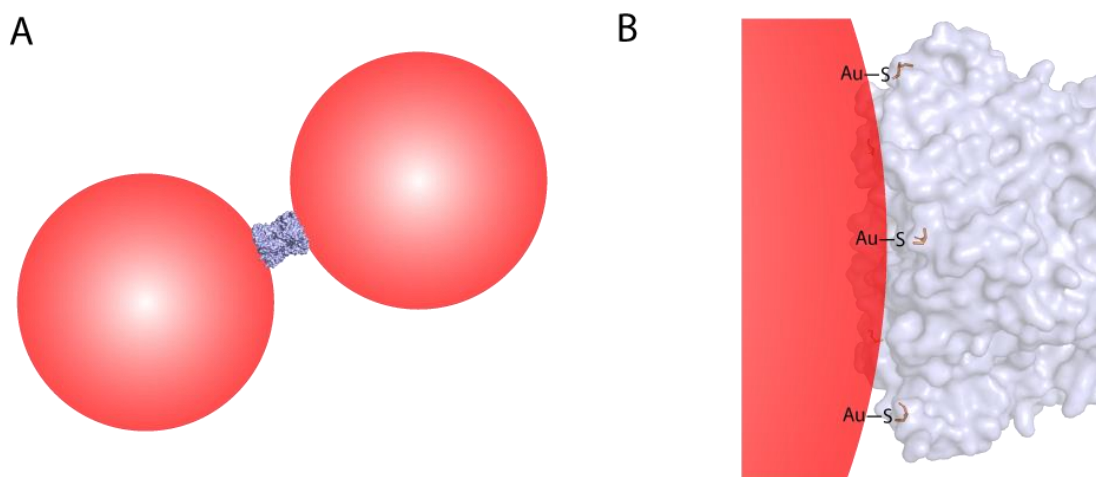


Figura 5. 6: Esquema a escala de (A) un dimero de nanopartículas de oro de 60 nm de diámetro unidas por una partícula de BLS. (B) ampliación donde se muestra la unión entre una nanopartícula de oro y BLS mediante enlaces covalentes oro-tiol.

Inicialmente se realizaron ensayos cualitativos de precipitación de nanopartículas en presencia de BLS. En la Figura 5. 7 se puede observar a simple vista como la presencia de exceso de BLS_{WT} produce un precipitado de nanopartículas, el cual es revertido ante la presencia de un reductor (DTT). En cambio, cuando se realiza el mismo ensayo con BLS_{C5S}, no se observa la formación de dichos precipitados. Estos ensayos fueron monitoreados por espectroscopia UV-Vis. En la Figura 5. 8 se observan los espectros de los 3 tamaños de nanopartículas en presencia de ambas variantes de BLS y en ausencia de la misma, con y sin agregado de DTT. Para el caso de BLS_{WT} se observa cómo, en ausencia de reductor, en todos los casos el pico característico de las NPs desaparecía y la concentración en suspensión bajaba considerablemente, lo que suponía un proceso de agregación y precipitación. Al agregar el DTT, en los 3 casos se recuperaba parcialmente el pico principal, lo que implica una reversibilidad de la reactividad de BLS con las NPs. El nuevo pico además de tener menor intensidad, es más ancho, lo que se puede explicar por la presencia de agregados solubles. Esto se puede deber a que el DTT es un reductor que tiene tioles, por lo que también podría inducir la interacción entre nanopartículas. En el caso de BLS_{C5S}, no se observan cambios significativos en el espectro al agregar la proteína, por lo que se intuye que la misma no induce per se fenómenos de agregación o precipitación. Esto no quita la posibilidad de que la proteína se esté adsorbiendo a la superficie de las NPs. En este caso, el agregado de DTT también produjo un fenómeno de agregación de nanopartículas, casi igual al observado en BLS_{WT}.

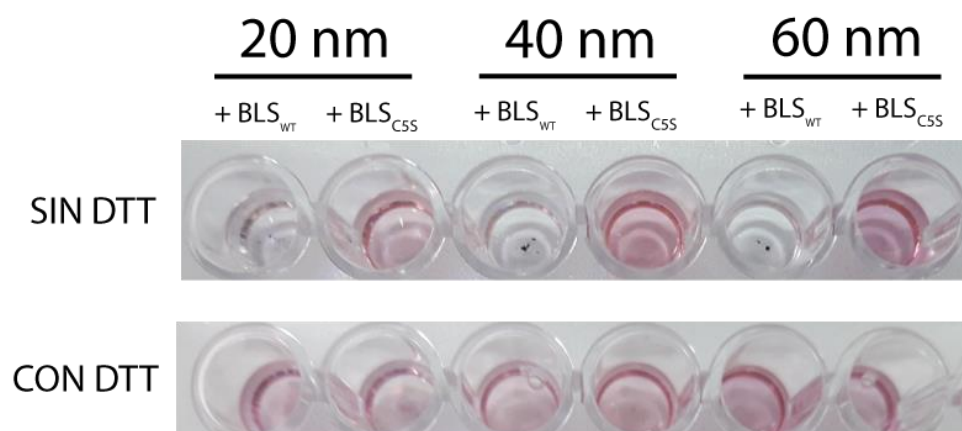


Figura 5. 7: ensayos de precipitación con y sin DTT de nanopartículas de oro de 20, 40 y 60 nm en presencia de BLS_{WT} y BLS_{C5S}

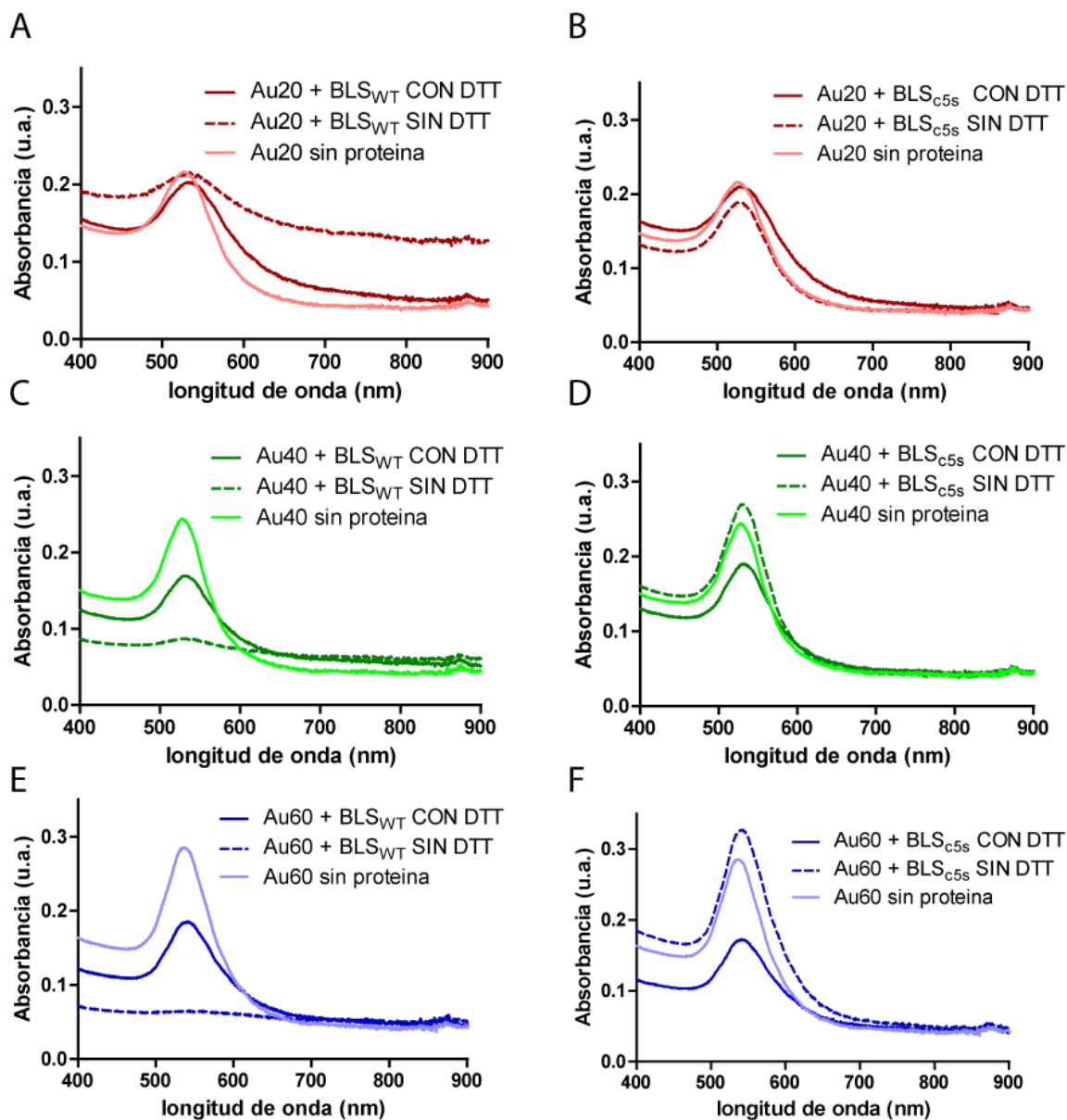


Figura 5. 8: Espectros de absorbancia de nanopartículas de oro de 20 (rojo), 40 (verde) y 60 (azul) nm con y sin DTT en presencia de (A,C,E) BLS_{WT} y (B,D,F) BLS_{c5s}

Dado que el objetivo de este trabajo no era formar precipitados sino oligómeros estables en suspensión, se decidió barrer un rango de concentraciones de BLS con el fin de hallar condiciones adecuadas para tal objetivo. A partir de aquí se trabajó solo con nanopartículas de 60 nm para reducir el espacio de exploración y porque dicho tamaño de NP es el más interesante para aplicaciones de

nanofotónica. Se trabajó con diferentes relaciones de concentración molar (en el orden del pM-nM) nanopartícula:proteína y en todos los casos se monitoreó la reacción mediante espectroscopia UV-Vis y DLS. Los resultados se muestran en la Figura 5. 9. En ambos casos, a una proporción de proteína 100 veces mayor a la de nanopartículas, se observó un aumento en el diámetro promedio de las partículas. Sin embargo, en los espectros se observó una diferencia entre ambas proteínas: para el caso de BLS_{WT}, a proporciones de nanopartícula:proteína mayores a 100 se apreciaba un claro efecto de agregación (con la consecuente pérdida de señal) que en BLS_{C55} no se detectó. Teniendo esto en cuenta, se decidió seguir trabajando con nanopartículas incubadas con BLS_{WT} a una proporción 1:100.

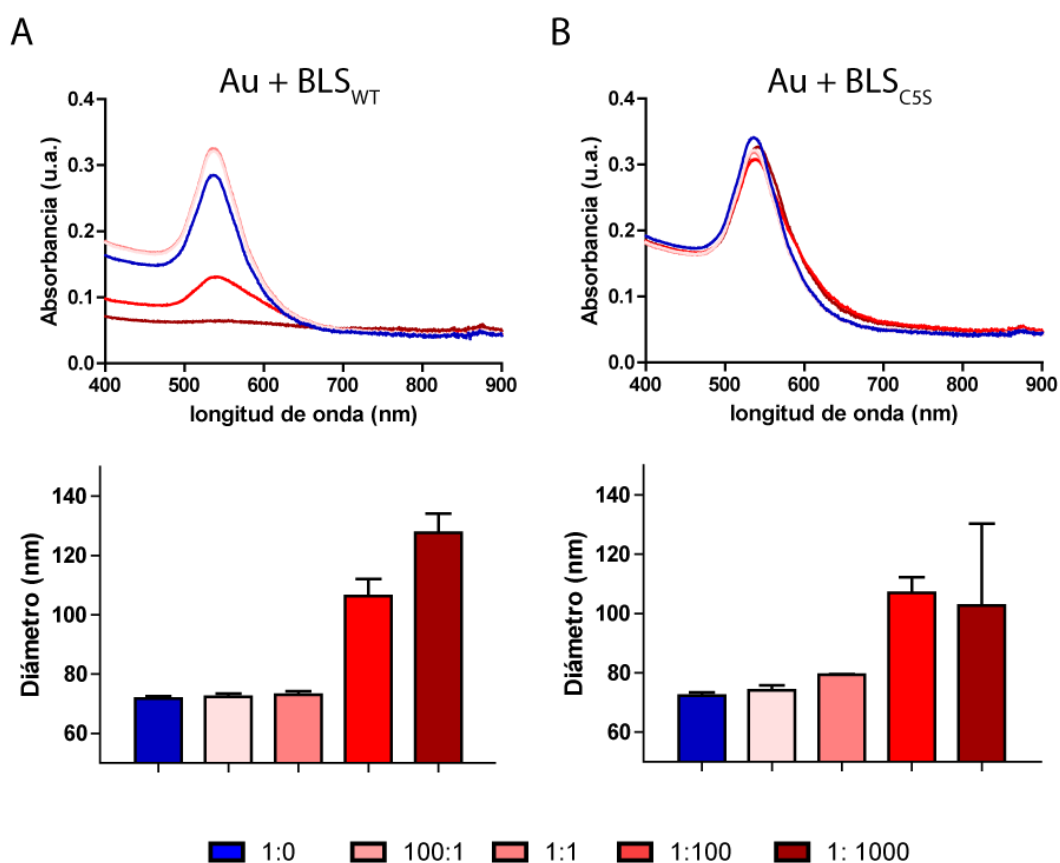


Figura 5. 9: ensayo de asociación entre nanopartículas de oro de 60 nm y diferentes concentraciones de (A) BLS_{WT} o (B) BLS_{C55} monitoreado por espectroscopia UV-Vis (arriba)

y DLS (abajo). En ambos casos se muestran proporciones NP:proteína en lugar de concentraciones absolutas.

Como se ve en la Figura 5. 10, en las condiciones de incubación seleccionadas se observa un cambio en la forma del espectro de extinción. El pico de absorbancia se corre de 535 nm (valor de referencia para nanopartículas esféricas de 60 nm) a 541 nm. Puede hipotetizarse que este corrimiento se deba a una convolución del espectro de monómeros de oro con otros oligómeros de mayor tamaño. Al analizar por DLS el diámetro promedio de las nanopartículas en suspensión se observa que se incrementó de un promedio de 70 nm antes de la incubación, a 134 nm tras la incubación con BLS_{WT}. Esta última medición poseía una dispersión más grande que las NPs solas. Esto indicaba que se trataba de una población polidispersa y heterogénea.

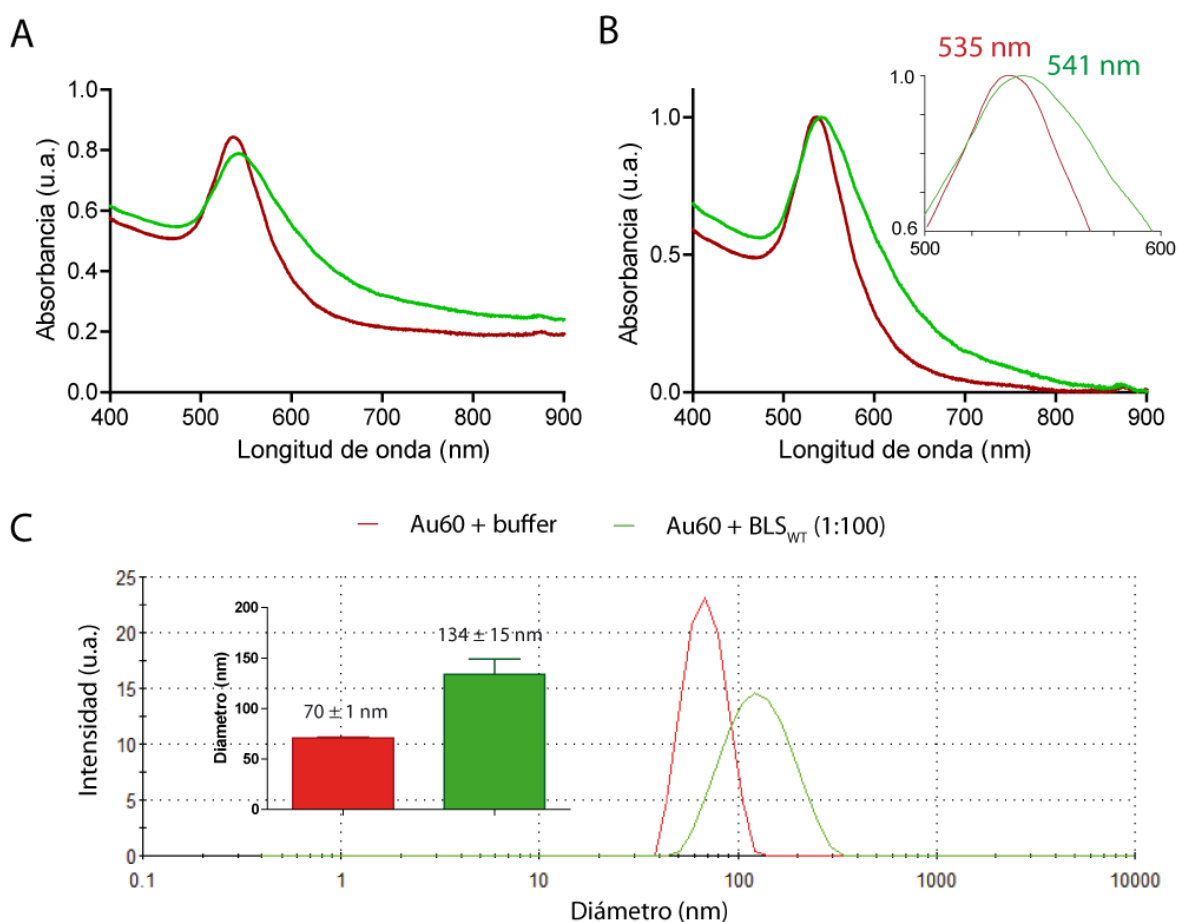


Figura 5. 10: resultado de la incubación (2 hs a 37°C, en buffer fosfato 10 mM pH 7.4 con Tween 0.1%) de nanopartículas con BLS_{WT} a una concentración 50 nM. (A) y (B) espectro de absorbancia de la muestra antes y después de la incubación, medidos tal cual y normalizados al máximo de absorbancia. (C) histograma de distribución de diámetros hidrodinámicos de la muestra antes y después de la incubación, medidos por DLS.

El paso siguiente para estudiar las estructuras obtenidas fue emplear técnicas de partícula única. Empleando un sistema de impresión óptica^{258,259}, fue posible imprimir nuestras partículas sobre una superficie de manera ordenada y selectiva. La técnica se basa en aprovechar fuerzas ópticas generadas por un láser de manera tal que, a una longitud de onda y potencia dadas, las nanopartículas sean atrapadas en el centro del haz y empujadas en su dirección de propagación. Metodológicamente, se coloca la suspensión de nanopartículas sobre un portaobjetos cubierto por un polímero de igual carga de las nanopartículas (en este caso carga negativa), de manera tal que ambos se repelan. Una vez encendido el láser, el mismo puede “empujar” las partículas en sentido a la superficie. Cuando la distancia entre las nanopartículas y la superficie es lo suficientemente pequeña, las fuerzas atractivas de Van der Waals pueden superar a las repulsivas electrostáticas, de manera que las nanopartículas queden adheridas a la superficie. Esta técnica nos permitió imprimir grillas de nanopartículas, estudiarlas individualmente por diversas técnicas, así como hacer estadística de las mismas.

En la Figura 5. 11, se pueden observar tres ejemplos representativos del tipo de estructuras encontradas en una grilla de 10 x 12 nanopartículas. En la misma se muestran a la izquierda imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) y a la derecha gráficos de dispersión de luz en función de la longitud de onda. Dichos espectros fueron tomados con luz linealmente polarizada en dos ejes perpendiculares entre sí. Los mismos fueron tomados en el mismo set-up experimental con el que se hizo la impresión de las partículas. Los espectros de dispersión de luz son característicos de cada forma, tamaño y orientación de las estructuras observadas. Esto habilita, una vez hecha la caracterización por ambas técnicas, a identificar el tipo de agregados sin la necesidad de mirar cada muestra por SEM.

En las imágenes se ven, a modo de ejemplo, un monómero de 60 nm, un dímero y un trímero. Como se puede ver en la imagen correspondiente al dímero y al trímero, las nanopartículas parecen estar en contacto. No se observa la separación de 8 nm que se esperaba con una molécula de BLS entre nanopartículas. Suponemos que esto se debe a que la alta temperatura local producida por el láser durante la impresión desnaturaliza a las proteínas, pero deja a las nanopartículas en contacto. Para conocer el destino final de BLS, sería interesante tomar imágenes de SEM de nanopartículas depositadas de este modo y teñidas con un compuesto que genere contraste para las proteínas en dicha microscopia.

