

ORIGINAL

INGENIERÍA DE PROTEÍNAS: INNOVACIONES PARA BIOMEDICINA, BIOTECNOLOGÍA Y BIOELECTRÓNICA

PROTEIN ENGINEERING: INNOVATIONS FOR BIOMEDICINE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOELECTRONICS

Laura Perez-Chirinos^{1#}; Gabriela Guedes^{1#}; Laura Saa¹; Aitziber L. Cortajarena^{1,2}

1. Centro de Investigación Cooperativa en Biomateriales (CIC biomaGUNE), Donostia-San Sebastian, España.

2. Ikerbasque, Fundación Vasca para la Ciencia, Bilbao, España.

Estos autores han contribuido por igual en este trabajo.

RESUMEN

El diseño de proteínas para el desarrollo de sistemas con estructuras y funcionalidades específicas y novedosas ha aumentado notablemente durante los últimos años gracias al gran avance que han experimentado las técnicas computacionales y experimentales. Las proteínas, como bloques de construcción fundamentales en los seres vivos, ofrecen una enorme versatilidad para la ingeniería biomolecular. Su capacidad para adoptar estructuras diversas y llevar a cabo funciones específicas las convierte en herramientas esenciales para la creación de nuevos materiales y sistemas en biomedicina, biotecnología y bioelectrónica. En concreto, las proteínas de repetición son de gran interés por el elevado potencial que proporcionan al área de la ingeniería de proteínas y el diseño de materiales debido a su modularidad y gran robustez. En particular, la familia de proteínas consenso de repetición de tetratricopéptidos (CTPRs) ha sido ampliamente empleada en múltiples áreas de bionanotecnología debido a su capacidad inherente de autoensamblaje en sistemas macroscópicos, así como por su habilidad para estabilizar metales en el interior de su estructura de superhélice. En el presente artículo, se proponen las proteínas de repetición como sistemas ideales para el diseño de proteínas, destacando su capacidad como unidades estructurales y funcionales tanto para el desarrollo de materiales basados en el autoensamblaje como para servir de plantillas para la estabilización de nanopartículas metálicas, así como su uso como agentes de contraste, biocatalizadores, biosensores y en bioelectrónica.

Palabras clave: Diseño de proteínas; Proteínas modulares; Autoensamblaje; Biomateriales; Nanomateriales; Híbridos proteína-nanomaterial; Bioelectrónica.

ABSTRACT

Protein design for the development of systems with specific and novel structures and functions has increased significantly in recent years, thanks to major advances in computational and experimental techniques. Proteins, as fundamental building blocks of living organisms, offer enormous versatility for biomolecular engineering. Their ability to adopt diverse structures and perform specific functions makes them essential tools for creating new materials and systems for applications in biomedicine, biotechnology, and bioelectronics. In particular, repeat proteins are of great interest due to the high potential they provide for protein engineering and materials design, due to their modularity and robustness. Among them, the family of consensus tetratricopeptide repeat proteins (CTPRs) has been widely used in multiple areas of bionanotechnology because of their inherent capacity for self-assembly into macroscopic systems, as well as their ability to stabilize functional nanomaterials within their structure. In this article, repeat proteins are presented as ideal systems for protein engineering, highlighting their potential as structural and functional units for the development of self-assembled materials, as templates for the stabilization of metal nanomaterials, and for applications such as contrast agents, biocatalysts, biosensors, and bioelectronics.

Keywords: Protein design; Modular proteins; Self-assembly; Biomaterials; Nanomaterials; Protein-nanomaterial hybrids; Bioelectronics.



Correspondencia

Aitziber L. Cortajarena

Centro de Investigación Cooperativa en Biomateriales (CIC biomaGUNE), Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Parque Tecnológico de San Sebastian.

Paseo Miramón, 194 · 20014 · Donostia-San Sebastian, España.