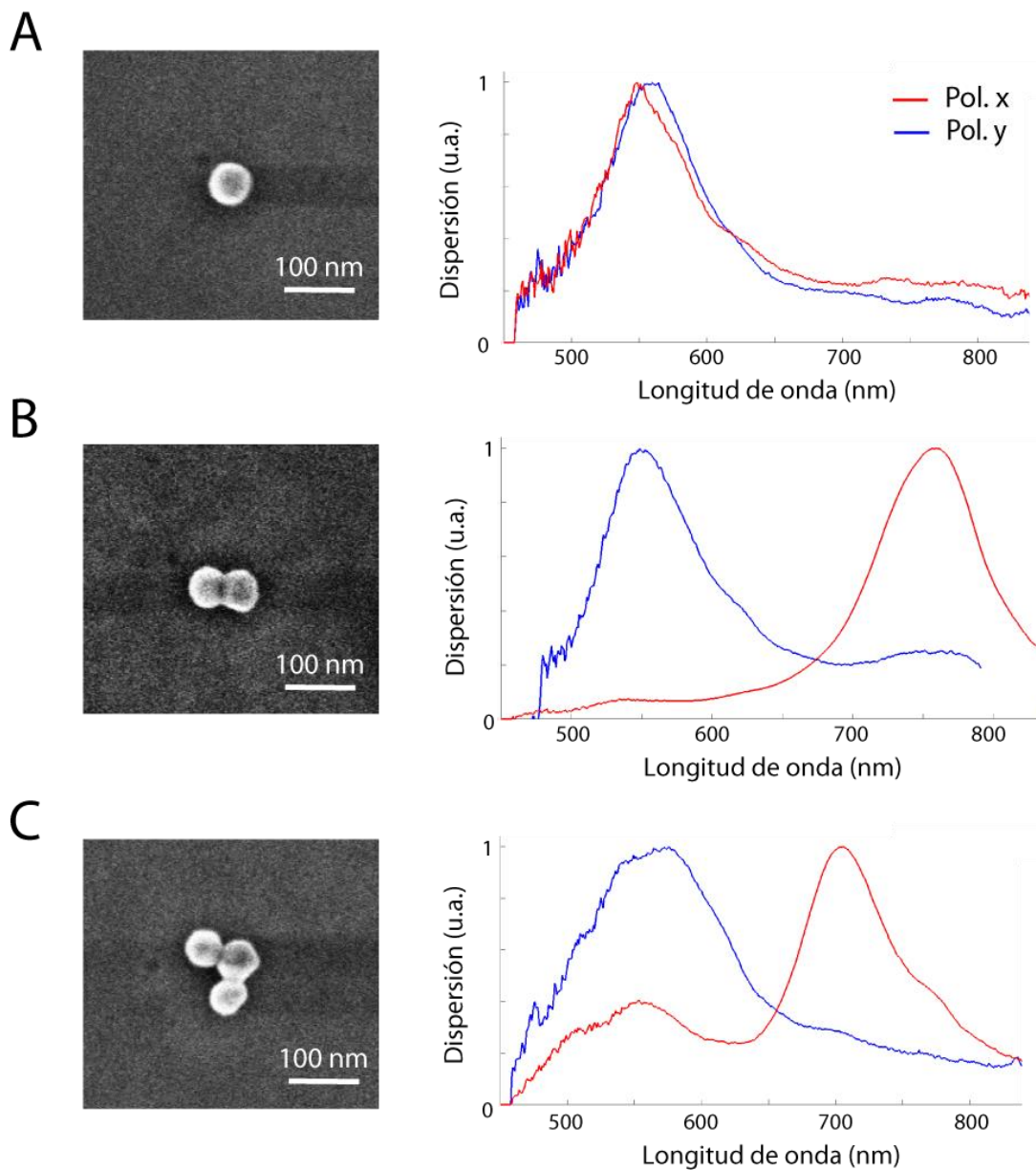


Figura 5. 11 Imágenes representativas de nanopartículas impresas tras la incubación con BLS_{WT}. En los paneles de la izquierda se observan imágenes de SEM y a su derecha espectros de dispersión de luz en función de la longitud de onda con luz linealmente polarizada en ejes perpendiculares.

Estudiando el conjunto de nanopartículas impresas, hemos podido obtener el porcentaje de monómeros, dímeros, trímeros y oligómeros de nanopartículas de oro de 60 nm de nuestra muestra (ver Figura 5. 12). Si bien no se puede garantizar que esta sea la misma proporción de estructuras que hay en la suspensión (debido

a la selectividad del láser), se trata de una primera aproximación. La conclusión de estos ensayos, es que hemos obtenido estructuras oligoméricas de nanopartículas de oro de 60 nm unidas por BLS, y que en las condiciones trabajadas se trata de poblaciones heterogéneas.

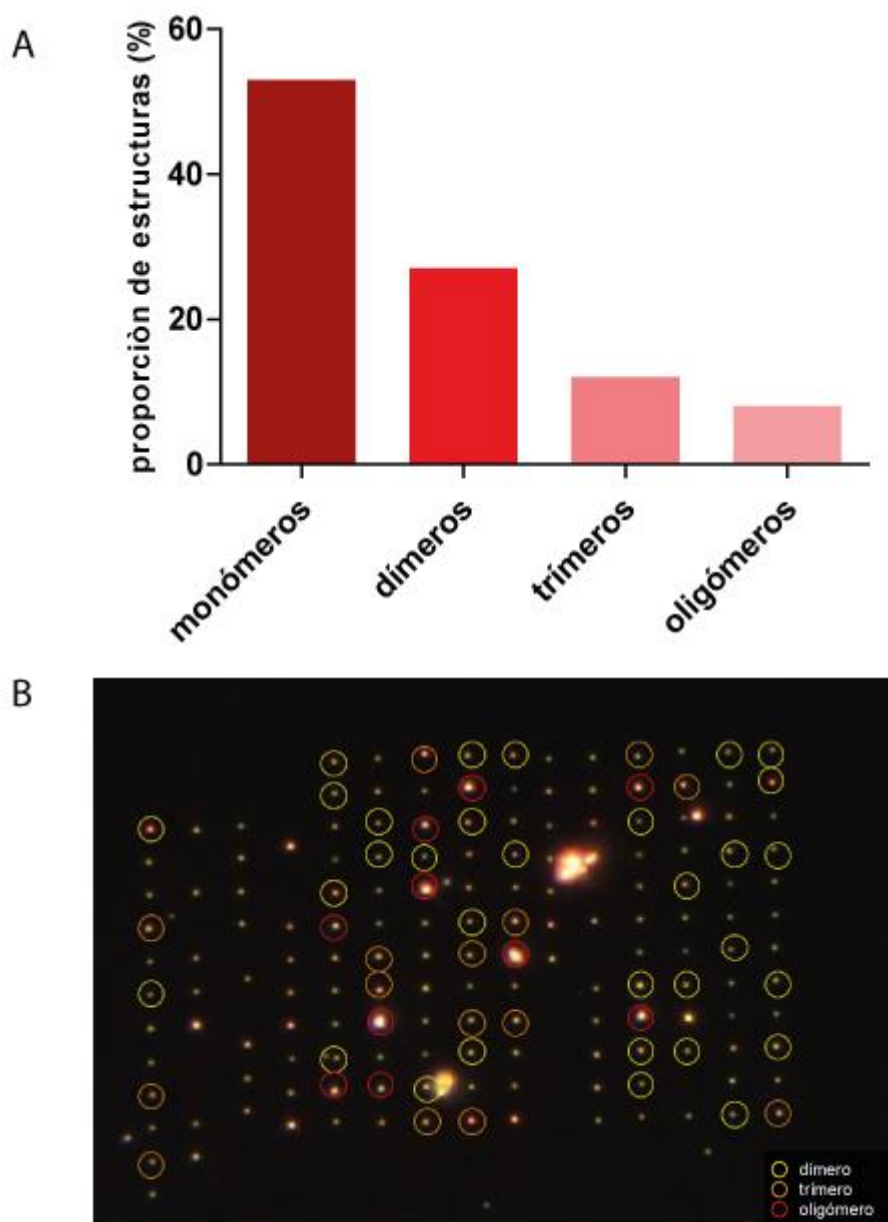


Figura 5. 12: (A) porcentaje respecto al total de partículas impresas de estructuras monoméricas, diméricas trimétricas y oligoméricas analizadas por SEM. (B) Microscopía de campo oscuro de la

grilla de nanopartículas impresas. En amarillo se marcan las identificadas como dímeros, en naranja los trímeros y en rojo oligómeros de mayor orden. Las nanopartículas no marcadas son monoméricas.

Estrategia 2: ensamblaje mediado por hebras de BLS y oligonucleótidos

En vista que el pegado inespecífico entre las proteínas y las nanopartículas parecería estar compitiendo con el pegado direccionado y específico vía tioles, aplicamos una segunda estrategia para el ensamblado de nanopartículas de oro. Teniendo en cuenta los protocolos para unión de DNA a los extremos N-terminales de BLS que desarrollados en el capítulo 2 de esta tesis, y conociendo estrategias de ensamblado de nanopartículas mediante origamis de ADN, decidimos probar el ensamblado mediado por hibridización de ADN. Brevemente, la estrategia consiste en recubrir a las nanopartículas con oligonucleótidos de simple cadena con una secuencia poli-T. Las mismas se pueden unir fácilmente al oro si se les agrega un grupo tiol en un extremo. La estructura que se quiere unir a las nanopartículas, que en este caso se trata de BLS, se une a una secuencia de oligonucleótido de cadena simple poli-A, complementaria a la anterior. De esta manera, al incubar ambas muestras, las mismas se unirán mediante la hibridización de las cadenas de ADN. En la Figura 5. 13 se muestra un esquema de dicha estrategia. La misma posee dos variantes cuya diferencia radica en la forma en la cual se hibridizan las hebras de ADN. El denominado “ensamblado cruzado” deja ambas estructuras separadas por las hebras de ADN, cuya distancia puede variar entre la longitud de las hebras (en caso de estar estiradas) o un valor menor producto de su enrollamiento. Por otro lado, el “ensamblado tipo cierre” deja a las estructuras muy cerca unas de otras y a las hebras de ADN sobresaliendo entre ambas.

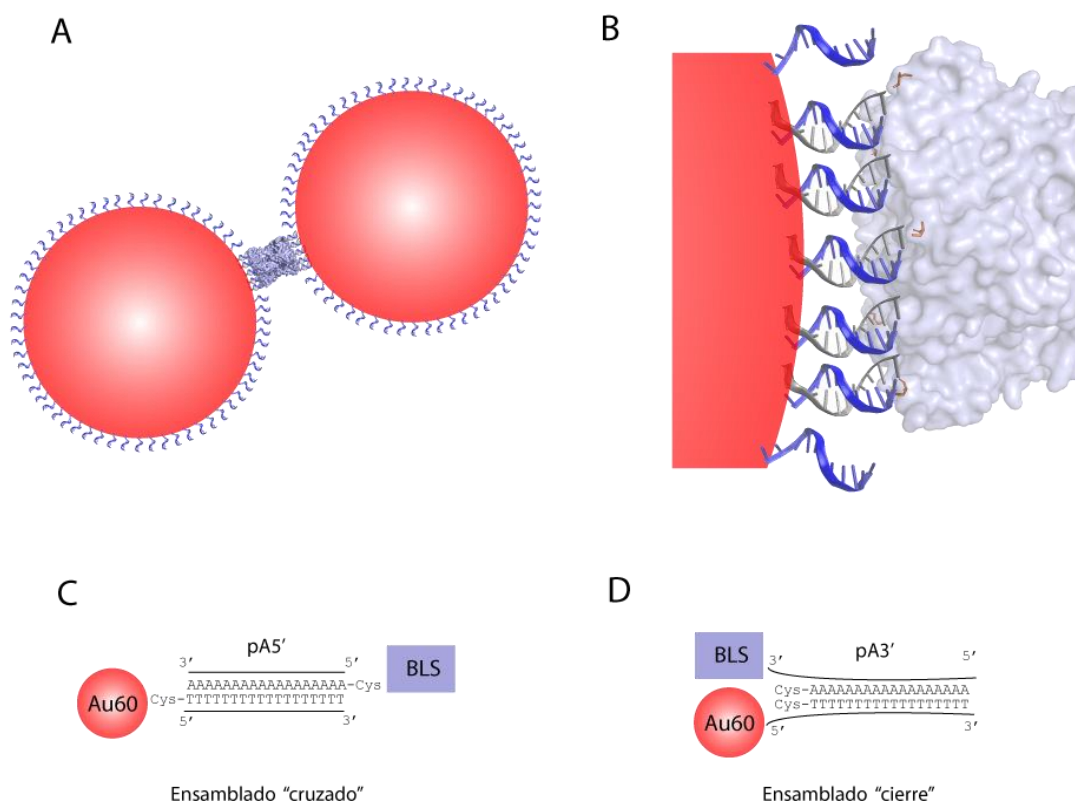


Figura 5. 13: Esquema a escala de (A) un dimero de nanopartículas de oro de 60 nm de diámetro funcionalizadas con poli-T unidas por una partículas de BLS funcionalizada con poli-A. (B) ampliación donde se muestra la unión entre una nanopartícula de oro y BLS mediante hibridización de las hebras poli-T y poli-A. Se muestra esquema de ensamblado mediante hibridización de oligonucleótidos de (C) tipo cruzado y (D) tipo "cierre".

Se funcionalizaron nanopartículas de oro de 60 nm con oligonucleótidos poli-T en condiciones reductoras. Las nanopartículas funcionalizadas fueron separadas del exceso de oligonucleótidos mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 5. 14c). Las mismas fueron caracterizadas tanto por espectroscopia UV-Vis como por DLS. En Figura 5. 14a se observa que el espectro de absorbancia de las nanopartículas no se ve sustancialmente modificado por la funcionalización. Se probó una segunda condición en presencia de altas concentraciones de NaCl (0,3M), ya que por trabajos previos se sabía que las condiciones de hibridización necesitarán alta fuerza iónica. El espectro en estas condiciones tampoco muestra grandes diferencias. Cabe destacar que las partículas funcionalizadas con

oligonucleótidos no precipitan debido a la alta carga negativa que estas moléculas le confieren a la superficie, generando una repulsión electrostática elevada y por lo tanto inhibiendo la agregación. En la Figura 5. 14b se muestra el diámetro hidrodinámico promedio medido por DLS de las 3 muestras. En todos los casos se observa un diámetro que ronda los 70/80 nm. A altas concentraciones salinas se observa un diámetro aparente un poco menor.

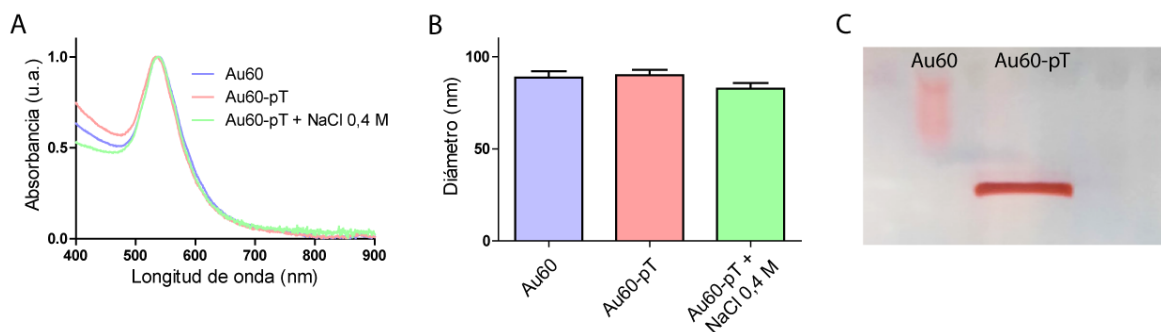


Figura 5. 14: comparación de nanopartículas de oro de 60 nm con y sin funcionalizar con poli-T, en agua y en presencia de NaCl 0,4 M, monitoreada por (A) espectroscopía de absorbancia (B) DLS y (C) electroforesis en gel de agarosa (0,8%).

A continuación, se conjugaron los 10 extremos N-terminal de BLS con oligonucleótidos poli-A funcionalizados con tioles en los extremos 3' o 5'. A partir de aquí llamaremos a estas estructuras pA3' y pA5' respectivamente. Al igual que en los capítulos anteriores, se empleó en adaptador Mal-PEG2-NHS para dicho propósito. Los resultados de dicha marcación se muestran en la Figura 5. 15. En la misma se observan los espectros de absorbancia de BLS y de los nucleótidos por separado y tras la funcionalización de los mismos. Al unir los 10 oligonucleótidos el pico de absorción de los mismos (260 nm) tapa totalmente el de la proteína (280 nm) debido a la diferencia en la extinción molar de ambos tipos de moléculas. Sin embargo, aún es posible apreciar la presencia de la proteína a longitudes de onda más bajas (los enlaces peptídicos absorben a 220 nm).

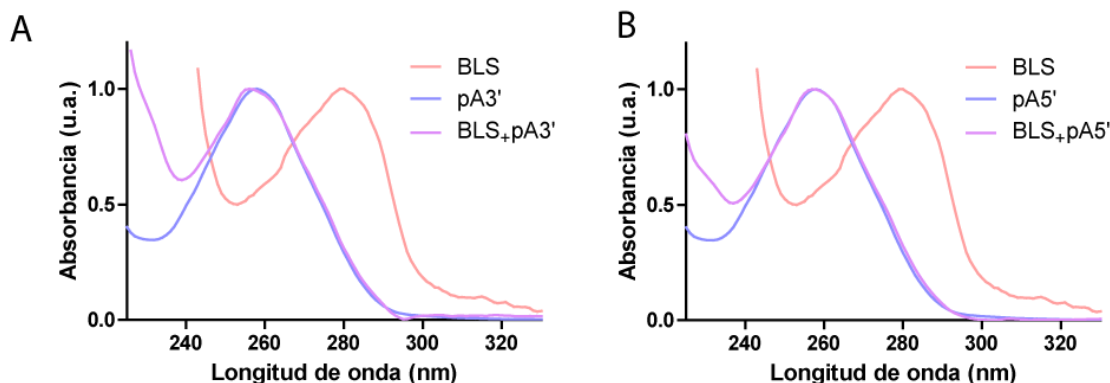


Figura 5. 15: Monitoreo de marcación de BLS con oligonucleótidos en sus extremos N-Terminal. Se muestran espectros de absorbancia de BLS sola, oligonucleótidos poliA con (A) tiol en el extremo 3' (pA3') o (B) tiol en el extremo 5' (pA5') de BLS tras la marcación con ambos oligonucleótidos.

Teniendo ahora las nanopartículas de oro y a BLS funcionalizados con sus respectivos oligonucleótidos, procedimos a poner a punto las condiciones para el ensamblado de oligómeros de nanopartículas mediado por BLS. Trabajos anteriores mostraron que es necesaria una alta fuerza iónica para facilitar el apantallamiento de cargas y así favorecer la hibridización de las hebras de ADN. Por eso, decidimos evaluar el ensamblado de nanopartículas de oro con distintas concentraciones de BLS en presencia y ausencia de NaCl. En la Figura 5. 16 se muestran los resultados monitoreados por espectroscopía UV-Vis. En la misma se puede ver que tanto para pA3' como para pA5', el agregado de NaCl es crucial al menos para detectar algún cambio espectral apreciable. Efectivamente, al agregar NaCl se observan tanto procesos de agregación (detectados por una caída en la intensidad del pico principal) como corrimientos hacia valores de mayor longitud de onda, concordemente con la formación de oligómeros ya detallada a principios de este capítulo. Al igual que en la estrategia anterior, solo a partir de una proporción 1:100 para pA5' y 1:1000 para pA3' se formaron precipitados y agregados solubles. Resulta llamativo que para el caso de pA5' parecería haber un fenómeno de mayor precipitación en una proporción 1:100 que en el caso 1:1000.

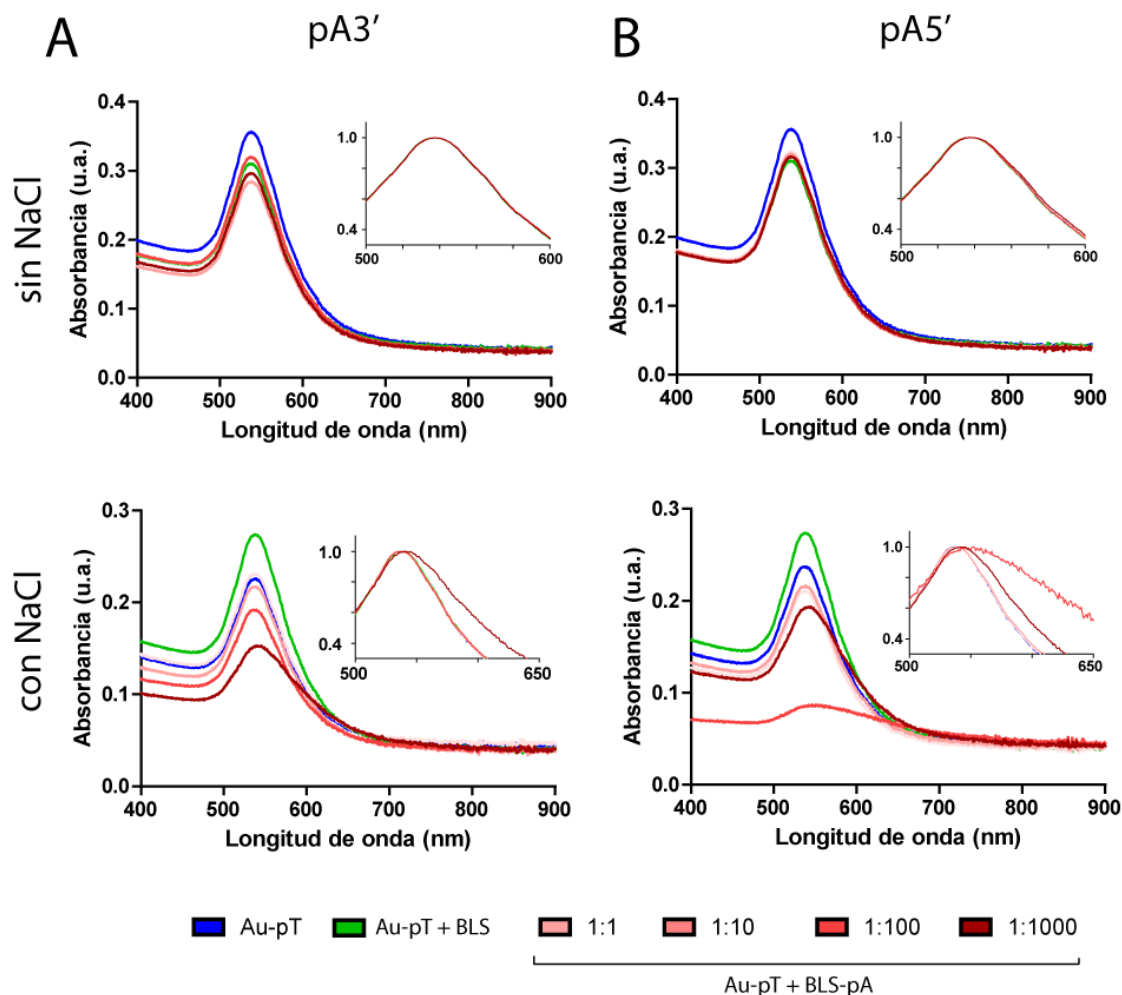


Figura 5. 16: Espectros de absorbancia de de nanopartículas de oro de 60 nm incubados con (A) BLS-pA3' o (B) BLS-pA5' a distintas concentraciones, en presencia y ausencia de NaCl. Las concentraciones se expresan como proporción respecto a la concentración de nanopartículas. En todos los casos se muestra una ampliación de los espectros normalizados.

El proceso también fue monitoreado por DLS. En La Figura 5. 17 se observa, concordantemente con los espectros de absorbancia, que para el caso de pA3' a una proporción 1:1000 aparecen especies de mayor tamaño y para el caso de pA5' a una proporción 1:100. En ambos casos a una proporción 1:1000 las especies son de aproximadamente el doble de diámetro de una nanopartícula sola.

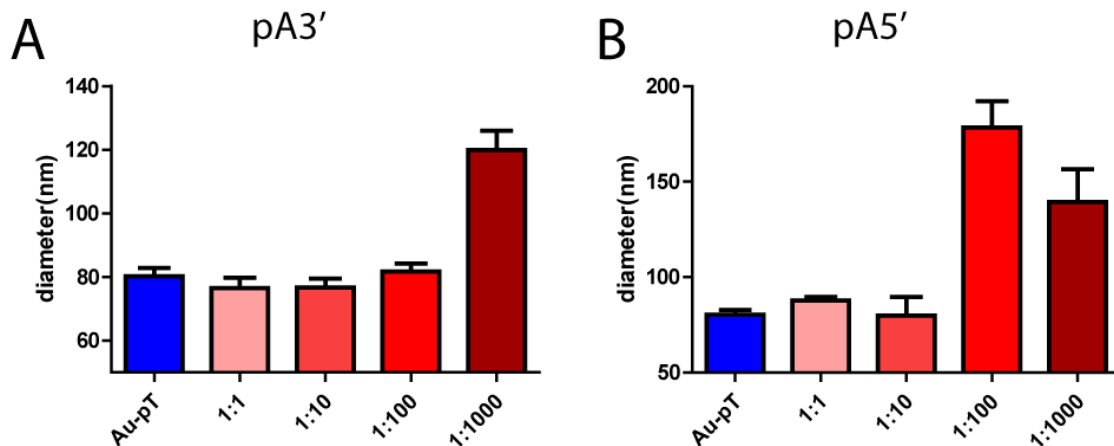


Figura 5. 17: Diámetros medidos por DLS de nanopartículas incubadas con (A) BLS-pA3' o (B) BLS-pA5' a distintas concentraciones, todas en presencia de NaCl 0,3 M. Las concentraciones se expresan como proporción respecto a la concentración de nanopartículas

Para mejorar la puesta a punto de este protocolo, decidimos buscar la concentración crítica de NaCl a la cual aparecen oligómeros de nanopartículas. En la Figura 5. 18 se observa que la dependencia con la fuerza iónica es muy distinta para ambos casos. En el caso de pA3' se encontró una concentración crítica a 200 mM, por debajo de la cual parecen no formarse oligómeros. Esto se observa tanto en el espectro de absorbancia como en las medidas de diámetro por DLS. Por otro lado, para el caso de pA5' parece existir una dependencia gradual con la concentración de NaCl en la que a 50 mM ya se encuentran especies de mayor tamaño y a medida que sube la concentración salina aumentan tanto la proporción como el tamaño de los oligómeros.

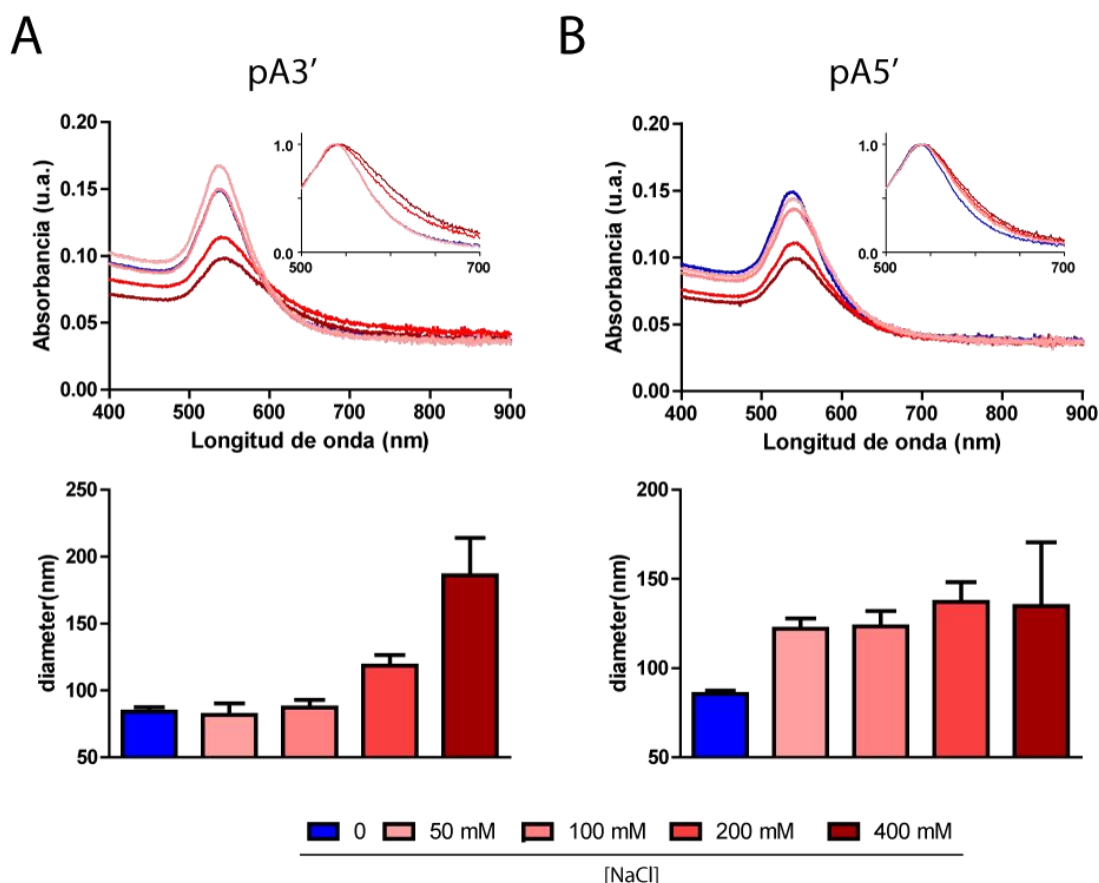


Figura 5. 18: Diámetros y Espectros de absorbancia de nanopartículas de oro de 60 nm incubados con (A) BLS-pA3' o (B) BLS-pA5' en proporción 1:1000 a distintas concentraciones de NaCl. En ambos casos se muestra una ampliación de los espectros normalizados.

Conociendo ahora sí las condiciones que parecían óptimas para la formación de oligómeros de nanopartículas de oro (200 mM de NaCl y una proporción 1:1000), decidimos analizar las muestras mediante TEM. En la Figura 5. 19 se muestran imágenes representativas de nanopartículas recubiertas con poli-T, así como las muestras incubadas con pA3' y pA5'. En las mismas aparecen oligómeros de 2 a 6 unidades, así como monómeros. La cantidad de oligómeros parece ser mayor en pA3' que en pA5'.

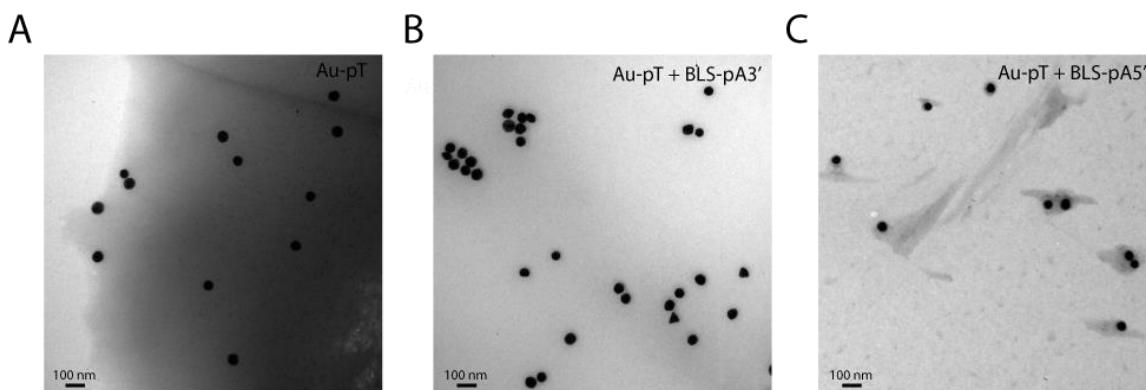


Figura 5. 19: imágenes TEM de muestras de (A) Nanopartículas de oro recubiertas con oligonucleótidos poliT, (B) incubadas con BLS-pA3' y con (C) BLS-pA5'

A diferencia de las muestras analizadas por impresión óptica seguida de SEM, en este caso se observa siempre un espacio entre partículas que forman oligómeros. Dado que con el método de tinción empleado no es posible visualizar moléculas orgánicas, hipotetizamos que dicho espacio es producido por la presencia de BLS. Sabiendo que la longitud cristalográfica de BLS es de 8 nm, decidimos medir dichos espacios para estudiar si los mismos eran compatibles con el tamaño de BLS. En la Figura 5. 20 se pueden ver las distribuciones de distancia inter-partícula encontradas tanto para el caso de pA3' como para el caso de pA5'. En ambos casos se puede observar un pico mayor situado en aproximadamente 5-6 nm y un pico secundario a 10 nm (en el caso de pA5') y 12nm (en el caso de pA3'). Estas distancias son concordantes con el tamaño cristalográfico de BLS (8nm). El pico secundario podría interpretarse como la presencia de más de una BLS entre las nanopartículas.

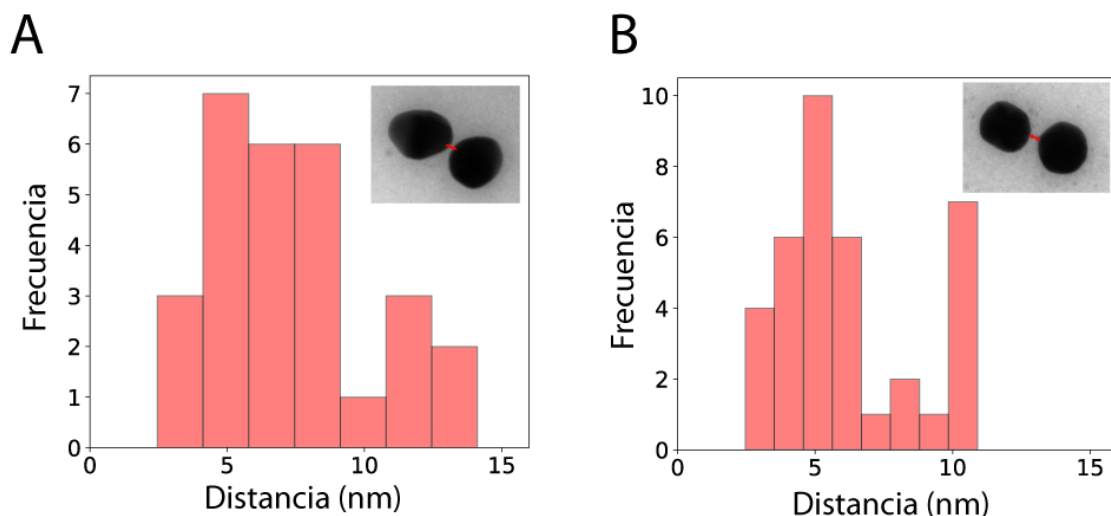


Figura 5. 20: distribuciones de distancias entre primeros vecinos de nanopartículas de oro medidas para (A) Au-pT + BLS-pA3' y (B) Au-pT + BLS-pA5'

Conclusiones parciales

A lo largo de este capítulo hemos evaluado diversas metodologías para caracterizar tanto de manera rápida como de manera más exhaustiva las características de nanopartículas bajo distintas condiciones. En particular el uso de espectroscopia UV-Vis y de dispersión dinámica de luz nos permitió hacer barridos de condiciones para la puesta a punto de estrategias de ensamblado de oligómeros basadas en BLS. Hemos probado dos estrategias diferentes:

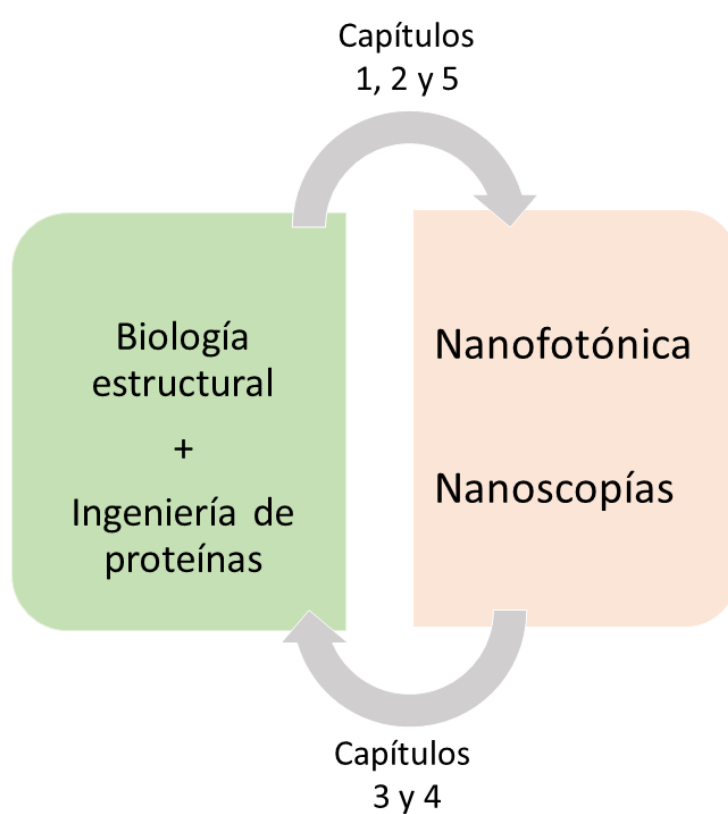
- ensamblado basado en la química del tioles y oro
- ensamblado basado en hibridización de oligonucleótidos

Ambas estrategias han demostrado funcionar para la formación de oligómeros de oro. A pesar de que los ensayos por DLS sugerían una proporción mayoritaria de dímeros, los estudios posteriores por microscopías electrónicas mostraron una mayor heterogeneidad de las muestras. Hemos mostrado que la impresión óptica seguida de SEM permite tener una buena idea de la proporción relativa de monómeros, dímeros, trímeros, etc. Sin embargo, la impresión óptica parecería ser muy agresiva para las proteínas, puesto que al analizarlas por SEM las

nanopartículas aparecen pegadas, sin espacio entre ellas. Por el contrario, cuando la muestra es preparada en suspensión y luego observada en TEM mediante un depósito en las grillas, en los oligómeros se observa un espacio entre nanopartículas cuyas dimensiones son compatibles con las del BLS.

A futuro, se propone buscar o bien condiciones que produzcan poblaciones más homogéneas, o bien utilizar una metodología que permita separar las poblaciones heterogéneas obtenidas.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS



Esta tesis parte de la búsqueda de encontrar puntos de intersección entre dos disciplinas científicas poco relacionadas entre sí: por un lado, la biología estructural sumada a la ingeniería de proteínas; y por otro lado la nanofotónica. Explorar dicha intersección habilita a introducir aporte de ambas disciplinas en sendas direcciones: En primer lugar, la ingeniería de proteínas puede ayudar a construir nanoestructuras con propiedades ópticas controladas. Los capítulos 1, 2 y 5 van en esa dirección. Por otro lado, los últimos desarrollos en nanoscopías, permiten responder preguntas relevantes en biología estructural de proteínas. Los capítulos 3 y 4 son algunos posibles ejemplos de esto último.

En el capítulo 1 se logró construir una caja proteica de pequeñas moléculas a partir de BLS. En particular se lograron incluir 2 fluoróforos de la misma familia (Cy3 y Cy5), ambos ampliamente usados en microscopías. Se caracterizó ambos tipos de construcciones tanto en “batch” como a nivel de partícula única. Se observaron algunos cambios en sus propiedades fotofísicas: espectros de absorbancia, intensidad de fluorescencia, tiempo de vida media. Los experimentos de partícula única permitieron evaluar algunas hipótesis que explicaban cambios en dichas propiedades.

A futuro es posible emplear esta caja de fluoróforos para construcción de nanosistemas con propiedades ópticas de interés. Por un lado si se lo combina con nanopartículas metálicas (capítulo 5) se podría construir nano-antenas ópticas^{254,260} o partículas super-fluorescentes^{261–265}. Por otro lado si se combinan distintos fluoróforos dentro y fuera de BLS, sería posible construir sistemas multicromofóricos^{266–270} que funcionen como modelos de estudio para aquellos observados en la naturaleza, tales como los complejos de fotosíntesis. Como antecedente, en un trabajo anterior¹¹⁵ hemos podido ensamblar estructuras multicromofóricas con Cy3 y Cy5 en posiciones externas de ambos pentámeros de BLS. La combinación de esos resultados como el de esta tesis, permite imaginar la construcción de complejos antena en los cuales diversos cromóforos pueden absorber luz y transferirla a un único centro de reacción.

En el capítulo 2 se intentó emplear un pentámero de BLS como estructura de andamiaje para realizar imágenes de súper-resolución por DNA-PAINT y FRET-PAINT. Este objetivo surge, por un lado, de un trabajo previo¹¹⁵ en el que habíamos empleado este pentámero para obtener imágenes por microscopía confocal de ácido siálico en células HeLa. Por otro lado, otros trabajos^{182–184} habían demostrado la obtención de imágenes de super-resolución por FRET-PAINT de estructuras sub-celulares. Lo novedoso de estos trabajos había sido la velocidad de adquisición alcanzada con esta estrategia. La hipótesis detrás de este nuevo objetivo era que BLS podía funcionar como una estructura versátil para marcado de estructuras celulares que a su permitiera acelerar los tiempos de adquisición de imágenes aún más que en trabajo previos, dada su estructura pentamérica que habilitaba no solo a eventos FRET intra-catenarios sino también entre cadenas *docking* de una misma partícula. Como prueba de concepto se intentó marcar filamentos de actina en células COS7. Si bien fue posible ensamblar y caracterizar la estructura de BLS capaz de reconocer actina, no fue posible obtener imágenes mejores ni acelerar sustancialmente los tiempos de adquisición en comparación con métodos existentes. Si bien la nueva estrategia permite aumentar la concentración de *imagers* en 2 o 3 órdenes de magnitud respecto a las concentraciones habituales de DNA-PAINT, el aumento en la velocidad de adquisición no aumenta proporcionalmente.