E-mail: alcortajarena@cicbiomagune.es

INTRODUCCIÓN

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes en los seres vivos. Estas forman parte de la mayoría de los procesos esenciales de las células, jugando un papel fundamental en su supervivencia y sus funciones. La estructura de una proteína, formada por la interacción y plegamiento en el espacio tridimensional de una cadena lineal de aminoácidos, determina y regula su función en las células. Dado que existe una alta variabilidad en las posibles secuencias de aminoácidos y, por tanto, en las estructuras que puede adoptar, es posible diseñar proteínas con estructuras, propiedades y funcionalidades específicas completamente novedosas. Esta amplia versatilidad ha provocado un creciente interés durante las últimas décadas por el área de ingeniería y diseño de proteínas, debido al impacto que tiene tanto en la investigación fundamental de proteínas y bioquímica, como en su aplicación en biotecnología y biomedicina, entre otras.(Huang et al., 2016)

La predicción de la estructura tridimensional de las proteínas, basándose en la secuencia de aminoácidos, es uno de los mayores retos en el ámbito del diseño de proteínas. Sin embargo, durante los últimos años este campo ha experimentado avances notables impulsados por progresos tanto experimentales como computacionales. En primer lugar, el progreso de técnicas experimentales de alto rendimiento ha facilitado, por un lado, la resolución de un gran número de estructuras proteicas, acelerando el conocimiento sobre las relaciones secuencia-estructura-función en las proteínas. Por otro lado, ha permitido la generación y la evaluación de librerías extensas de proteínas diseñadas, fomentando el descubrimiento de proteínas con estructuras y funcionalidades novedosas. En segundo lugar, los métodos computacionales, alineados con el aumento de información experimental, han permitido tanto predicciones más precisas de estructuras y funciones, como aumentado el conocimiento de la relación secuencia/estructura. La sinergia de los enfoques experimental y computacional ha

permitido tanto el rediseño como el diseño *de novo* de proteínas y ensamblajes con funciones y estructuras personalizadas, abriendo nuevas oportunidades en investigación científica e industria.(Huang et al., 2016; Saven, 2010)

Durante los últimos años, los métodos computacionales han revolucionado la investigación en el área de diseño de proteínas gracias a la aparición de la inteligencia artificial (IA) y el aprendizaje automático. Existen distintos enfoques computacionales para la predicción de estructuras proteicas como los basados en aprendizaje automático (AlphaFold(Baek et al., 2021; Jumper et al., 2021) y RosettaFold(Baek et al., 2021)) , los métodos basados en algoritmos de Monte-Carlo (Rosetta), o los enfoques que utilizan cálculos de modelos físicos, como la mecánica cuántica (MQ) y la dinámica molecular (MD).(MacKerell et al., 1998; Park et al., 2016; Ponder & Case, 2003) La IA ha demostrado ser una herramienta especialmente transformadora para el avance en este campo por su excelente precisión en la predicción de estructuras. Este progreso ha sido tal que el Premio Nobel de Química en 2024 ha sido galardonado al Prof. David Baker, al Dr. Demis Hassabis y al Dr. John Jumper por "la predicción de la estructura de proteínas mediante el uso de inteligencia artificial". El Prof. David Baker ha sido galardonado con el Premio Nobel por el desarrollo del programa Rosetta, el cual permite la predicción de las estructuras conformacionales de las proteínas mediante la identificación de estados de baja energía. Una de las mayores aplicaciones de Rosetta ha sido el diseño de proteínas *de novo* mediante la optimización de la secuencia de aminoácidos para la obtención de una estructura definida.(Leman et al., 2020; Marcos & Silva, 2018) El Dr. Demis Hassabis y el Dr. John Jumper han sido galardonados con el Premio Nobel por el modelo de IA AlphaFold2, que está basado en el entrenamiento de una red neuronal para la predicción de la estructura de proteínas mediante el alineamiento múltiple de secuencias (MSA) y métodos de distancia entre pares usando la información disponible en el banco de datos de proteínas (PDB). (Jumper et al., 2021) Estas contribuciones han trans-