En el Capítulo 3 adaptamos una estrategia desarrollada previamente^{209,210} para medir movilidad y orientación relativa de un fluoróforo respecto a una estructura de andamiaje. La estrategia original consistía en combinar 2 tipos de microscopías para medir por separado orientaciones del fluoróforo (mediciones de moléculas individuales con polarización resuelta en el tiempo) y la orientación de la estructura de andamiaje (DNA-PAINT). El nuevo desafío respecto a los trabajos anteriores era que la estructura de andamiaje con la que trabajamos estaba en el orden del poder de resolución de la técnica, lo cual no permitía definir trivialmente la orientación de BLS. Resolver este problema es de importancia puesto que permitiría responder

preguntas biológicamente relevantes vinculadas a la orientación y movilidad de ligandos en cavidad proteicas. Haciendo un análisis de la forma de la nube de localizaciones de BLS pudimos definir la orientación de cada partícula y así obtener las orientaciones relativas entre el fluoróforo y la proteína. Se detectaron 2 orientaciones relativas preferenciales de Cy5 respecto a BLS, e incluso se observaron dinámicas de saltos moleculares entre las dos orientaciones. Llamativamente, las orientaciones detectadas experimentalmente concuerdan muy bien con orientaciones preferenciales obtenidas en simulaciones por dinámica molecular. Lo novedoso de estos resultados radica en que fue posible medir una propiedad estructural (orientación relativa de un ligando) de manera dinámica, en tiempo real y en condiciones compatibles con la vida (temperatura ambiente y en medio acuoso). Esto habilita un nuevo campo de interacción entre experimentos y simulaciones en condiciones comparables. Cabe destacar que estos resultados son en 2 dimensiones, por lo que el nuevo desafío será resolver las orientaciones en 3D. Para esto será necesario incorporar nuevas herramientas, de las cuales se hablará a continuación.

En el capítulo 4 comenzamos a explorar la combinación de 2 técnicas de nanoscopía que permiten acceder a resoluciones sub-10 nm en 3D (RESI²¹³ y SIMPLER²¹⁶) para medir distancias intramoleculares y la orientación de BLS. Ambas técnicas nunca se habían combinado aún para medir distancias intramoleculares en una proteína. Este se convierte en el segundo trabajo²²⁰ que permite medir distancias intramoleculares de proteínas por microscopía de súper-resolución en condiciones nativas. La ventaja de nuestro enfoque es que no necesita el uso de aminoácidos no naturales, lo cual lo hace más versátil de utilizar. Los resultados, aunque preliminares, son muy prometedores ya que se encontraron distancias compatibles con las esperadas. Además, fue posible determinar la orientación de cada proteína en la muestra. Esto posiciona a estas técnicas como una nueva estrategia para acceder a información estructural de “baja resolución” (si se las compara con cristalografía de rayos X, Cryo-EM o RMN), pero con la ventaja de realizarse en condiciones ambientales, en solución acuosa y además con información de la distribución de distancias, lo que permite detectar heterogeneidad

en la muestra. Por otro lado, teniendo desarrollada esta técnica, sería posible volver a los objetivos del capítulo 3 y obtener orientaciones relativas de fluoróforos en 3 dimensiones.

En el capítulo 5 nos propusimos usar BLS como andamiaje para fabricar dispositivos nanofotónicos. En particular estudiamos la fabricación de dímeros de nanopartículas de oro que funciona como efectivas nanoantenas ópticas. Si bien ya existen múltiples estrategias para realizar esto, tales como origamis de ADN^{271,272} u otros *linkers*^{273,274}, la versatilidad química de BLS promete múltiples aplicaciones. Se probaron 2 estrategias diferentes: la química de tiol-oro y el ensamblado mediado por oligonucleótidos. Si bien fue posible ensamblar oligómeros de oro con BLS de ambas maneras, en ningún caso fue posible obtener poblaciones homogéneas. Esto es algo común en las estrategias *bottom-up*, y se soluciona mediante pasos de purificación o de formación heterogéneos (p.e. ensamblando por pasos sobre una superficie).- Por cuestiones de tiempo no se pudo avanzar en esta dirección. De hacerse, el paso siguiente se habilitarían diversas oportunidades como trabajar con las formas pentamérica de BLS para:

1. controlar la formación de dímeros por pH
2. formar dímeros de nanopartículas distintos materiales, formas y tamaños
3. construir nano-antenas empleando fluoróforos atrapados, como lo obtenido en el capítulo 1

Hemos avanzado en realizar algunas pruebas en esta dirección que no se muestran en la tesis, dado que no fue posible ensamblar dímeros de oro a partir de las especies pentamérica de BLS. Parecería ser que la unión de dichas especies a las nanopartículas atenta contra la posterior formación del decámero. Esto podría deberse a cambios en la estructura misma de los pentámeros al unirse a las nanopartículas o a efectos electrostáticos que pueden afectar los puentes salinos necesarios para ensamblar a BLS.

De cada capítulo se desprenden nuevos caminos para explorar, y en algunos casos es posible cruzar los resultados obtenidos en 2 capítulos para abordar nuevos objetivos. Esta tesis muestra que seguir explorando la intersección entre ambas

disciplinas puede enriquecer tanto el diseño de nuevas nano-estructuras con propiedades ópticas, así como la aplicación de nanoscopías para resolver preguntas de biología estructural.

MATERIALES Y MÉTODOS

Variantes de BLS

Nombre	Variante de origen	Mutación	Estado de oligomerización	Cisteínas
BLS_{WT}	-	-	decamérica	N-terminal
BLS_{C5S}	BLS _{WT}	C5S	decamérica	NO
DR	BLS _{C5S}	H117D, H118D, D127R, A131R	Pentamérica	NO
KE	BLS _{C5S}	H117K, H118K, D127E, A131E	Pentamérica	NO
KE_{R88C}	KE	R88C	Pentamérica	Cavidad

Tabla M. 1: características de las mutantes empleadas en esta Tesis

Plásmidos y primers

Las vectores utilizados como templado y los generados en esta tesis están basados en el plásmido pET-11a (Figura M. 1)

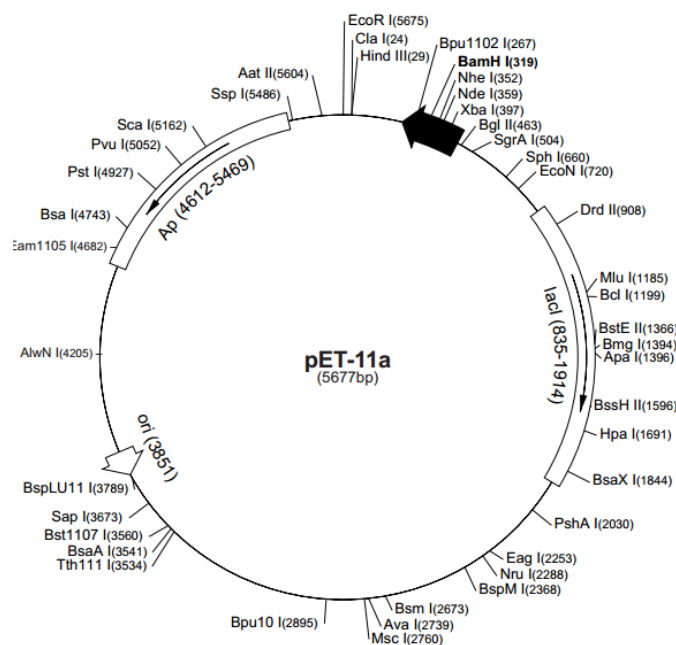


Figura M. 1: Mapa del plásmido pET-11a. Se indican las secuencias de resistencia a ampicilina (Ap), el origen de replicación (ori) y el sitio múltiple de clonado (flecha negra).

Construcción		Secuencia
KE	Fwd	GTCGTGCTGACGCCGAAGAAGTTCCATGAAAGCAAG
	Rev	CTTGCTTTTCATGGAACCTTCTCGGCGTCAGCACGAC
	Fwd	AGCAAGGAGCATCACGAATTCTTCCATGAACATTTCAAGGTGAAG
	Rev	CTTACCTTGAAATGTTTCATGGAAGAATTCGTGATGCTCCTTGCT
DR	Fwd	GTCGTGCTGACGCCGACGACTTCCATGAAAGCAAG
	Rev	CTTGCTTTTCATGGAAGTCGTCCGCGTCAGCACGAC
	Fwd	AGCAAGGAGCATCACCGCTTCTTCCATCGCCATTTCAAGGTGAAG
	Rev	CTTACCTTGAAATGGCGATGGAAGAAGCGTGATGCTCCTTGCT
KE_{R88C}	Fwd	GACGGCGGCATCTATTGTCATGATTCGTGGCG
	Rev	GTCGCCACGAAATCATGACAATAGATGCCGCC

Tabla M. 2 Primers utilizados durante esta tesis. Fwd: forward, Rev: reverse.

Oligonucleótidos

Nombre	uso	Secuencia (5'-3')	Modificación
Dock1	Orientación de BLS	ATTACTTCTTT	Tiol 3'
Im1	Orientación de BLS	AGAAGTAATG	ATTO 655 5'
Dock2	Orientación de BLS	ATCTACATATT	Tiol 3'
Im2	Orientación de BLS	TATGTAGATC	ATTO 655 5'
Dock1-6	FRET-PAINT	TTAAATCCTCATTACTTCTTT	Tiol 3'

Im6	FRET-PAINT		AGGATTTAA	Cy3b 5'
DockR1	RESI-SIMPLER		TCCTCCTCCTCCTCCTCCTTT	Tiol 3'
ImR1	RESI-SIMPLER		AGGAGGA	Cy3b 5'
DockR2	RESI-SIMPLER		ACCACCACCACCACCACCTT	Tiol 3'
ImR2	RESI-SIMPLER		TGGTGG	Cy3b 5'
pT	Oligómeros AuNPs	de	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Tiol 3'
pA5'	Oligómeros AuNPs	de	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	Tiol 5'
pA3'	Oligómeros AuNPs	de	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	Tiol 3'

Tabla M. 3: oligonucleótidos empleados en esta tesis. Se indican su secuencia, uso y modificaciones químicas.

Fluoróforos

fluoróforo	$\lambda_{\text{abs./ex}}$ (nm)	λ_{em} (nm)	ϵ ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	τ (ns)
Cy3	550	570	0.15	0.3
Cy3b	560	571	0.12	2.8
Cy5	649	666	0.25	1
Atto655	655	680	0.15	1.8

Tabla M. 4: características fotofísicas de los fluoróforos empleados en esta tesis

Nanopartículas de oro

Nombre	Diámetro (nm)	$\lambda_{\text{max abs.}}$ (nm)	$\epsilon^{400\text{nm}}$ ($\text{L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	[C] sc. Madre (pM)
Au20	20	524 nm	2.65	899
Au40	40	526 nm	2.65	100
Au60	60	544nm	2.65	37

Tabla M. 5: características de las nanopartículas de oro empleadas en esta tesis

Bioinformática

Mutagénesis in vitro y caracterización termodinámica

Se llevaron a cabo estudios de estabilidad termodinámica in silico y formación de complejos utilizando el programa FoldX¹⁶³ y el servidor BeAtMuSiC¹⁶². El modelo PDB 1XN1¹⁰³ se utilizó como plantilla para todas las mutaciones in silico de BLS. Las estructuras moleculares y sus densidades de electrones se representaron mediante los sistemas de gráficos moleculares PyMOL²⁷⁵ y VMD²⁷⁶.

Análisis de la cavidad

La estructura cristalográfica de BLS (entrada PDB 1XN1) se analizó con el servidor Voss Volume Voxelator¹⁶¹ para identificar posibles cavidades. Las representaciones de cavidades se realizaron con el programa UCSF Chimera²⁷⁷.

Dinámica molecular de fluoróforos sueltos y dentro de BLS

Comenzando con la estructura cristalina de BLS (PDB ID=X1N1), el residuo CYS₈₈ se mutó a CYF. Posteriormente se realizó una minimización de energía, seguida de una etapa de equilibrio (volumen constante). En esta fase, se emplearon los 100 ps iniciales para aumentar gradualmente la temperatura del sistema de 0 a 300 K. Posteriormente, se buscó otro equilibrio, seguido de una simulación a temperatura constante y presión constante de 250 ps para estabilizar la densidad del sistema. Se ejecutó una ejecución de producción dinámica de 100 ns (nstlim=50000000, dt=0,002).

Este protocolo se replicó tres veces, comenzando consistentemente desde la misma estructura inicial, pero asignando distintas velocidades iniciales aleatorias a los átomos. Todas las simulaciones se llevaron a cabo utilizando el paquete de programas Amber²⁷⁸, empleando el campo de fuerza ff99SB²⁷⁹. El procesamiento de trayectoria se realizó con el módulo Cpptraj²⁸⁰ del paquete AMBER.

Biología molecular

Cepas bacterianas y medios de cultivo

La cepa de *Escherichia coli* DH5 α (genotipo: F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169, hsdR17(*r*_K⁻ *m*_K⁺), λ ⁻) fue utilizada para clonados. La cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS (genotipo: F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(*r*_B⁻ *m*_B⁻) λ (DE3 (*lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5*) (*malB*⁺)_{K-12}(λ ^S) pLysS(*T7p20 ori*_{p15A})(Cm^R)) fue utilizada para expresión de proteínas.

Los medios de cultivo utilizados fueron LB (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl) líquido o sólido suplementado con 1,6% (p/v) agar. Los antibióticos ampicilina (Ap) y cloranfenicol (Cm) fueron utilizados en concentraciones finales de 100 μ g/ml y 30 μ g/ml, respectivamente. Las bacterias fueron crecidas a 37°C con agitación (250 rpm) para medio líquido.

Electroforesis en gel de agarosa

La separación de los fragmentos de ADN obtenidos por restricción, amplificación o extracción plasmídica fue realizada mediante electroforesis en geles de 0,8-2% (p/v) agarosa, conteniendo 1-2 μ g/ml de bromuro de etidio o sembrados con 1X Gel Red (Biotium). La corrida se realizó en buffer 0,5X TBE (45 mM Tris-borato/1 mM EDTA). Las imágenes de los geles fueron adquiridas mediante un equipo transiluminador UV y adquisición digital Universal Hood II (Bio-Rad).

Extracción de ADN plasmídico (miniprep)

El ADN plasmídico se extrajo de cultivos bacterianos empleando el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. El mismo se basa en la obtención del ADN por lisis alcalina. Brevemente, Se centrifugaron las bacterias crecidas ON, se resuspendió el *pellet* en buffer neutro con RNasa A y se agregó un volumen equivalente de buffer alcalino conteniendo dodecilsulfato sódico (SDS),

para la ruptura total de las células. Luego se neutralizó rápidamente la mezcla con un buffer ácido, se centrifugó la muestra y se descartó el *pellet* con el ADN genómico. El sobrenadante se pasó a una columna de sílica para centrífuga, la cual adsorbe el ADN que pasa por ella. Luego de los lavados, se eluyó el ADN utilizando un buffer alcalino con bajo contenido de sales.

Mutaciones sitio-dirigidas

Todas las mutaciones puntuales se introdujeron mediante una estrategia basada en PCR con polimerasa Q5. Se utilizaron *primers forward* y *reverse* conteniendo las mutaciones, siguiendo el protocolo de la Tabla M. 6. Ambos primers apareaban perfectamente con al menos 15 nucleótidos adyacentes a cada lado a los codones a ser mutados. Como templados se utilizaron vectores derivados del pET-11a.

Todos los productos de PCR (no metilados) fueron luego tratados con la enzima DpnI, la cual corta ADN metilado, durante 3 h a 37°C para digerir los vectores originales metilados no mutantes derivados de *miniprep*. Posteriormente se transformaron bacterias DH5α por electroporación y se plaquearon en LB agar con Ap. Al día siguiente se seleccionaron colonias individuales y se extrajo su ADN plasmídico. La presencia del plásmido se verificó por electroforesis en gel de agarosa, se cuantificó por absorbancia a 260 nm y se secuenciaron las muestras por la técnica de Sanger.

Componente	Volumen (μl)	Etapa	T (°C)	Tiempo (s)
Buffer Q5 (5X)	5	Desnaturalización inicial	98	30
Enhancer Q5 (5X)	5	Desnaturalización	98	25
Polimerasa Q5	0,5	Annealing	55-60	25
dNTPs (10 mM)	0,5	Extensión	72	20-30 s/kb
H ₂ O	11,75	Extensión final	72	120
Templado	1	x 18 ciclos		
Primers (10 mM clu)*	1,25			

Tabla M. 6: Protocolo de reacción de PCR con polimerasa de alta fidelidad y procesividad Q5. *PCR para inserción con megaprimer: 5 μl del mismo

Trasformación por electroporación

Se agregó 0,5-1,0 μ l (10-200 ng de ADN) de una solución del plásmido a 50 μ l de bacterias *E. coli* DH5 α o BL21(DE3)pLys electrocompetentes y se las colocó en a una cubeta de electroporación incubándolas por 10 min en hielo. Luego se electroporó en un equipo Gene Pulser (Bio-Rad) usando los parámetros de la Tabla M. 7. Inmediatamente, se agregaron 950 μ l de medio LB y se trasvasó el contenido a un tubo de 1,5 ml, incubándolo 45 min a 37°C en agitación, luego se esparcieron 100 μ l en placas LB con los antibióticos adecuados.

R (Ohm)	V(kV)	C (μ F)	τ (ms)
200	2,5	25	4 – 5

Tabla M. 7: Parámetros empleados para la electroporación de *E. coli*: resistencia (R), voltaje (V) y capacitancia (C). El tiempo τ de 4-5 ms medido corresponde a una electroporación exitosa.

Expresión y Purificación de proteínas

Los vectores que codifican BLS y sus variantes se transformaron en células *E. coli* BL21 (DE3). La expresión de proteínas se indujo durante el crecimiento exponencial (DO600 = 0,7) con 0,5 mM de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante la noche a 37°C. Luego, los cultivos bacterianos se sedimentaron a 9.000 g durante 15 min, se sometieron a ultrasonidos a 10 W durante 10 min y se ultracentrifugaron a 150.000 g durante 30 min. Posteriormente, la fracción soluble se incubó durante 15 minutos a 60°C y se centrifugó a 20000 g durante 30 minutos. La nueva fracción soluble se purificó usando una columna de Q-Sepharose (GE Healthcare Life Sciences) en un aparato de cromatografía líquida de rendimiento rápido (Gilson) con un gradiente lineal de NaCl 0-1 M en Tris 50 mM pH 8,0. Las muestras enriquecidas en proteína BLS (o mutantes) se purificaron adicionalmente en una columna Superdex-200 (GE Healthcare Life Sciences) en 50 mM Tris-HCl pH 8,0, tampón NaCl 0,25 M. Cada paso se controló mediante SDS-PAGE al 15%. Las proteínas BLS se concentraron hasta 1-10 mg / ml, se congelaron instantáneamente en N2 líquido y se almacenaron a -80 ° C para uso futuro.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Previamente las muestras de proteínas fueron resuspendidas en buffer de siembra con β -Me y calentadas a 95°C por 5 min. Luego fueron sometidas a 15% (p/v) SDS-PAGE (condiciones desnaturalizantes) utilizando un equipo mini-Protean II Cell (Biorad). Para preparar un gel 15% de poliacrilamida se mezclaron 5 ml de monómero, 2,5 ml de *Running Buffer* 4X, 2,4 ml de agua, 100 μ l de SDS 10% m/v, 50 μ l de APS 10% m/v y 5 μ l de TEMED. Para el *Stacking Buffer* se mezcló 440 μ l de monómero, 830 μ l de *Stacking Buffer* 4X, 2 ml de agua, 33 μ l de SDS 10% m/v, 17 μ l de APS 10% m/v y 2,5 μ l de TEMED.

La corrida se realizó en buffer Tank a 160 V por 1,5 h. Las proteínas fueron teñidas con una solución de *Coomassie blue* y decoloradas con solución decolorante. La composición de los buffers utilizados se detalla a continuación en la Tabla M. 8.

Composición de buffers	
4X Running Buffer (1,5 M Tris-HCl pH 8,8) 36,3g Tris-base 150 ml H ₂ O Llevar a pH 8,8 con HCl Llevar a 200 ml	4X Stacking Buffer (0,5 Tris-HCl pH 6,8) 3 g Tris 40 ml H ₂ O Llevar a pH 6,8 con HCl Llevar a 50 ml
Sc Monómero (acrilamida:bisacrilamida 30:0,8) Pesar en campana 58,4 g Acrilamida 1,6 g Bisacrilamida llevar a 200 ml con H ₂ O	Loading Buffer 1,2 g SDS 4 ml Glicerol 6 mg Azul de Bromofenol 2,5 ml <i>Stacking</i> buffer pH 6,8 Llevar a 10 ml con H ₂ O
Revelado por Coomassie blue <i>Coomassie brilliant blue</i> R-250 0,25% (p/v) en metanol: ácido acético: H ₂ O (40:10:30) decoloración metanol: ácido acético: H ₂ O (50:12:38)	Tank Buffer (1 litro) 30,3 g Tris-base 144 g Glicina 10 g SDS (agregar al final)

Tabla M. 8: Composición de buffers, geles, soluciones de corrida y de revelado para SDS-PAGE

Modificaciones químicas de BLS y ensamblado de complejos

Marcación de proteínas con fluoróforos

El protocolo general de marcación de cisteínas de BLS con fluoróforos-maleimida consistió en los siguientes pasos:

1. Se redujeron los tioles de la proteína con exceso de DTT, en una proporción 1:10 (2 hs, temperatura ambiente, pH7)
2. Se removió el exceso de reductor con una columna de desalado (microspin G-25, Cytiva)
3. Se incubó la proteína con exceso de fluoróforo, en una proporción 1:20 (toda la noche, 8°C, pH 7)
4. Se removió el exceso de fluoróforo con una columna de exclusión molecular (superdex S-200 analítica), monitoreando por absorbancia a 2 longitudes de onda (280 nm y máximo de absorbancia correspondiente a cada fluoróforo)

unión de oligonucleótidos de DNA a BLS

En todos los casos de unión de oligonucleótidos de DNA a variantes de BLS se empleó un *crosslinker* (NHS-PEG2-MAL). El mismo tiene la capacidad de unir covalentemente extremos N-terminales de la proteína al sustituyente éster-succinidil (NHS) y formar enlaces covalentes entre la maleimida (MAL) y el tiol de los oligonucleótidos. Este proceso se hace por etapas debido a que cada reacción tiene condiciones óptimas de temperatura, pH y tiempo de incubación diferentes. En resumen, los pasos a seguir fueron:

1. Se redujeron los tioles de los oligonucleótidos con exceso de DTT, en una proporción 1:10 (2 hs, temperatura ambiente, pH7)
2. Se removió el exceso de reductor con una columna de desalado (microspin G-25, Cytiva)
3. Se incubó la proteína con exceso de crosslinker, en una proporción 1:15 (1.30 hs, 8°C, pH 8)
4. Se removió el exceso de crosslinker con una columna de exclusión molecular de 7kDa (Zeba™, Thermo Fisher Scientific)
5. Se incubó la proteína-crosslinker con exceso de oligonucleótidos reducidos, en una proporción 15:1 (toda la noche, 8°C, pH 7)
6. Se removió el exceso de oligonucleótidos con una columna de filtración por centrifugación (Amicon™ -30kDa)

Formación de complejos de ORO-BLS

Para llevar adelante las reacciones con nanopartículas de oro se usaron viales de vidrios, los cuales fueron lavados previamente con agua regia y enjuagados con agua miliQ.

Para formar complejos de BLS con nanopartículas de oro se realizaron los siguientes pasos:

1. Se tomó la muestra de AuNPs en agua miliQ y se puso en agitación a 37°C
2. Se agregó *tween* a una concentración final 0,1%
3. Se agregó buffer fosfato a una concentración final 10 mM
4. Se agregó BLS en concentraciones molares cercanas a las de las AuNP
5. Se incubó en agitación por 1h a 37°C
6. Se centrifugó la muestra a 2000 RPM por 10 min
7. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en buffer fosfato
8. Se repitieron los pasos 6 y 7 5 veces
9. Se corrió la muestra en electroforesis en ge de agarosa 0,8% (buffer TBE 0,5x 90V durante 20')
10. Se cortó la banda correspondiente y se la re-suspendió en buffer fosfato.

Ensamblado y purificación de complejos AuNP-poliT con BLS-poliA

Las nanopartículas de oro de 60 nm de diámetro recubiertas por oligo-T fueron suministradas por el laboratorio de nano-sistemas fotónicos de la universidad de Friburgo, dirigido por el Dr. Guillermo Acuña. La muestra de BLS-poliA fue ensamblada siguiendo el protocolo explicado para unión de oligonucleótidos de DNA a BLS. Para el ensamblaje de AUNP-poliT con BLS-poliA, se co incubaron ambas muestras en buffer TAE 0,5x a distintas concentraciones de NaCl. Luego se corrió la muestra en electroforesis en ge de agarosa 0,8% (buffer TBE 0,5x 90V durante 20'). Se cortó la banda correspondiente y se la re-suspendió en buffer fosfato.

Técnicas espectroscópicas

Dispersión estática de luz (SLS)

El peso molecular (MW) de las proteínas en solución se determinó utilizando un instrumento de dispersión de luz Precision Detectors PD2010 conectado en tándem a un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Gilson, un detector de UV Waters 486 y un refractómetro diferencial LKB 2142. Las proteínas BLS (0,2-1 mg / ml) se analizaron en una columna Superdex 200 HR-10/30 (24 ml; GE Healthcare Life Sciences) y usando un tampón de elución isocrático (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,25 M) . Se midieron la luz dispersa a 90 °, la absorbancia UV a 280 nm y las señales del índice de refracción (RI). Los datos se analizaron con el software Discovery32 (Precision Detectors). El MW para cada muestra se calculó utilizando las señales SLS y RI, con albúmina de suero bovino (BSA) como patrón de calibración (66,5 kDa).

Las mediciones de SEC de complejos de proteína-colorante se realizaron usando la misma columna que en el ensayo SLS, pero con una HPLC acoplada a un detector de longitud de onda variable (Thermo-Scientific Dionex Ultimate 300).

Dispersión Dinámica de luz (DLS)

Las mediciones de distribución de tamaño por DLS y diámetro hidrodinámico (DH) se realizaron a 25 °C con un aparato Zetasizer Nano-S (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) utilizando una cubeta de cuarzo de bajo volumen. Las muestras de proteínas se diluyeron a 1 a 2 mg ml⁻¹ en los buffers correspondientes. Para cada muestra, se realizaron 10 corridas de 10 s. La distribución de tamaños por intensidad y diámetros hidrodinámicos se calculó utilizando el modelo de análisis de distribución estrecha múltiple del software DTS v.7.11 (Malvern Instruments).

Dicroísmo Circular (CD)

Los espectros de dicroísmo circular (CD) se controlaron en la región ultravioleta lejana usando un espectropolarímetro CD J-815. Se promediaron diez exploraciones para cada medición a 25 ° C. Los datos se recogieron con una velocidad de barrido de 100 nm min⁻¹ en una cubeta con una longitud de trayectoria

de 0,1 cm. Luego, los datos se convirtieron en elipticidad molar $[\theta]$ por dmol de proteína $[\text{mdeg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}]$. El despliegue térmico de BLSWT, BLSKE y BLSKE88C se realizó en tampón fosfato 50 mM pH 7,2, tampón NaCl 0,1 M grabando señales de CD a 222 nm en función de la temperatura. Las muestras se calentaron aumentando la temperatura a $4^\circ \text{C} / \text{min}$ con un sistema Peltier en el rango de $25\text{-}95^\circ \text{C}$ y las mediciones se realizaron a intervalos de $0,5^\circ \text{C}$. El enfriamiento rápido de nuevo a 25°C no mostró recuperación de la elipticidad, lo que indica la irreversibilidad del proceso. Por lo tanto, la T_m de la transición térmica en este trabajo se informa como T_m aparente y es la temperatura a la que se calcula la mitad de la diferencia entre las señales inicial y final a partir de un ajuste sigmoideo a los datos experimentales.

Espectroscopias de Absorbancia y Fluorescencia

Los ensayos espectroscópicos se realizaron en buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 250 mM, pH 8 a 25°C . En todos los casos, la concentración del fluoróforo se estableció en 1-2 μM .

Las medidas de absorción de UV-vis se realizaron en un espectrofotómetro (Modelo Cary 60, Agilent Technologies). Los ensayos de fluorescencia se realizaron con espectrofluorómetro (Jasco FP-6500) con un módulo Peltier de control de temperatura instalado y un módulo Polarizador. En ambos casos se utilizó una cubeta de cuarzo de 3 mm x 3 mm. Los espectros de excitación se realizaron a una longitud de onda de emisión de 670 nm. Los espectros de emisión se realizaron a una longitud de onda de excitación de 630 nm.

El ensayo de *quenching* de la fluorescencia se realizó en las mismas condiciones que antes en presencia de diferentes concentraciones de TCEP (0-12 mM). La emisión de fluorescencia se controló a 662 nm.

Las mediciones de anisotropía en estado estacionario se realizaron en las mismas condiciones de concentración y tampón que antes. La emisión de fluorescencia se midió mediante una configuración de dos canales, donde los componentes de

emisión paralelos y perpendiculares se detectan simultáneamente. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 650 nm y 670 nm respectivamente. Para cada caso se realizaron 20 mediciones.

Las mediciones de tiempo de vida media se realizaron en un espectrofluorímetro de conteo de fotones de picosegundos Horiba TBX-4. Cy3 se excitó con un láser pulsado Nanoled N09 de 560 nm y Cy5 con un láser pulsado Nanoled N02 de 650 nm. La detección se realizó utilizando un filtro OG690 para Cy3 y un filtro RG670 para Cy5. Los resultados de la vida útil se procesaron utilizando el software FAST (Versión 3.1, Edinburgh Instruments Ltd) y se ajustaron a una función de caída exponencial única.

Microscopías

Preparación de superficies e inmovilización de muestras

Las muestras se prepararon en cubreobjetos con cámara Lab-Tek II (Nunc), previamente tratados con KOH 1 M, y una solución acuosa al 0,48% (v / v) de cloruro de poli (dialildimetilamonio) (Sigma Aldrich). Luego, los cubreobjetos se trataron durante 5 min con Cy5 (100 pM en tampón PBS) o 10 s con KECy5 o KECy5 + DR (10 pM en tampón PBS) y se lavaron 10 veces con tampón PBS. Cada muestra se incubó con tampón de imagen (para estabilizar el parpadeo y evitar el fotoblanqueo) que contenía Tris 50 mM pH 8, NaCl 10 mM, glucosa al 10% (p / v), mercaptoetilamina 100 mM, 1 mg ml⁻¹ glucosa oxidasa, 0,5 mg ml⁻¹ catalasa y Trolox 2 mM (Acros Organics, Fisher Scientific).

Microscopía de campo amplio de molécula única

Los videos de epifluorescencia de campo amplio se llevaron a cabo utilizando un microscopio construido en casa alrededor de un cuerpo Olympus IX-73. Las imágenes se adquirieron con un objetivo de inmersión en aceite Olympus PlanApo

60x NA 1.42. El modo de iluminación de reflexión interna total (TIRF) se habilitó moviendo una platina lineal (Thorlabs) para que el enfoque de los láseres se trasladara lateralmente dentro del plano focal posterior del objetivo. La emisión de fluorescencia de Cy5 se filtró con un filtro de emisión de paso de banda (Chroma ET700 / 75m) y se fotografió en una cámara EMCCD operada a -50 ° C (Andor iXon3 897). La cámara y los láseres se controlaron con el software personalizado descrito anteriormente.⁴⁶ Se utilizó un láser de 642 nm y 1,5 W (MPB Communications, 2RU / VFL / P / 1500/642) para la excitación por fluorescencia de Cy5. El láser se centró en el plano focal posterior del objetivo. Se realizó un bloqueo adicional de los láseres de iluminación con un filtro de muesca de múltiples bordes (Semrock NF03-05 / 488/532 / 635E). La densidad de potencia del láser utilizada durante la adquisición fue de 610 W cm⁻². Se utilizó una ganancia de preamplificador de 5,1 y una ganancia de EM de 20 en la cámara CCD. Se observaron diferentes regiones de 256 × 256 píxeles (~290 μm²) utilizando tiempos de exposición de 100 ms.

Microscopía de molécula única con luz polarizada y cálculo de orientación del dipolo de Cy5 en el plano

Se utilizó el software Picasso para localizar emisores individuales. Para obtener la orientación del dipolo de absorción del fluoróforo, se extrajeron y representaron trazas del tiempo de fluorescencia de cada molécula localizada en función del ángulo de polarización de la luz de excitación. Para determinar el tiempo de inicio de la rotación de polarización (a este tiempo lo llamamos t_0), aprovechamos que había agregados de nanopartículas de oro entre las partículas esféricas utilizadas para la corrección de la deriva y analizamos la modulación de intensidad de estos agregados. Como se muestra en la Figura S15, estas trazas muestran una intensidad estable antes de que la dirección de polarización de la luz de excitación comience a girar, y una vez que comienza la rotación, la intensidad fluctúa siguiendo la ley de Malus. Detectamos automáticamente t_0 calculando la diferencia de intensidad en cada momento con la intensidad en un momento posterior, definido por el parámetro de "retraso", y detectando el momento en el que esta diferencia es

mayor que un umbral determinado, definido como tres veces el ruido de la señal (llamado σ en la Figura S15). Calculamos t_0 como el valor medio obtenido de las diferentes nanopartículas presentes en cada campo de visión. Una vez obtenido este valor, lo asignamos a $\theta=0$. A continuación, analizamos las trazas de tiempo correspondientes a Cy5. Para ello, realizamos un análisis de ventana móvil, con una ventana de tiempo que correspondía a un ciclo de rotación y un desplazamiento de medio ciclo. Ajustamos la señal de cada ciclo a $I = \bar{I} [1 + MA \cos^2(\omega t - \varphi_{Cy5})]$, donde $\bar{I}$ es la intensidad promedio de la traza $\bar{I} = (I_{max} + I_{min})/2$, $MA = (I_{max} - I_{min})/(I_{max} + I_{min})$ es la amplitud de modulación, y φ_{Cy5} la orientación en el plano del fluoróforo en relación con las coordenadas del microscopio. Del ajuste, tomamos φ_{Cy5} desde el ángulo asociado al primer valor máximo del ajuste (correspondiente a la dirección de polarización de la luz de excitación paralela al dipolo de absorción. También recuperamos MA e $\bar{I}$. Solo los ajustes que cumplieron las siguientes condiciones se tuvieron en cuenta:

- I. $R^2 > 0.6$
- II. $MA > 0.2$
- III. $\bar{I} = \mu_I - 3 * \sigma_I$, donde μ_I y σ_I son los valores de desviación estándar y media obtenidos de la distribución de intensidad de fluorescencia de todas las moléculas desde un campo de visión determinado.

La primera condición está relacionada con la calidad del ajuste, mientras que la segunda se usa para filtrar partículas con alta movilidad y la tercera se usa para mantener partículas con el dipolo de absorción de Cy5 en el plano de muestra.

DNA-PAINT y FRET-PAINT

Para obtener imágenes de DNA-PAINT y FRET-PAINT se empleó un microscopio de campo oscuro. se agregaron hebras imager al buffer de visualización, complementarias a las hebras docking de cada muestra. concentración final fue de 2 nM en el caso de análisis de molécula única y 0,2 nM en el caso de imágenes de estructuras celulares. La iluminación fue reflexión total interna (TIRF) y de

polarización circular. La longitud de onda del láser de excitación fue de 642 nm (para hebras imager con Atto655) o 535 nm (para hebras imager con Cy3b). La densidad de potencia se ajustó siempre a 2,97 kW/cm². Los filtros de detección fueron Chroma ET700/75m y 582/75 respectivamente. Para los experimentos de FRET-PAIT se empleó el filtro 725/40 en lugar de ET700/75m. Se utilizó una ganancia de preamplificador de 5,1 y una ganancia de EM de 20 en la cámara CCD. Se observaron diferentes regiones de 256 × 256 píxeles (~290 μm²) utilizando tiempos de exposición de 100 ms.

análisis de DNA-PAINT y cálculo de orientación de BLS en el plano

Para obtener la orientación BLS de los grupos de localización DNA-PAINT, primero se corrigió la deriva de la muestra utilizando nanopartículas de oro como marcadores fiduciarios. Se identificaron grupos de localización y se extrajeron trazas temporales de cada uno. Para distinguir los clústeres de localización de BLS y Fab, aprovechamos el diferente ciclo de trabajo temporal esperado para cada caso, definido como $DC = \frac{t_{on}}{t_{on}+t_{off}}$, donde t_{on} y t_{off} son los tiempos de luz y oscuridad, respectivamente. Se esperaba que las partículas de BLS dieran más eventos de unión y, por lo tanto, ciclos de trabajo más grandes debido a la mayor cantidad de hebras de acoplamiento presentes en BLS en comparación con los fragmentos Fab. Para clasificar cada grupo de localización como una partícula BLS o Fab, elegimos un umbral de ciclo de trabajo, calculado como $\mu_{DC,BLS} - 2 * \sigma_{DC,BLS}$, siendo $\mu_{DC,BLS}$ y $\sigma_{DC,BLS}$ los valores de desviación estándar y media del ajuste gaussiano correspondientes al ciclo de trabajo de BLS. Luego, las formas de los grupos de BLS se ajustaron a una elipse de confianza y la orientación de las proteínas se obtuvo a partir de la orientación del eje principal de las elipses.

Calibración del método de SIMPLER

Como se dijo anteriormente, para poder obtener posiciones en Z mediante SIMPLER es necesario realizar una calibración previa del número de fotones obtenidos en la superficie de portaobjeto, depositando el fluoróforo sobre el mismo. Dado que en este experimento nos importaba medir distancias intramoleculares

muy pequeñas, introdujimos una variación al protocolo original: en vez de calcular el numero de fotones promedio en la superficie (N_0), usamos como N_0 de cada partícula, los correspondientes al cluster (pentámero) mas cercano a la superficie (el cluster que emitía más fotones).

Los parámetros del set up y las condiciones experimentales se muestran en la Tabla M. 9

Parámetro	valor
NA	1.42
θ (°)	67.5
λ (nm)	532
Potencia (mW)	8
α_F	0.957
d_F	84.815

Tabla M. 9: parámetros de las condiciones experimentales empleadas para la calibración de SIMPLER. NA= apertura numérica; θ =Angulo TIRF; λ = longitud de onda de excitación; α_F y d_F = parametros ajustados para esta condición experimental.

Análisis de RESI+SIMPLER

Para combinar el análisis de estas dos técnicas se realizaron los siguientes pasos:

- 1) se obtuvieron las localizaciones x,y a partir del video
- 2) se obtuvo z a partir del número de fotones de cada localización, empleado el algoritmo de SIMPLER. En este punto, se descartaron las localizaciones cuyo evento de unión dura 1 o 2 cuadros. Además, de las localizaciones empleadas, se descartaron el primer y el último cuadro ya que el número de fotones obtenidos en cada evento puede ser menor al promedio de fotones obtenido por cuadro y eso incluiría un error indeseado.

- 3) Ya teniendo (x,y,z) se corrió DBSCAN 3D²⁸¹, para hallar clusters en 3D ($\epsilon=10$ nm ; pts=5) Este método permite agrupar localizaciones en base a dos parámetros: ϵ , que refiere al radio de búsqueda de puntos vecinos desde cada punto “núcleo” (en nuestro caso usamos 10 nm) y minpts, que refiere al número mínimo de puntos que se requiere para formar un cluster (en nuestro caso se consideró 5 como el mínimo de localizaciones por cluster).
- 4) el centro de cada clúster fue calculado como la mediana de x,y,z de todas las localizaciones del cluster.

Impresión óptica de nanopartículas

Tanto para la impresión óptica o depósito electrostático de nanopartículas coloidales, previamente deben funcionalizarse a los sustratos mediante una deposición capa por capa de polielectrolitos.

Como las NPs están cargadas, para evitar el depósito espontáneo de las mismas en los sustratos durante la impresión óptica, se debe funcionalizar a los sustratos con carga de igual tipo de las NPs.

Durante la tesis se utilizaron sustratos de vidrio (Paul Marientfeld), que previamente se limpiaron. Los pasos para su preparación son los siguientes:

1. Limpieza mediante los siguientes pasos: sonicación durante 10 min en Hellmanex (0,2 % v/v), enjuague completo con agua MilliQ, enjuague con acetona, secado a 80 °C y limpieza con plasma durante 3 min a potencia de 75.
2. Para obtener una superficie cargada negativamente: sumergir a los sustratos del paso 2) durante 15 min en una solución de 1 mg/mL en NaCl 0,5 M de poliestireno sulfonato de sodio (PSS, Sigma Aldrich, Mw = 70.000), seguido de un enjuague final abundante en Milli- Q agua.
3. Par imprimir las muestras de BLS-AuNP, se hizo una grilla de 12x15. Empleamos un láser de 535 nm a una potencia de 2,2 mW. El umbral de impresión (mínimo valor del cociente entre la señal de dispersión en el fotodiodo una vez impresa la NP y la señal antes de que se imprima -del sustrato-) fue de 1,4.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las medidas se realizaron en un equipo SEM ZEISS LEO 982 GEMINI (CMA, FCEN – UBA). Se midió directamente sobre las grillas impresas en vidrio. Las micrografías obtenidas fueron analizadas mediante el programa *ImageJ*.

Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)

Las medidas se realizaron en un equipo Philips *EM301* operado a 60kV (CMA, FCEN – UBA). Para preparar la muestra se lavó la solución de BLS-AuNP 3 veces con agua miliQ y se sembraron 5 ul de muestra en placas de cobre cubierto de carbón. Se dejó secar la muestra con una lámpara de calor y se llevó al TEM. Las micrografías obtenidas fueron analizadas mediante el programa *ImageJ*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Feynman RP. Plenty of Room at the Bottom. 1959.
2. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*. 2020;25(1):112. doi:10.3390/MOLECULES25010112
3. Abid N, Khan AM, Shujait S, et al. Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review. *Adv Colloid Interface Sci*. 2022;300:102597. doi:10.1016/J.CIS.2021.102597
4. Biswas A, Bayer IS, Biris AS, Wang T, Dervishi E, Faupel F. Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects. 2011. doi:10.1016/j.cis.2011.11.001
5. Ingram VM. The birth of molecular biology. *Nat* 2002 4196908. 2002;419(6908):669-670. doi:10.1038/419669a
6. Morange M, Bynum W. A History of Molecular Biology. *Nat Med* 1999 52. 1999;5(2):140-140. doi:10.1038/5498
7. Carugo O, Djinić-Carugo K. Structural biology: A golden era. *PLOS Biol*. 2023;21(6):e3002187. doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.3002187
8. Curry S. Structural Biology: A Century-long Journey into an Unseen World. *Interdiscip Sci Rev*. 2015;40(3):308-328. doi:10.1179/0308018815Z.000000000120
9. Medical Nanotechnology and Nanomedicine - Harry F. Tibbals - Google Libros. https://books.google.com.ar/books?hl=es&lr=&id=pgIEDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT21&dq=biotechnology+and+nanotechnology+history&ots=HSZdIxV7TZ&sig=vr0NwLqNepqDGhBw6yysCBif6tE&redir_esc=y#v=onepage&q=biotechnology+and+nanotechnology+history&f=false. Accessed July 21, 2024.
10. Assidi M, Buhmeida A, Budowle B. Medicine and health of 21st Century: Not just a high biotech-driven solution. *npj Genomic Med* 2022 71. 2022;7(1):1-7. doi:10.1038/s41525-022-00336-7
11. Evangel Chinyere Anyanwu, Jeremiah Olawumi Arowoogun, Ifeoma Pamela Odilibe, Opeoluwa Akomolafe, Chinyere Onwumere, Jane Osareme Ogugua. The role of biotechnology in healthcare: A review of global trends. *World J Adv Res Rev*. 2024;21(1):2740-2752. doi:10.30574/WJARR.2024.21.1.0382
12. Vasil IK. A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. doi:10.1007/s00299-008-0571-4
13. Landry MP, Dispenza C, Ambrosone A, Sanzari I, Leone A. Nanotechnology in Plant Science: To Make a Long Story Short. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7:452012. doi:10.3389/FBIOE.2019.00120
14. Murphy DJ. Overview of Applications of Plant Biotechnology. *Handb Plant Biotechnol*. March 2004. doi:10.1002/0470869143.KC002
15. Tang WL, Zhao H. Industrial biotechnology: tools and applications. *Biotechnol J*. 2009;4(12):1725-1739. doi:10.1002/BIOT.200900127
16. Roco MC. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Curr Opin Biotechnol*. 2003;14:337-346. doi:10.1016/S0958-1669(03)00068-5

17. Kaur K, Thombre R. Nanobiotechnology: methods, applications, and future prospects. *Nanobiotechnology Microbes Plant Assist Synth Nanoparticles, Mech Appl*. January 2021;1-20. doi:10.1016/B978-0-12-822878-4.00001-8
18. Contera S, De La Serna JB, Tetley TD. Biotechnology, nanotechnology and medicine. *Emerg Top Life Sci*. 2020;4(6):551. doi:10.1042/ETLS20200350
19. Surface Design: Applications in Bioscience and Nanotechnology - Google Libros. https://books.google.com.ar/books?hl=es&lr=&id=cvn5l-QytVIC&oi=fnd&pg=PR13&dq=biological+functionalization+nano+surface&ots=19RCEIzuLC&sig=irIvWgE8SOVhKIHuNzksL1r9-Sc&redir_esc=y#v=onepage&q=biological functionalization nano surface&f=false. Accessed July 21, 2024.
20. Subbiah R, Veerapandian M, Yun KS. Nanoparticles: Functionalization and Multifunctional Applications in Biomedical Sciences. *Curr Med Chem*. 2010;17:4559-4577.
21. Arruebo M, Valladares M, González-Fernández Á. Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications. *J Nanomater*. 2009;2009(1):439389. doi:10.1155/2009/439389
22. Ansari SA, Husain Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. 2011. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.005
23. Yang Q, Zhao J, Muhammad A, et al. Biopolymer coating for particle surface engineering and their biomedical applications. 2022. doi:10.1016/j.mtbio.2022.100407
24. Nicolson F, Ali A, Kircher MF, et al. DNA Nanostructures and DNA-Functionalized Nanoparticles for Cancer Theranostics. *Adv Sci*. 2020;7(23):2001669. doi:10.1002/ADVS.202001669
25. Zhang S. Emerging biological materials through molecular self-assembly.
26. Sahl SJ, Hell SW, Jakobs S. Fluorescence nanoscopy in cell biology. *Nat Publ Gr*. 2017;18. doi:10.1038/nrm.2017.71
27. Seeman NC. DNA in a material world. *Nat* 2003 4216921. 2003;421(6921):427-431. doi:10.1038/nature01406
28. Rothemund PWK. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nat* 2006 4407082. 2006;440(7082):297-302. doi:10.1038/nature04586
29. Saccà B, Niemeyer CM. DNA Origami: The Art of Folding DNA. *Angew Chemie Int Ed*. 2012;51(1):58-66. doi:10.1002/ANIE.201105846
30. Dey S, Fan C, Gothelf K V., et al. DNA origami. *Nat Rev Methods Prim* 2021 11. 2021;1(1):1-24. doi:10.1038/s43586-020-00009-8
31. Hong F, Zhang F, Liu Y, Yan H. DNA Origami: Scaffolds for Creating Higher Order Structures. *Chem Rev*. 2017;117(20):12584-12640. doi:10.1021/ACS.CHEMREV.6B00825
32. He Y, Ye T, Su M, et al. Hierarchical self-assembly of DNA into symmetric supramolecular polyhedra. *Nat* 2008 4527184. 2008;452(7184):198-201.

doi:10.1038/nature06597

33. Lin T, Yan J, Ong LL, et al. Hierarchical Assembly of DNA Nanostructures Based on Four-Way Toehold-Mediated Strand Displacement. *Nano Lett.* 2018;18(8):4791-4795. doi:10.1021/ACS.NANOLETT.8B01355
34. Schreiber R, Do J, Roller EM, et al. Hierarchical assembly of metal nanoparticles, quantum dots and organic dyes using DNA origami scaffolds. *Nat Nanotechnol* 2013 91. 2013;9(1):74-78. doi:10.1038/nnano.2013.253
35. He Z, Shi K, Li J, Chao J. Self-assembly of DNA origami for nanofabrication, biosensing, drug delivery, and computational storage. doi:10.1016/j.isci
36. Zhang Q, Jiang Q, Li N, et al. DNA origami as an in vivo drug delivery vehicle for cancer therapy. *ACS Nano.* 2014;8(7):6633-6643. doi:10.1021/NN502058J
37. Jiang Q, Liu S, Liu J, Wang ZG, Ding B. Rationally Designed DNA-Origami Nanomaterials for Drug Delivery In Vivo. *Adv Mater.* 2019;31(45):1804785. doi:10.1002/ADMA.201804785
38. Guan C, Zhu X, Feng C. DNA Nanodevice-Based Drug Delivery Systems. *Biomolecules.* 2021;11(12). doi:10.3390/BIOM11121855
39. Selnihhin D, Sparvath SM, Preus S, Birkedal V, Andersen ES. Multifluorophore DNA Origami Beacon as a Biosensing Platform. *ACS Nano.* 2018;12(6):5699-5708. doi:10.1021/ACS.NANO.8B01510/SUPPL_FILE/NN8B01510_SI_001.PDF
40. Wang S, Zhou Z, Ma N, et al. DNA Origami-Enabled Biosensors. *Sensors (Basel).* 2020;20(23):1-18. doi:10.3390/S20236899
41. Raveendran M, Lee AJ, Sharma R, Wälti C, Actis P. Rational design of DNA nanostructures for single molecule biosensing. *Nat Commun* 2020 111. 2020;11(1):1-9. doi:10.1038/s41467-020-18132-1
42. Mehmandoust S, Eskandari V, Karooby E. A Review of Fabrication of DNA Origami Plasmonic Structures for the Development of Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Platforms. *Plasmonics.* 2024;19(3):1131-1143. doi:10.1007/S11468-023-02064-9/METRICS
43. Shen B, Kostianen MA, Linko V. DNA Origami Nanophotonics and Plasmonics at Interfaces. *Langmuir.* 2018;34(49):14911-14920. doi:10.1021/ACS.LANGMUIR.8B01843/ASSET/IMAGES/LARGE/LA-2018-018438_0009.JPEG
44. Dass M, Gür FN, Kołataj K, Urban MJ, Liedl T. DNA Origami-Enabled Plasmonic Sensing. *J Phys Chem C.* 2021;125(11):5969-5981. doi:10.1021/ACS.JPCC.0C11238/ASSET/IMAGES/LARGE/JP0C11238_0005.JPEG
45. Siti W, Too HL, Anderson T, Liu XR, Loh IY, Wang Z. Autonomous DNA molecular motor tailor-designed to navigate DNA origami surface for fast complex motion and advanced nanorobotics. *Sci Adv.* 2023;9(38). doi:10.1126/SCIADV.ADI8444
46. Rothfischer F, Vogt M, Kopperger E, Gerland U, Simmel FC. From Brownian to Deterministic Motor Movement in a DNA-Based Molecular Rotor. 2024. doi:10.1021/acs.nanolett.4c00675

47. Tokura Y, Harvey S, Xu X, et al. Polymer tube nanoreactors via DNA-origami templated synthesis. *Chem Commun.* 2018;54(22):2808-2811. doi:10.1039/C7CC09620H
48. Linko V, Eerikäinen M, Kostianen MA. A modular DNA origami-based enzyme cascade nanoreactor. *Chem Commun (Camb).* 2015;51(25):5351-5354. doi:10.1039/C4CC08472A
49. Fu Y, Zeng D, Chao J, et al. Single-step rapid assembly of DNA origami nanostructures for addressable nanoscale bioreactors. *J Am Chem Soc.* 2013;135(2):696-702. doi:10.1021/JA3076692
50. Yeşilyurt ATM, Huang JS. Emission Manipulation by DNA Origami-Assisted Plasmonic Nanoantennas. *Adv Opt Mater.* 2021;9(21):2100848. doi:10.1002/ADOM.202100848
51. Hanke M, Tomm E, Grundmeier G, Keller A. Effect of Ionic Strength on the Thermal Stability of DNA Origami Nanostructures. *ChemBioChem.* 2023;24(12):e202300338. doi:10.1002/CBIC.202300338
52. Li L, Nie S, Du T, Zhao J, Chen X. DNA origami technology for biomedical applications: Challenges and opportunities. *MedComm – Biomater Appl.* 2023;2(2):e37. doi:10.1002/MBA2.37
53. Linko V, Keller A. Stability of DNA Origami Nanostructures in Physiological Media: The Role of Molecular Interactions. *Small.* 2023;19(34):2301935. doi:10.1002/SMLL.202301935
54. Ma W, Zhan Y, Zhang Y, Mao C, Xie X, Lin Y. The biological applications of DNA nanomaterials: current challenges and future directions. doi:10.1038/s41392-021-00727-9
55. Tian T, Li Y, Lin Y. Prospects and challenges of dynamic DNA nanostructures in biomedical applications. *Bone Res* 2022 101. 2022;10(1):1-15. doi:10.1038/s41413-022-00212-1
56. Rajendran A, Endo M, Katsuda Y, Hidaka K, Sugiyama H. Photo-cross-linking-assisted thermal stability of DNA origami structures and its application for higher-temperature self-assembly. *J Am Chem Soc.* 2011;133(37):14488-14491. doi:10.1021/JA204546H/SUPPL_FILE/JA204546H_SI_001.PDF
57. Ramakrishnan S, Schärffen L, Hunold K, et al. Enhancing the stability of DNA origami nanostructures: staple strand redesign versus enzymatic ligation. *Nanoscale.* 2019;11(35):16270-16276. doi:10.1039/C9NR04460D
58. Gavrilovi S, Andreas Brüggenthies G, Moritz Weck J, et al. Protein-Assisted Large-Scale Assembly and Differential Patterning of DNA Origami Lattices. *Small.* 2024;20(24):2309680. doi:10.1002/SMLL.202309680
59. Paoli M. Protein folds propelled by diversity. *Prog Biophys Mol Biol.* 2001;76:103-130.
60. Overview of Protein Structural and Functional Folds INTRODUCTION TO PROTEIN STRUCTURE. 2004. doi:10.1002/0471140864.ps1701s35
61. Ferreon C, Chris A, Ferreon M, Trivedi R, Nagarajaram HA. Intrinsically Disordered Proteins: An Overview. 2022. doi:10.3390/ijms232214050

62. Intrinsically disordered proteins: critical components of the wetware | Enhanced Reader.
63. Marsh JA, Teichmann SA. Structure, dynamics, assembly, and evolution of protein complexes. *Annu Rev Biochem.* 2015;84:551-575. doi:10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060614-034142
64. Protein Dimerization and Oligomerization in Biology.
65. Klemm JD, Schreiber SL, Crabtree GR. DIMERIZATION AS A REGULATORY MECHANISM IN SIGNAL TRANSDUCTION. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:569-592.
66. Amoutzias GD, Robertson DL, Van De Peer Y, Oliver SG. Choose your partners: dimerization in eukaryotic transcription factors. doi:10.1016/j.tibs.2008.02.002
67. Mateu MG. Assembly, stability and dynamics of virus capsids. 2012. doi:10.1016/j.abb.2012.10.015
68. Louten J. Virus Structure and Classification. *Essent Hum Virol.* 2016;19. doi:10.1016/B978-0-12-800947-5.00002-8
69. Pollard TD, Goldman RD. Overview of the Cytoskeleton from an Evolutionary Perspective. doi:10.1101/cshperspect.a030288
70. Wickstead B, Gull K. The evolution of the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 2011;194(4):513-525. doi:10.1083/JCB.201102065
71. Sapsford KE, Algar WR, Berti L, et al. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: Developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chem Rev.* 2013;113(3):1904-2074. doi:10.1021/CR300143V/SUPPL_FILE/CR300143V_SI_001.PDF
72. Solanki R, Rostamabadi H, Patel S, Jafari SM. Anticancer nano-delivery systems based on bovine serum albumin nanoparticles: A critical review. *Int J Biol Macromol.* 2021;193:528-540. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2021.10.040
73. Lamichhane S, Lee S. Albumin nanoscience: homing nanotechnology enabling targeted drug delivery and therapy. *Arch Pharmacol Res* 2020 431. 2020;43(1):118-133. doi:10.1007/S12272-020-01204-7
74. Yoon DJ, Jackman BK, Ju H, et al. Distinct Binding Properties of Neutravidin and Streptavidin Proteins to Biotinylated Supported Lipid Bilayers: Implications for Sensor Functionalization. *Sensors* 2022, Vol 22, Page 5185. 2022;22(14):5185. doi:10.3390/S22145185
75. Arruebo M, Valladares M, González-Fernández Á. Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications. *J Nanomater.* 2009;2009(1):439389. doi:10.1155/2009/439389
76. Hillman Y, Lustiger D, Wine Y. Antibody-based nanotechnology. *Nanotechnology.* 2019;30(28):282001. doi:10.1088/1361-6528/AB12F4
77. PDB Statistics: Protein-only Structures Released Per Year. <https://www.rcsb.org/stats/growth/growth-protein>. Accessed July 24, 2024.
78. Baek M, Park T, Heo L, Park C, Seok C. GalaxyHomomer: a web server for protein homo-oligomer structure prediction from a monomer sequence or structure. *Nucleic*

Acids Res. 2017;45(Web Server issue):W320. doi:10.1093/NAR/GKX246

79. Schweke H, Pacesa M, Levin T, et al. An atlas of protein homo-oligomerization across domains of life In brief An atlas of protein homo-oligomerization across domains of life. doi:10.1016/j.cell.2024.01.022
80. Xu Q, Dunbrack RL. The protein common assembly database (ProtCAD)-a comprehensive structural resource of protein complexes. *Nucleic Acids Res.* 2023;51. doi:10.1093/nar/gkac937
81. Tsai C-J, Zheng J, Alemá C, Nussinov R. Structure by design: from single proteins and their building blocks to nanostructures. *Opin TRENDS Biotechnol.* 24(10). doi:10.1016/j.tibtech.2006.08.004
82. Jutz G, Böker A. Bionanoparticles as functional macromolecular building blocks e A new class of nanomaterials. 2010. doi:10.1016/j.polymer.2010.11.047
83. Kuan SL, Bergamini FRG, Weil T. Functional protein nanostructures: a chemical toolbox. *Chem Soc Rev.* 2018;47(24):9069-9105. doi:10.1039/C8CS00590G
84. Yeates TO, Padilla JE. Designing supramolecular protein assemblies. *Curr Opin Struct Biol.* 2002;12(4):464-470. doi:10.1016/S0959-440X(02)00350-0
85. Yeates TO, Liu Y, Laniado J. The design of symmetric protein nanomaterials comes of age in theory and practice. *Curr Opin Struct Biol.* 2016;39:134-143. doi:10.1016/J.SBI.2016.07.003
86. Zhang S, Marini DM, Hwang W, Santoso S. Design of nanostructured biological materials through self-assembly of peptides and proteins. *Curr Opin Chem Biol.* 2002;6(6):865-871. doi:10.1016/S1367-5931(02)00391-5
87. Sun H, Luo Q, Hou C, Liu J. Nanostructures based on protein self-assembly: From hierarchical construction to bioinspired materials. *Nano Today.* 2017;14:16-41. doi:10.1016/J.NANTOD.2017.04.006
88. Park WM. Coiled-Coils: The Molecular Zippers that Self-Assemble Protein Nanostructures. *Int J Mol Sci* 2020, Vol 21, Page 3584. 2020;21(10):3584. doi:10.3390/IJMS21103584
89. Hernandez-Garcia A. nanomaterials Strategies to Build Hybrid Protein-DNA Nanostructures. 2021. doi:10.3390/nano11051332
90. Saif B, Yang P. Metal-Protein Hybrid Materials with Desired Functions and Potential Applications. *ACS Appl Bio Mater.* 2021;4(2):1156-1177. doi:10.1021/ACSABM.0C01375/ASSET/IMAGES/MEDIUM/MT0C01375_0016.GIF
91. M C Cluskey JB, Clark DS, Glover DJ. Functional Applications of Nucleic Acid-Protein Hybrid Nanostructures Trends in Biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2020;38(9). doi:10.1016/j.tibtech.2020.02.007
92. Mehta S, Suresh A, Nayak Y, Narayan R, Nayak UY. Hybrid nanostructures: Versatile systems for biomedical applications. 2022. doi:10.1016/j.ccr.2022.214482
93. Dai H, Choe W-S, Thai CK, et al. Nonequilibrium Synthesis and Assembly of Hybrid Inorganic-Protein Nanostructures Using an Engineered DNA Binding Protein. 2005. doi:10.1021/ja055499h