formado la forma en la que entendemos y diseñamos proteínas. Todas estas metodologías computacionales proporcionan herramientas poderosas para la predicción de estructuras proteicas, el diseño, y dinámica de proteínas, pudiendo complementarse para maximizar y optimizar los beneficios derivados de los distintos resultados de dichas técnicas. Aunque se han logrado grandes avances en el campo, sigue siendo un área de intensa investigación, debido a la alta complejidad de las relaciones secuencia-estructura-función en proteínas. La dificultad inherente a la predicción de las estructuras conformacionales en el espacio de las proteínas convierte el diseño racional de estas un desafío de gran relevancia científica. En este sentido, las proteínas basadas en módulos de repetición han sido ampliamente utilizadas como una estrategia eficiente, ya que su mayor simplicidad y versatilidad ayudan a reducir significativamente la complejidad del diseño y la predicción de sus estructuras tridimensionales.

La combinación de avances en técnicas experimentales y computacionales, junto con las ventajas que proporcionan las proteínas de repetición, ha permitido el desarrollo de materiales con morfología y funcionalidades específicas y novedosas. Además, estas proteínas se han integrado con nanomateriales, participando las proteínas como excelentes plantillas para la estabilización de nanomateriales metálicos. Estos nanomateriales han demostrado excelentes propiedades para su aplicación en ámbitos como la bioelectrónica,(Mejías et al., 2021) como agentes de contraste en imagen médica,(Aires, Maestro, et al., 2021) biosensores,(Aires et al., 2018; Romeo et al., 2021) y biocatálisis,(Donnelly et al., 2018; Watkins et al., 2017) entre otras aplicaciones. Además, estos biomateriales proteicos también destacan por su alta compatibilidad con sistemas biológicos, biodegradabilidad y sostenibilidad.

PROTEÍNAS DE REPETICIÓN

Las proteínas de repetición son proteínas naturales normalmente involucradas en procesos de interacciones entre proteínas, que surgen de la duplicación en tándem de un motivo específico que es estructuralmente compatible consigo mismo por empalme o duplicación de genes.(Andrade et al., 2001) Cada repetición suele contener entre 18 y 47 aminoácidos, y sus estructuras se mantienen principalmente

mediante interacciones regulares y de corto alcance.(Boersma & Plu, 2011) La simplicidad de las proteínas de repetición permite comprender mejor las relaciones secuencia-estructura-función, en comparación con la mayoría de las proteínas, lo que hace que estas familias sean ideales como bloques para la ingeniería de proteínas. Las familias de proteínas de repetición más estudiadas son la repetición rica en leucina (LRR), la repetición armadillo (ARM), la repetición anquirina (ANK), la repetición de tetratricopéptidos (TPR) y la efectora de actividad similar a activador de transcripción (TALE) (Figura 1).

Dado que el tamaño y la morfología de las proteínas de repetición se pueden modular de manera relativamente sencilla, estas proteínas ofrecen oportunidades únicas para la ingeniería y diseño de bloques robustos con características deseadas. A diferencia de las proteínas globulares, las cuales forman contactos complejos de largo alcance, una característica clave de las proteínas de repetición es que cada módulo interacciona exclusivamente con los módulos vecinos, proporcionando una cooperatividad entre los distintos módulos que es responsable del plegamiento lineal característico de estas proteínas. Esta modularidad y cooperatividad reduce considerablemente la complejidad del rediseño y predicción de la estructura de dichas proteínas en comparación con las proteínas globulares. Esta característica permite insertar, eliminar o sustituir unidades de repetición sin alterar significativamente la estructura global, garantizando el mantenimiento de interfaces compatibles entre las unidades. El objetivo principal del diseño de proteínas de repetición es desarrollar sistemas modulares para diversas aplicaciones, centrándose en estructuras estables, homogéneas y modulares.