94. Moses JE, Moorhouse AD. The growing applications of click chemistry. *Chem Soc Rev.* 2007;36(8):1249-1262. doi:10.1039/B613014N
95. Salgado EN, Radford RJ, Tezcan FA. Metal-Directed Protein Self Assembly. *Acc Chem Res.* 2010;43(5):661. doi:10.1021/AR900273T
96. Bailey JB, Subramanian RH, Churchfield LA, Tezcan FA. Metal-directed design of supramolecular protein assemblies. *Methods Enzymol.* 2016;580:223. doi:10.1016/BS.MIE.2016.05.009
97. Ladenstein R, Fischer M, Bacher A. The lumazine synthase/riboflavin synthase complex: shapes and functions of a highly variable enzyme system. *FEBS J.* 2013;280(11):2537-2563. doi:10.1111/FEBS.12255
98. Fornasari MS, Laplagne DA, Frankel N, Cauerhff AA, Goldbaum FA, Echave J. Sequence Determinants of Quaternary Structure in Lumazine Synthase. *Mol Biol Evol.* 2004;21(1):97-107. doi:10.1093/MOLBEV/MSG244
99. Klinke S, Zylberman V, Bonomi HR, et al. Structural and Kinetic Properties of Lumazine Synthase Isoenzymes in the Order Rhizobiales. *J Mol Biol.* 2007;373(3):664-680. doi:10.1016/J.JMB.2007.08.021
100. Schott K, Ladenstein R, König A, Bacher A. The lumazine synthase-riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. Crystallization of reconstituted icosahedral beta-subunit capsids. *J Biol Chem.* 1990;265(21):12686-12689. doi:10.1016/S0021-9258(19)38398-X
101. Schneider G, Sandalova T, Persson K, Jordan DB, Viitanen P V. Crystal structure analysis of a pentameric fungal and an icosahedral plant lumazine synthase reveals the structural basis for differences in assembly. *Protein Sci.* 1999;8(11):2355-2365. doi:10.1110/PS.8.11.2355
102. Zhang X, Meining W, Fischer M, Bacher A, Ladenstein R. X-ray structure analysis and crystallographic refinement of lumazine synthase from the hyperthermophile *Aquifex aeolicus* at 1.6 Å resolution: determinants of thermostability revealed from structural comparisons. *J Mol Biol.* 2001;306(5):1099-1114. doi:10.1006/JMBI.2000.4435
103. Zylberman V, Craig PO, Klinke S, Braden BC, Cauerhff A, Goldbaum FA. High Order Quaternary Arrangement Confers Increased Structural Stability to *Brucella* sp. Lumazine Synthase. *J Biol Chem.* 2004;279(9):8093-8101. doi:10.1074/JBC.M312035200
104. Berguer PM, Mundiñ ano J, Piazzon I, Goldbaum FA. A Polymeric Bacterial Protein Activates Dendritic Cells via TLR4 1. *J Immu-nology.* 2006;176:2366-2372.
105. Velikovsky CA, Cassataro J, Giambartolomei GH, et al. A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun.* 2002;70(5):2507-2511. doi:10.1128/IAI.70.5.2507-2511.2002/FORMAT/EPUB
106. Velikovsky CA, Goldbaum FA, Cassataro J, et al. *Brucella* Lumazine Synthase Elicits a Mixed Th1-Th2 Immune Response and Reduces Infection in Mice Challenged with *Brucella abortus* 544 Independently of the Adjuvant Formulation Used. *Infect Immun.* 2003;71(10):5750-5755. doi:10.1128/IAI.71.10.5750-5755.2003

107. Bellido D, Craig PO, Mozgovoj M V., et al. Brucella spp. lumazine synthase as a bovine rotavirus antigen delivery system. *Vaccine*. 2009;27(1):136-145. doi:10.1016/J.VACCINE.2008.10.018
108. Mejias MP, Gherzi G, Craig PO, et al. Immunization with a chimera consisting of the B subunit of Shiga toxin type 2 and brucella lumazine synthase confers total protection against Shiga toxins in mice. *J Immunol*. 2013;191(5):2403-2411. doi:10.4049/JIMMUNOL.1300999
109. Fragoso G, Esquivel-Guadarrama F, Santana MA, et al. Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from Taenia crassiceps cysticerci induces protective immunity. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(7):1067-1076. doi:10.1128/CVI.05030-11
110. Laplagne DA, Zylberman V, Ainciart N, et al. Engineering of a polymeric bacterial protein as a scaffold for the multiple display of peptides. *Proteins*. 2004;57(4):820-828. doi:10.1002/PROT.20248
111. Hiriart Y, Rossi AH, Biedma ME, et al. Characterization of structural and immunological properties of a fusion protein between flagellin from Salmonella and lumazine synthase from Brucella. 2017. doi:10.1002/pro.3151
112. Estein SM, Fiorentino MA, Paolicchi FA, et al. The polymeric antigen BLSOmp31 confers protection against Brucella ovis infection in rams. *Vaccine*. 2009;27(48):6704-6711. doi:10.1016/J.VACCINE.2009.08.097
113. Hiriart Y, Scibona P, Ferraris A, et al. A phase I study to evaluate the safety, tolerance and pharmacokinetics of anti-Shiga toxin hyperimmune equine F (ab 0) 2 fragments in healthy volunteers. 2024. doi:10.1111/bcp.15999
114. Development of a hyperimmune equine serum therapy for COVID-19 in Argentina. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0025-76802020000500001&script=sci_arttext. Accessed July 22, 2024.
115. Sosa S, Rossi AH, Szalai AM, et al. Asymmetric bifunctional protein nanoparticles through redesign of self-assembly. *Nanoscale Adv*. 2019;1(5):1833-1846. doi:10.1039/C8NA00375K
116. Kiernan J. Classification and naming of dyes, stains and fluorochromes. *Biotech Histochem*. 2001;76(5-6):261-278. doi:10.1080/BIH.76.5-6.261.278
117. Samanta S, Gong W, Li W, et al. Organic fluorescent probes for stochastic optical reconstruction microscopy (STORM): Recent highlights and future possibilities. *Coord Chem Rev*. 2019;380:17-34. doi:10.1016/J.CCR.2018.08.006
118. Campbell BC, Paez-Segala MG, Looger LL, Petsko GA, Liu CF. Chemically stable fluorescent proteins for advanced microscopy. *Nat Methods* 2022 1912. 2022;19(12):1612-1621. doi:10.1038/s41592-022-01660-7
119. Suzuki T, Matsuzaki T, Hagiwara H, Aoki T, Takata K. Advance Publication Technical Advancement Recent Advances in Fluorescent Labeling Techniques for Fluorescence Microscopy?? *Acta Histochem Cytochem*. 2007;40(5):131-137. doi:10.1267/ahc.07023
120. Jaiswal JK, Simon SM. Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging. *Trends Cell Biol*. 2004;14(9). doi:10.1016/j.tcb.2004.07.012

121. Wegner KD, Hildebrandt N. Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors. *Chem Soc Rev.* 2015;44(14):4792-4834. doi:10.1039/C4CS00532E
122. Diagrama EL, Jablonski DE, Sipoš RR, Sima J. JABLONSKI DIAGRAM REVISITED. *Rev Cuba Fis.* 2020;37:125.
123. Jabłoński A. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nat* 1933 1313319. 1933;131(3319):839-840. doi:10.1038/131839b0
124. Birks JB. Fluorescence Quantum Yield Measurements. *J Res Natl Bur Stand Sect A, Phys Chem.* 1976;80A(3):389. doi:10.6028/JRES.080A.038
125. Berezin MY, Achilefu S. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chem Rev.* 2010;110(5):2641. doi:10.1021/CR900343Z
126. Becker W. Fluorescence lifetime imaging – techniques and applications. *J Microsc.* 2012;247(2):119-136. doi:10.1111/J.1365-2818.2012.03618.X
127. Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harb Protoc.* 2014;2014(10):pdb.top071795. doi:10.1101/PDB.TOP071795
128. Renz M. Fluorescence microscopy—A historical and technical perspective. *Cytom Part A.* 2013;83(9):767-779. doi:10.1002/CYTO.A.22295
129. Wang X, Lai Y. Three basic types of fluorescence microscopy and recent improvement. doi:10.1051/e3sconf/202129001031
130. Webb DJ, Brown CM. Epi-Fluorescence Microscopy. *Methods Mol Biol.* 2013;931:29. doi:10.1007/978-1-62703-056-4_2
131. Elliott AD. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom.* 2020;92(1):e68. doi:10.1002/CPCY.68
132. Axelrod D, Thompson NL, Burghardt TP. Total internal reflection fluorescent microscopy. *J Microsc.* 1983;129(1):19-28. doi:10.1111/J.1365-2818.1983.TB04158.X
133. Fish KN. Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy. *Curr Protoc Cytom.* 2009;0 12(SUPPL.50):Unit12.18. doi:10.1002/0471142956.CY1218S50
134. Stelzer EHK. Contrast, resolution, pixelation, dynamic range and signal-to-noise ratio: fundamental limits to resolution in fluorescence light microscopy. *J Microsc.* 1998;189(1):15-24. doi:10.1046/J.1365-2818.1998.00290.X
135. Patterson GH. Fluorescence microscopy below the diffraction limit. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(8):886-893. doi:10.1016/J.SEMCDB.2009.08.006
136. Heilemann M. Fluorescence microscopy beyond the diffraction limit. *J Biotechnol.* 2010;149(4):243-251. doi:10.1016/J.JBIOTEC.2010.03.012
137. Galbraith CG, Galbraith JA. Super-resolution microscopy at a glance. *J Cell Sci.* 2011;124(10):1607. doi:10.1242/JCS.080085
138. Valli J, Garcia-Burgos A, Rooney LM, Vale de Melo Oliveira B, Duncan RR, Rickman C. Seeing beyond the limit: A guide to choosing the right super-resolution microscopy technique. 2021. doi:10.1016/j.jbc.2021.100791

139. Lin D, Jing Y, Chen P, et al. Single-Molecule Localization Microscopy (SMLM). *Super Resolut Opt Imaging Microsc Methods, Algorithms, Appl.* January 2023;51-92. doi:10.1002/9783527835539.CH3
140. Khater IM, Nabi IR, Hamarneh G. A Review of Super-Resolution Single-Molecule Localization Microscopy Cluster Analysis and Quantification Methods. *Patterns.* 2020;1:100038. doi:10.1016/j.patter.2020.100038
141. Bodén A, Pennacchietti F, Testa I. STED and RESOLFT Fluorescent Nanoscopy. 2022;201-232. doi:10.1007/4243_2022_35
142. Sharma R, Singh M, Sharma R. Recent advances in STED and RESOLFT super-resolution imaging techniques. 2019. doi:10.1016/j.saa.2019.117715
143. Großmayer KS, Yserentant K, Herten DP. Photons in - numbers out: perspectives in quantitative fluorescence microscopy for in situ protein counting. *Methods Appl Fluoresc.* 2019;7(1). doi:10.1088/2050-6120/AAF2EB
144. Hummert J, Tashev A, Herten D-P. An update on molecular counting in fluorescence microscopy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2021;135:105978. doi:10.1016/j.biocel.2021.105978
145. Fazel M, Grussmayer KS, Ferdman B, et al. Fluorescence Microscopy: a statistics-optics perspective. *ArXiv.* October 2023. /pmc/articles/PMC10104198/. Accessed July 24, 2024.
146. Munro HN, Linder MC. Physiological Reviews Ferritin: Structure, Biosynthesis, and Role in Iron Metabolism. <http://physrev.physiology.org/>. Accessed July 24, 2024.
147. Sudarev V V, Dolotova SM, Bukhalovich SM, et al. Ferritin self-assembly, structure, function, and biotechnological applications. *Int J Biol Macromol.* 2023;224:319-343. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.10.126
148. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z, Nardai G. The 90-kDa Molecular Chaperone Family: Structure, Function, and Clinical Applications. A Comprehensive Review. *Pharmacol Ther.* 1998;79(2):129-168. doi:10.1016/S0163-7258(98)00013-8
149. Walter S. Structure and function of the GroE chaperone.
150. Pearl LH, Prodromou C. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem.* 2006;75(Volume 75, 2006):271-294. doi:10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.75.103004.142738/CITE/REFWORKS
151. Lucas W, Knipe DM. Viral Capsids and Envelopes: Structure and Function. www.els.net. Accessed July 24, 2024.
152. Mateu MG. Assembly, stability and dynamics of virus capsids. *Arch Biochem Biophys.* 2013;531(1-2):65-79. doi:10.1016/J.ABB.2012.10.015
153. Aumiller WM, Uchida M, Douglas T. Protein cage assembly across multiple length scales Title: Protein cage assembly across multiple length scales.
154. Uchida M, Klem MT, Allen M, et al. Biological Containers: Protein Cages as Multifunctional Nanoplatfroms. *Adv Mater.* 2007;19(8):1025-1042. doi:10.1002/ADMA.200601168
155. Edwardson TGW, Levasseur MD, Tetter S, Steinauer A, Hori M, Hilvert D. Protein

Cages: From Fundamentals to Advanced Applications. *Chem Rev.* May 2021. doi:10.1021/ACS.CHEMREV.1C00877/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CR1C00877_0026.GIF

156. Stupka I, Heddle JG. Artificial protein cages-inspiration, construction, and observation. *Curr Opin Struct Biol.* 2020;2020:66-73. doi:10.1016/j.sbi.2020.05.014
157. Kianfar E. Protein nanoparticles in drug delivery: animal protein, plant proteins and protein cages, albumin nanoparticles. *J Nanobiotechnology* 2021 191. 2021;19(1):1-32. doi:10.1186/S12951-021-00896-3
158. Lee LA, Wang Q. Adaptations of nanoscale viruses and other protein cages for medical applications. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2006;2:137-149. doi:10.1016/j.nano.2006.07.009
159. Bode SA, Minten IJ, Nolte RJM, Cornelissen JJLM. Reactions inside nanoscale protein cages. doi:10.1039/c0nr01013h
160. Petrescu DS, Blum AS. Viral-based nanomaterials for plasmonic and photonic materials and devices. 2018. doi:10.1002/wnan.1508
161. Voss NR, Gerstein M. 3V: cavity, channel and cleft volume calculator and extractor. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(Web Server issue). doi:10.1093/NAR/GKQ395
162. Dehouck Y, Kwasigroch JM, Rooman M, Gilis D. BeAtMuSiC: Prediction of changes in protein-protein binding affinity on mutations. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Web Server issue). doi:10.1093/NAR/GKT450
163. Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, Nys R, Rousseau F, Serrano L. The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Web Server issue). doi:10.1093/NAR/GKI387
164. Habeeb AFSA. [37] Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. *Methods Enzymol.* 1972;25(C):457-464. doi:10.1016/S0076-6879(72)25041-8
165. Riener CK, Kada G, Gruber HJ. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem.* 2002;373(4-5):266-276. doi:10.1007/S00216-002-1347-2/METRICS
166. Aramendía PF, Martín Negri R, San Román E. Temperature dependence of fluorescence and photoisomerization in symmetric carbocyanines. Influence of medium viscosity and molecular structure. *J Phys Chem.* 1994;98(12):3165-3173. doi:10.1021/J100063A020/ASSET/J100063A020.FP.PNG_V03
167. Rashid F, Raducanu VS, Zaher MS, Tehseen M, Habuchi S, Hamdan SM. Initial state of DNA-Dye complex sets the stage for protein induced fluorescence modulation. *Nat Commun.* 2019;10(1). doi:10.1038/S41467-019-10137-9
168. Stennett EMS, Ciuba MA, Lin S, Levitus M. Demystifying PIFE: The Photophysics Behind the Protein-Induced Fluorescence Enhancement Phenomenon in Cy3. *J Phys Chem Lett.* 2015;6(10):1819-1823. doi:10.1021/ACS.JPCLETT.5B00613
169. Gruber HJ, Hahn CD, Kada G, et al. Anomalous fluorescence enhancement of Cy3 and Cy3.5 versus anomalous fluorescence loss of Cy5 and Cy7 upon covalent linking to IgG and noncovalent binding to avidin. *Bioconj Chem.* 2000;11(5):696-704. doi:10.1021/BC000015M/SUPPL_FILE/BC000015M_S.PDF

170. Nguyen B, Ciuba MA, Kozlov AG, Levitus M, Lohman TM. Protein Environment and DNA Orientation Affect Protein-Induced Cy3 Fluorescence Enhancement. *Biophys J*. 2019;117(1):66-73. doi:10.1016/J.BPJ.2019.05.026
171. Sanborn ME, Connolly BK, Gurunathan K, Levitus M. Fluorescence properties and photophysics of the sulfoindocyanine Cy3 linked covalently to DNA. *J Phys Chem B*. 2007;111(37):11064-11074. doi:10.1021/JP072912U/SUPPL_FILE/JP072912USI20070413_052939.PDF
172. Kirstein S, Möhwald H. Exciton band structures in 2D aggregates of cyanine dyes. *Adv Mater*. 1995;7(5):460-463. doi:10.1002/ADMA.19950070509
173. Markova LI, Malinovskii VL, Patsenker LD, Häner R. J- vs. H-type assembly: pentamethine cyanine (Cy5) as a near-IR chiroptical reporter. *Chem Commun*. 2013;49(46):5298-5300. doi:10.1039/C3CC42103A
174. Bricks JL, Slominskii YL, Panas ID, Demchenko AP. Fluorescent J-aggregates of cyanine dyes: basic research and applications review. *Methods Appl Fluoresc*. 2017;6(1). doi:10.1088/2050-6120/AA8D0D
175. Huang Z, Ji D, Xia A. Fluorescence intensity and lifetime fluctuations of single Cy5 molecules immobilized on the glass surface. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2005;257-258:203-209. doi:10.1016/J.COLSURFA.2004.10.108
176. Quantum Yield [Cy5 (Cyanine-5)] | AAT Bioquest. https://www.aatbio.com/resources/quantum-yield/cy5_cyanine_5. Accessed July 25, 2024.
177. Quantum Yield [Cy3 (Cyanine-3)] | AAT Bioquest. https://www.aatbio.com/resources/quantum-yield/cy3_cyanine_3. Accessed July 25, 2024.
178. Vaughan JC, Dempsey GT, Sun E, Zhuang X. Phosphine quenching of cyanine dyes as a versatile tool for fluorescence microscopy. *J Am Chem Soc*. 2013;135(4):1197-1200. doi:10.1021/JA3105279
179. Schnitzbauer J, Strauss MT, Schlichthaerle T, Schueder F, Jungmann R. Super-resolution microscopy with DNA-PAINT. *Nat Protoc* 2017 126. 2017;12(6):1198-1228. doi:10.1038/nprot.2017.024
180. Dai M, Jungmann R, Yin P. Optical imaging of individual biomolecules in densely packed clusters. *Nat Nanotechnol* 2016 119. 2016;11(9):798-807. doi:10.1038/nnano.2016.95
181. Cordes T, Vogelsang J, Tinnefeld P. On the mechanism of trolox as antiblinking and antibleaching reagent. *J Am Chem Soc*. 2009;131(14):5018-5019. doi:10.1021/JA809117Z/SUPPL_FILE/JA809117Z_SI_001.PDF
182. Lee J, Park S, Kang W, Hohng S. Accelerated super-resolution imaging with FRET-PAINT. doi:10.1186/s13041-017-0344-5
183. Auer A, Strauss MT, Schlichthaerle T, Jungmann R. Fast, Background-Free DNA-PAINT Imaging Using FRET-Based Probes. *Nano Lett*. 2017;17(10):6428-6434. doi:10.1021/ACS.NANOLETT.7B03425/SUPPL_FILE/NL7B03425_SI_001.PDF
184. Deußner-Helfmann NS, Auer A, Strauss MT, et al. Correlative Single-Molecule FRET