La ingeniería de estas proteínas se suele centrar en el rediseño de las secuencias consenso obtenidas mediante el análisis de secuencias de proteínas nativas y el diseño basado en estructuras. Las secuencias consenso se basan en el análisis estadístico mediante MSA, estudiando la conservación de los distintos aminoácidos entre las proteínas nativas. Como resultado, la secuencia consenso muestra el aminoácido más frecuente entre las proteínas naturales en cada posición.(Parmeggiani & Huang, 2017) El diseño por consenso ofrece dos ventajas clave frente al uso de una proteína específica de la familia. En primer lugar, la secuencia consenso suele tener significativamente mayor estabilidad al preservar las características estructurales que son inherentes a una familia na-

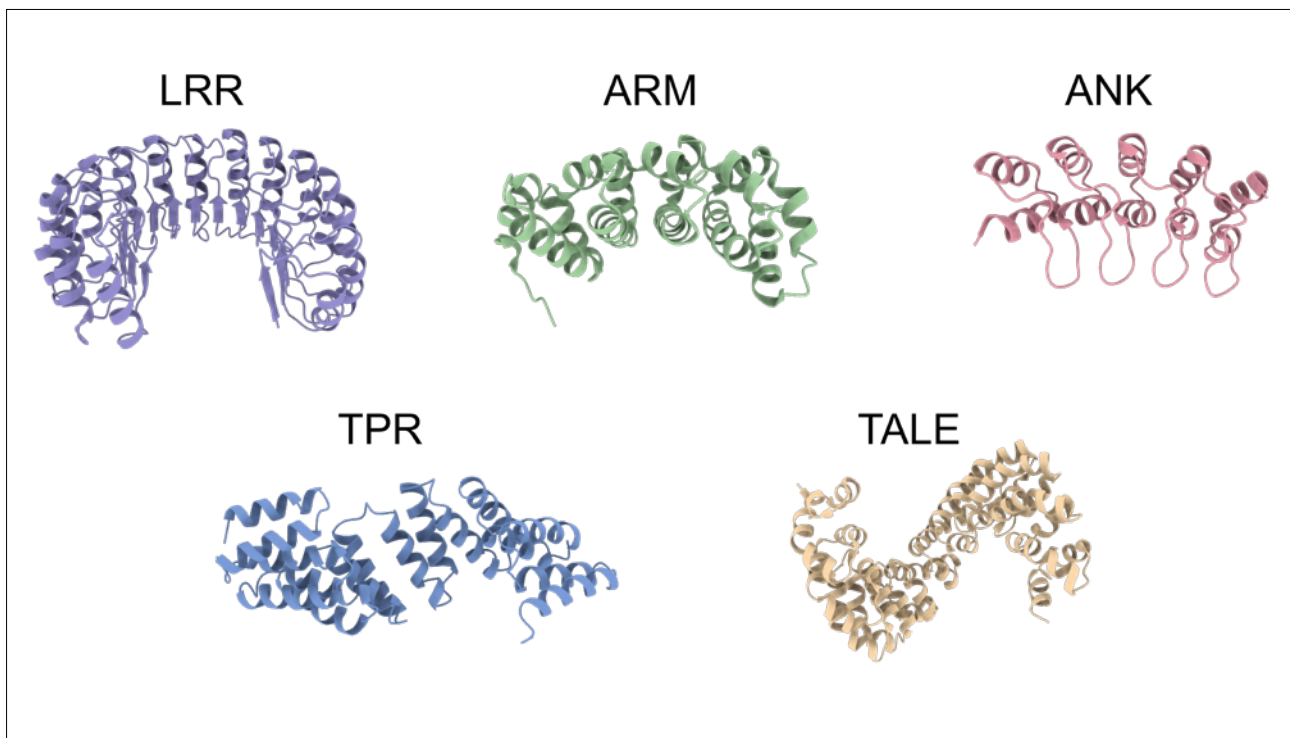


Figura 1. Familias de proteínas de repetición. Nombre de la familia de proteínas de repetición y estructura de repeticiones en tándem. LRR (PDB ID:1A4Y). ARM (PDB ID: 4DB9). ANK (PDB ID: 2XEE). TPR (PDB ID: 2AVP). TALE (PDB ID: 4HPZ).

tural, las cuales pueden perderse en proteínas que han evolucionado para realizar una función concreta. En segundo lugar, la secuencia consenso garantiza la compatibilidad entre repeticiones, ya que son todas idénticas, permitiendo la adición, eliminación e intercambio de repeticiones.(Boersma & Plu, 2011) Por estas razones, el diseño de una secuencia consenso de proteínas de repetición se ha realizado de forma efectiva en varias familias de proteínas de repetición, incluyendo ANK,(Binz et al., 2003) TPR,(Main et al., 2003) ARM,(Parmeggiani et al., 2008) LRR,(Lee et al., 2012) entre otras.(Coquille et al., 2014; Gully et al., 2015).

Entre las proteínas de repetición, la secuencia consenso de la familia de las proteínas de repetición tetratricopéptido (CTPR del inglés **Consensus tetratricopeptide repeat**), diseñada en el laboratorio de la Prof.^a Regan, está en el punto de mira debido a su gran robustez y estabilidad. Las proteínas CTPR, provienen del motivo estructural TPR, el cual interviene normalmente en interacciones proteína-proteína en las células.(Main et al., 2003) El módulo individual se compone de una unidad estructural de hélice-giro-hélice, cuyo apilamiento en tándem (que

puede variar de 3 a 20 módulos) forma una estructura terciaria superhelicoidal (Figura 2).(Kajander et al., 2005) Esta unidad estructural está constituida por 34 aminoácidos, de los cuales sólo 8 están altamente conservados y son esenciales para garantizar el plegamiento adecuado.(Main et al., 2003) Esta robustez confiere una alta estabilidad estructural que permite la mutación de varios aminoácidos sin afectar a la estructura de la proteína, (Uribe et al., 2021) (Cortajarena et al., 2011) además de permitir la síntesis de nanomateriales metálicos en su estructura. (Aires, Maestro, et al., 2021) La naturaleza modular de estas proteínas también permite el ensamblaje de diferentes unidades de forma controlada (Kajander et al., 2007) y la fusión con otros módulos diana o terapéuticos.(Aires, Maestro, et al., 2021; Uribe et al., 2021) En conclusión, las proteínas CTPR son muy sencillas y altamente personalizables, ampliando enormemente el control de la síntesis y la versatilidad de los nanomateriales híbridos resultantes. Además, el diseño de estas proteínas podría llevar estos sistemas al siguiente nivel: el carácter modular de las proteínas CTPR permite la incorporación de moléculas diana y terapéuticas dentro del mismo andamiaje.