- and DNA-PAINT Imaging. *Nano Lett.* 2018;18(7):4626-4630. doi:10.1021/ACS.NANOLETT.8B02185/SUPPL_FILE/NL8B02185_SI_001.PDF
185. Chung KKH, Zhang Z, Kidd P, et al. Fluorogenic DNA-PAINT for faster, low-background super-resolution imaging. *Nat Methods* 2022 195. 2022;19(5):554-559. doi:10.1038/s41592-022-01464-9
 186. Huang Z, Wang Y, Shang M. Influence of drift correction precision on super-resolution localization microscopy. *Appl Opt Vol* 61, Issue 13, pp 3516-3522. 2022;61(13):3516-3522. doi:10.1364/AO.451561
 187. Hak Lee S, Baday M, Tjioe M, et al. Using fixed fiduciary markers for stage drift correction. *Opt Express, Vol* 20, Issue 11, pp 12177-12183. 2012;20(11):12177-12183. doi:10.1364/OE.20.012177
 188. Wang X, Li J, Tang Y, Dai L, Zhang X. Sub-nanometer drift correction for super-resolution imaging. *Opt Lett Vol* 39, Issue 19, pp 5685-5688. 2014;39(19):5685-5688. doi:10.1364/OL.39.005685
 189. Kaur A, Kaur P, Ahuja S. Förster resonance energy transfer (FRET) and applications thereof. *Anal Methods*. 2020;12(46):5532-5550. doi:10.1039/D0AY01961E
 190. Algar WR, Hildebrandt N, Vogel SS, Medintz IL. FRET as a biomolecular research tool — understanding its potential while avoiding pitfalls. *Nat Methods* 2019 169. 2019;16(9):815-829. doi:10.1038/s41592-019-0530-8
 191. Okamoto K, Sako Y. Recent advances in FRET for the study of protein interactions and dynamics. *Curr Opin Struct Biol.* 2017;46:16-23. doi:10.1016/J.SBI.2017.03.010
 192. Shrestha D, Jenei A, Nagy P, Vereb G, Szöllösi J. Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies. *Int J Mol Sci* 2015, Vol 16, Pages 6718-6756. 2015;16(4):6718-6756. doi:10.3390/IJMS16046718
 193. Qiao Y, Luo Y, Long N, Xing Y, Tu J. Single-Molecular Förster Resonance Energy Transfer Measurement on Structures and Interactions of Biomolecules. *Micromachines* 2021, Vol 12, Page 492. 2021;12(5):492. doi:10.3390/M12050492
 194. Szalai AM, Zaza C, Stefani FD. Super-resolution FRET measurements. *Nanoscale*. 2021;13(44):18421-18433. doi:10.1039/D1NR05769C
 195. Szalai AM, Siarry B, Lukin J, et al. Super-resolution Imaging of Energy Transfer by Intensity-Based STED-FRET. *Nano Lett.* 2021;21(5):2296-2303. doi:10.1021/ACS.NANOLETT.1C00158/SUPPL_FILE/NL1C00158_SI_001.PDF
 196. Agam G, Gebhardt C, Popara M, et al. nature methods Reliability and accuracy of single-molecule FRET studies for characterization of structural dynamics and distances in proteins. doi:10.1038/s41592-023-01807-0
 197. Schuler B, Eaton WA. Protein folding studied by single-molecule FRET. *Curr Opin Struct Biol.* 2008;18(1):16-26. doi:10.1016/J.SBI.2007.12.003
 198. Lerner E, Barth A, Hendrix J, et al. FRET-based dynamic structural biology: Challenges, perspectives and an appeal for open-science practices. *Elife*. 2021;10. doi:10.7554/ELIFE.60416
 199. Mazal H, Haran G. Single-molecule FRET methods to study the dynamics of proteins

at work. *Curr Opin Biomed Eng.* 2019;12:8. doi:10.1016/J.COBE.2019.08.007

200. Opanasyuk O, Barth A, Peulen TO, et al. Unraveling multi-state molecular dynamics in single-molecule FRET experiments. II. Quantitative analysis of multi-state kinetic networks. *J Chem Phys.* 2022;157(3):31501. doi:10.1063/5.0095754/19854330/031501_1_5.0095754.AM.PDF
201. Chung HS, Eaton WA. Protein folding transition path times from single molecule FRET. *Curr Opin Struct Biol.* 2018;48:30-39. doi:10.1016/J.SBI.2017.10.007
202. Prevo B, Peterman EJG. Förster resonance energy transfer and kinesin motor proteins. *Chem Soc Rev.* 2014;43(4):1144-1155. doi:10.1039/C3CS60292C
203. Lengsfeld AM, Lowt I, Wielandt T, Dancker P, Hasselbach W. Interaction of Phalloidin with Actin (toxin/cyclic peptide/liver cell actin/cytochalasin B/microfilaments). 1974;71(7):2803-2807. <https://www.pnas.org>. Accessed August 4, 2024.
204. Faulstich H, Schäfer AJ, Weckauf M. Die Dissoziation des Komplexes aus Phalloidin und Aktin. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1977;358(1):181-184. doi:10.1515/BCHM2.1977.358.1.181/MACHINEREADABLECITATION/RIS
205. Vandekerckhove J, Deboen A, Nassal M, Wieland T. The phalloidin binding site of F- actin. *EMBO J.* 1985;4(11):2815-2818. doi:10.1002/J.1460-2075.1985.TB04008.X
206. Strauss S, Jungmann R. Up to 100-fold speed-up and multiplexing in optimized DNA-PAINT. *Nat Methods* 2020 178. 2020;17(8):789-791. doi:10.1038/s41592-020-0869-x
207. H Chung KK, Zhang Z, Kidd P, et al. Fluorogenic DNA-PAINT for faster, low-background super-resolution imaging. doi:10.1038/s41592-022-01464-9
208. Wolff JO, Scheiderer L, Engelhardt T, Engelhardt J, Matthias J, Hell SW. MINFLUX dissects the unimpeded walking of kinesin-1. *Science (80-).* 2023;379(6636). doi:10.1126/SCIENCE.ADE2650/SUPPL_FILE/SCIENCE.ADE2650_MDAR_REPRODUCIBILITY_CHECKLIST.PDF
209. Hübner K, Joshi H, Aksimentiev A, Stefani FD, Tinnefeld P, Acuna GP. Determining the In-Plane Orientation and Binding Mode of Single Fluorescent Dyes in DNA Origami Structures. *ACS Nano.* 2021;15(3):5109-5117. doi:10.1021/ACSNANO.0C10259/SUPPL_FILE/NN0C10259_SI_006.PDF
210. Adamczyk AK, Huijben TAPM, Sison M, et al. DNA Self-Assembly of Single Molecules with Deterministic Position and Orientation. *ACS Nano.* 2022;16(10):16924-16931. doi:10.1021/ACSNANO.2C06936/SUPPL_FILE/NN2C06936_SI_001.PDF
211. Zhanghao K, Gao J, Dayong J¶, Zhang X, Xi P. Super-resolution uorescence polarization microscopy. *J Innov Opt Health Sci.* 2018;11(1):1730002. doi:10.1142/S1793545817300026
212. Chen L, Chen X, Yang X, et al. Advances of super-resolution fluorescence polarization microscopy and its applications in life sciences. 2020. doi:10.1016/j.csbj.2020.06.038
213. Reinhardt SCM, Masullo LA, Baudrexel I, et al. Ångström-resolution fluorescence

- microscopy. *Nat* 2023 6177962. 2023;617(7962):711-716. doi:10.1038/s41586-023-05925-9
214. Balzarotti F, Eilers Y, Gwosch KC, et al. Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes. *Science* (80-). 2017;355(6325):606-612. doi:10.1126/SCIENCE.AAK9913/SUPPL_FILE/BALZAROTTI_SM.PDF
 215. Weber M, von der Emde H, Leutenegger M, et al. MINSTED nanoscopy enters the Ångström localization range. *Nat Biotechnol* 2022 414. 2022;41(4):569-576. doi:10.1038/s41587-022-01519-4
 216. Szalai AM, Siarry B, Lukin J, et al. Three-dimensional total-internal reflection fluorescence nanoscopy with nanometric axial resolution by photometric localization of single molecules. *Nat Commun* 2021 121. 2021;12(1):1-13. doi:10.1038/s41467-020-20863-0
 217. Masullo LA, Szalai AM, Lopez LF, Stefani FD. Fluorescence nanoscopy at the sub-10 nm scale. *Biophys Rev*. 2021;13(6):1101-1112. doi:10.1007/S12551-021-00864-Z
 218. Masullo LA, Steiner F, Zähringer J, et al. Pulsed Interleaved MINFLUX. *Nano Lett*. 2021;21(1):840-846. doi:10.1021/ACS.NANOLETT.0C04600/SUPPL_FILE/NL0C04600_SI_001.PDF
 219. Masullo LA, Szalai AM, Lopez LF, Pilo-Pais M, Acuna GP, Stefani FD. An alternative to MINFLUX that enables nanometer resolution in a confocal microscope. *Light Sci Appl* 2022 111. 2022;11(1):1-9. doi:10.1038/s41377-022-00896-4
 220. Helmerich DA, Budiarta M, Taban D, et al. PCNA as Protein-Based Nanoruler for Sub-10 nm Fluorescence Imaging. *Adv Mater*. 2024;36(7):2310104. doi:10.1002/ADMA.202310104
 221. Jungmann R, Avendaño MS, Woehrstein JB, Dai M, Shih WM, Yin P. Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT. *Nat Methods* 2014 113. 2014;11(3):313-318. doi:10.1038/nmeth.2835
 222. Agasti SS, Wang Y, Schueder F, Sukumar A, Jungmann R, Yin P. DNA-barcoded labeling probes for highly multiplexed Exchange-PAINT imaging. *Chem Sci*. 2017;8(4):3080-3091. doi:10.1039/C6SC05420J
 223. Shtengel G, Galbraith JA, Galbraith CG, et al. Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3125-3130. doi:10.1073/PNAS.0813131106/SUPPL_FILE/SM2.MOV
 224. Aquino D, Schönle A, Geisler C, et al. two-color nanoscopy of three-dimensional volumes by 4Pi detection of stochastically switched fluorophores. *Artic Nat methods*. 2011;8(4):353. doi:10.1038/nMeth.1583
 225. Huang F, Sirinakis G, Allgeyer ES, et al. Ultra-High Resolution 3D Imaging of Whole Cells. *Cell*. 2016;166(4):1028-1040. doi:10.1016/j.cell.2016.06.016
 226. Gwosch KC, Pape JK, Balzarotti F, et al. MINFLUX nanoscopy delivers 3D multicolor nanometer resolution in cells. *Nat Methods*. 2020;17(2):217-224. doi:10.1038/S41592-019-0688-0

227. Thiele JC, Jungblut M, Helmerich DA, et al. Isotropic three-dimensional dual-color super-resolution microscopy with metal-induced energy transfer. *Sci Adv*. 2022;8:2506. <https://www.science.org>. Accessed September 12, 2024.
228. Hauke L, Isbaner S, Ghosh A, et al. Metal-Induced Energy Transfer (MIET) for Live-Cell Imaging with Fluorescent Proteins. *ACS Nano*. 2023;17:8251. doi:10.1021/acsnano.2c12372
229. Kamińska I, Bohlen J, Yaadav R, et al. Graphene Energy Transfer for Single-Molecule Biophysics, Biosensing, and Super-Resolution Microscopy. *Adv Mater*. 2021;33(24). doi:10.1002/ADMA.202101099
230. Ghosh A, Sharma A, Chizhik AI, et al. Graphene-based metal-induced energy transfer for sub-nanometre optical localization. *Nat Photonics* 2019 1312. 2019;13(12):860-865. doi:10.1038/s41566-019-0510-7
231. Subramaniam S, Kleywegt GJ. A paradigm shift in structural biology. *Nat Methods* 2022 191. 2022;19(1):20-23. doi:10.1038/s41592-021-01361-7
232. Masrati G, Landau M, Ben-Tal N, Lupas A, Kosloff M, Kosinski J. Integrative Structural Biology in the Era of Accurate Structure Prediction. *J Mol Biol*. 2021;433(20):167127. doi:10.1016/J.JMB.2021.167127
233. Strauss S, Jungmann R. Up to 100-fold speedup and multiplexing in optimized DNA-PAINT. *Nat Methods*. 2020;17(8):789. doi:10.1038/S41592-020-0869-X
234. Wang L, He S-J, Wang K-Y. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review You may also like Dual-plasmonic Au/graphene/Au-enhanced ultrafast, broadband, self-driven silicon Schottky photodetector. 2017. doi:10.1088/1361-648X/aa60f3
235. Szunerits S, Spadavecchia J, Boukherroub R. Surface plasmon resonance: Signal amplification using colloidal gold nanoparticles for enhanced sensitivity. *Rev Anal Chem*. 2014;33(3):153-164. doi:10.1515/REVAC-2014-0011/MACHINEREADABLECITATION/RIS
236. Mie G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann Phys*. 1908;330(3):377-445. doi:10.1002/ANDP.19083300302
237. Lock JA, Gouesbet G. Generalized Lorenz–Mie theory and applications. *J Quant Spectrosc Radiat Transf*. 2009;110(11):800-807. doi:10.1016/J.JQSRT.2008.11.013
238. Wriedt T. Mie Theory: A Review. *Springer Ser Opt Sci*. 2012;169:53-71. doi:10.1007/978-3-642-28738-1_2
239. Pilot R, Signorini R, Durante C, Orian L, Bhamidipati M, Fabris L. A Review on Surface-Enhanced Raman Scattering. *Biosens* 2019, Vol 9, Page 57. 2019;9(2):57. doi:10.3390/BIOS9020057
240. Dragan AI, Bishop ES, Casas-Finet JR, et al. Distance Dependence of Metal-Enhanced Fluorescence. *Plasmonics*. 2012;7(4):739-744. doi:10.1007/S11468-012-9366-0/METRICS
241. Darvill D, Centeno A, Xie F. Plasmonic fluorescence enhancement by metal nanostructures: shaping the future of bionanotechnology. *Phys Chem Chem Phys*. 2013;15(38):15709-15726. doi:10.1039/C3CP50415H

242. Knoblauch R, Geddes CD. Review of Advances in Metal-Enhanced Fluorescence. 2019;253-283. doi:10.1007/978-3-030-18834-4_10
243. Gür FN, Schwarz FW, Ye J, Diez S, Schmidt TL. Toward Self-Assembled Plasmonic Devices: High-Yield Arrangement of Gold Nanoparticles on DNA Origami Templates. *ACS Nano*. 2016;10(5):5374-5382. doi:10.1021/ACSNANO.6B01537/SUPPL_FILE/NN6B01537_SI_001.PDF
244. Schreiber R, Do J, Roller EM, et al. Hierarchical assembly of metal nanoparticles, quantum dots and organic dyes using DNA origami scaffolds. *Nat Nanotechnol*. 2014;9(1):74-78. doi:10.1038/NNANO.2013.253
245. Niikura K, Nagakawa K, Ohtake N, et al. Gold nanoparticle arrangement on viral particles through carbohydrate recognition: A non-cross-linking approach to optical virus detection. *Bioconjug Chem*. 2009;20(10):1848-1852. doi:10.1021/BC900255X/SUPPL_FILE/BC900255X_SI_001.PDF
246. Schreiber A, Huber MC, Cölfen H, Schiller SM. Molecular protein adaptor with genetically encoded interaction sites guiding the hierarchical assembly of plasmonically active nanoparticle architectures. *Nat Commun* 2015 61. 2015;6(1):1-11. doi:10.1038/ncomms7705
247. Bazgir M, Naser-Moghadasi M, Zarrabi FB, Arezomand AS, Heydari S. Nano particle implementation in nano loop antenna for energy harvesting application and light trapping. *Optik (Stuttg)*. 2017;132:127-133. doi:10.1016/J.IJLEO.2016.12.033
248. Amendola V, Meneghetti M. Size evaluation of gold nanoparticles by UV-vis spectroscopy. *J Phys Chem C*. 2009;113(11):4277-4285. doi:10.1021/JP8082425/SUPPL_FILE/JP8082425_SI_001.PDF
249. Hinterwirth H, Wiedmer SK, Moilanen M, et al. Comparative method evaluation for size and size-distribution analysis of gold nanoparticles. *J Sep Sci*. 2013;36(17):2952-2961. doi:10.1002/JSSC.201300460
250. Cho TJ, Hackley VA. Fractionation and characterization of gold nanoparticles in aqueous solution: Asymmetric-flow field flow fractionation with MALS, DLS, and UV-Vis detection. *Anal Bioanal Chem*. 2010;398(5):2003-2018. doi:10.1007/S00216-010-4133-6/FIGURES/10
251. Haiss W, Thanh NTK, Aveyard J, Fernig DG. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal Chem*. 2007;79(11):4215-4221. doi:10.1021/AC0702084/SUPPL_FILE/AC0702084SI20070321_014144.PDF
252. Hendel T, Wuithschick M, Kettemann F, Birnbaum A, Rademann K, Polte J. In situ determination of colloidal gold concentrations with uv-vis spectroscopy: Limitations and perspectives. *Anal Chem*. 2014;86(22):11115-11124. doi:10.1021/AC502053S/SUPPL_FILE/AC502053S_SI_001.PDF
253. Zare E, Baghban H, Dolatyari M, Rostami G, Rostami A. Design and simulation of nano-antenna with tunable direction of radiation. *Optik (Stuttg)*. 2014;125(12):2891-2894. doi:10.1016/J.IJLEO.2013.11.046
254. Optical properties of a plasmonic nano-antenna: an analytical approach. doi:10.1088/1367-2630/13/5/053034
255. Rana S, Yeh YC, Rotello VM. Engineering the Nanoparticle-Protein Interface:

- Applications and Possibilities. *Curr Opin Chem Biol.* 2010;14(6):828. doi:10.1016/J.CBPA.2010.10.001
256. Park SJ. To cite this article: Sung Jean Park (2020) Protein-Nanoparticle Interaction: Corona Formation and Conformational Changes in Proteins on Nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2020:5783-5802. doi:10.2147/IJN.S254808
 257. Vilanova O, Mittag JJ, Kelly PM, et al. Understanding the Kinetics of Protein-Nanoparticle Corona Formation. *ACS Nano.* 2016;10(12):10842-10850. doi:10.1021/ACS.NANO.6B04858/ASSET/IMAGES/NN-2016-048583_M006.GIF
 258. Urban AS, Lutich AA, Stefani FD, Feldmann J. Laser printing single gold nanoparticles. *Nano Lett.* 2010;10(12):4794-4798. doi:10.1021/NL1030425/SUPPL_FILE/NL1030425_SI_002.AVI
 259. Gargiulo J, Violi IL, Cerrota S, et al. Accuracy and Mechanistic Details of Optical Printing of Single Au and Ag Nanoparticles. *ACS Nano.* 2017;11(10):9678-9688. doi:10.1021/ACS.NANO.7B04136/ASSET/IMAGES/MEDIUM/NN-2017-04136S_0009.GIF
 260. Kumar S, Tanwar S, Kumar Sharma S. Nanoantenna-A Review on Present and Future Perspective. 2016;4(1).
 261. Vietz C, Kaminska I, Sanz Paz M, Tinnefeld P, Acuna GP. Broadband Fluorescence Enhancement with Self-Assembled Silver Nanoparticle Optical Antennas. *ACS Nano.* 2017;11(5):4969-4975. doi:10.1021/ACS.NANO.7B01621/SUPPL_FILE/NN7B01621_SI_001.PDF
 262. Trofymchuk K, Kołataj K, Glembockyte V, et al. Gold Nanorod DNA Origami Antennas for 3 Orders of Magnitude Fluorescence Enhancement in NIR. *ACS Nano.* 2023;17(2):1327-1334. doi:10.1021/ACS.NANO.2C09577/SUPPL_FILE/NN2C09577_SI_001.PDF
 263. Acuna G, Möller F, Holzmeister S. Fluorescence Enhancement at Docking Sites of DNA-Directed Self-Assembled Nanoantennas. doi:10.1126/science.1228638
 264. Lu W-J, Li Z. Plasmon coupled super-and sub-radiance from dye shells You may also like Nonlinear Dicke Quantum Phase Transition and Its Quantum Witness in a Cavity-Bose-Einstein-Condensate System. doi:10.1088/1742-6596/1092/1/012026
 265. Lyvers DP, Moazzezi M, De Silva VC, et al. Cooperative bi-exponential decay of dye emission coupled via plasmons. *Sci Reports 2018 81.* 2018;8(1):1-12. doi:10.1038/s41598-018-27901-4
 266. García-Parajó MF, Hernando J, Mosteiro GS, Hoogenboom JP, Van Dijk EMHP, Van Hulst NF. Energy transfer in single-molecule photonic wires. *Chemphyschem.* 2005;6(5):819-827. doi:10.1002/CPHC.200400630
 267. Wu C, Zheng Y, Szymanski C, McNeill J. Energy Transfer in a Nanoscale Multichromophoric System: Fluorescent Dye-Doped Conjugated Polymer Nanoparticles. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces.* 2008;112(6):1772. doi:10.1021/jp074149+
 268. Schwartz E, Stéphane S, Gac L, Cornelissen JJLM, Nolte RJM, Rowan AE. Macromolecular multi-chromophoric scaffolding. 2010. doi:10.1039/b922160c

269. Teo YN, Kool ET. DNA-Multichromophore Systems. *Chem Rev.* 2012;112(7):4221. doi:10.1021/CR100351G
270. Spillmann CM, Medintz IL. Use of biomolecular scaffolds for assembling multistep light harvesting and energy transfer devices. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev.* 2015;23:1-24. doi:10.1016/J.JPHOTOCHEMREV.2014.12.002
271. Thacker V V, Herrmann LO, Sigle DO, et al. ARTICLE DNA origami based assembly of gold nanoparticle dimers for surface-enhanced Raman scattering. *Nat Commun.* 2014. doi:10.1038/ncomms4448
272. Pal S, Deng Z, Ding B, Yan H, Liu Y. Angewandte Chemie DNA Templates DNA-Origami-Directed Self-Assembly of Discrete Silver-Nanoparticle Architectures** Zuschriften. doi:10.1002/ange.201000330
273. Fruhnert M, Kretschmer F, Geiss R, et al. Synthesis, Separation, and Hypermethod Characterization of Gold Nanoparticle Dimers Connected by a Rigid Rod Linker. *J Phys Chem C.* 2015;119(31):17809-17817. doi:10.1021/ACS.JPCC.5B04346
274. Hofmann A, Schmiel P, Stein B, Graf C. Controlled formation of gold nanoparticle dimers using multivalent thiol ligands. *Langmuir.* 2011;27(24):15165-15175. doi:10.1021/LA2028498/SUPPL_FILE/LA2028498_SI_001.PDF
275. PyMOL | pymol.org. <https://pymol.org/#page-top>. Accessed September 1, 2024.
276. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 1996;14(1):33-38. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5
277. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605-1612. doi:10.1002/JCC.20084
278. Case DA, Cheatham TE, Darden T, et al. The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem.* 2005;26(16):1668-1688. doi:10.1002/JCC.20290
279. Wickstrom L, Okur A, Simmerling C. Evaluating the performance of the ff99SB force field based on NMR scalar coupling data. *Biophys J.* 2009;97(3):853-856. doi:10.1016/J.BPJ.2009.04.063
280. Roe DR, Cheatham TE. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J Chem Theory Comput.* 2013;9(7):3084-3095. doi:10.1021/CT400341P
281. Ester M, Kriegel H-P, Sander J, Xu X. A Density-Based Algorithm for Discovering Clusters in Large Spatial Databases with Noise. 1996. www.aaai.org. Accessed July 29, 2024.