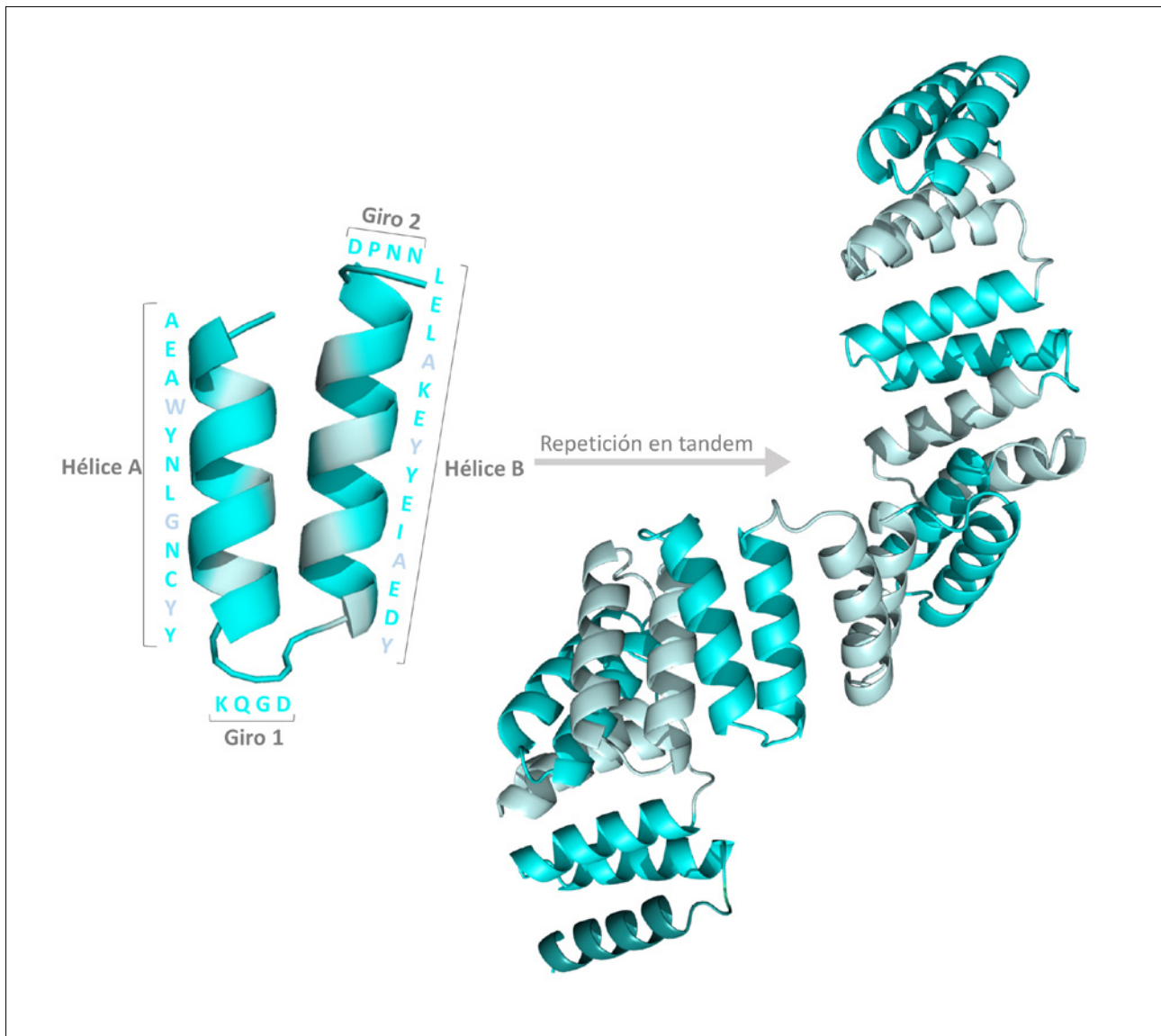


Figura 2. Estructura de la proteína CTPR. Modelo de la unidad estructural acompañado de su secuencia. Los aminoácidos conservados se muestran en azul más claro. La repetición en tándem del módulo individual CTPR (que puede variar de 3 a 20 módulos) origina una estructura terciaria de superhélice. Las diferentes repeticiones se resaltan en tonos azul y verde azulado. La hélice individual en el extremo C-terminal en color verde corresponde a la hélice de solvatación en el C-terminal la cual evita la exposición de aminoácidos hidrofóbicos a la superficie e incrementa la solubilidad de la proteína (PBD ID: 2HYZ).

DISEÑO DE ENSAMBLAJES DE PROTEÍNAS

El autoensamblaje es un proceso espontáneo por el que unidades monoméricas de un mismo componente interactúan mediante interacciones no-covalentes para formar estructuras de mayor complejidad. En la naturaleza, las proteínas no solo

funcionan como componentes individuales en las células, sino que también son capaces de autoensamblarse para formar estructuras más complejas que normalmente se encuentran en la naturaleza como estructuras supramoleculares proteicas, como es el caso de la queratina, el colágeno, las capas S, o las cápsides víricas. Esta tendencia innata de las proteínas para autoensamblarse en estruc-



turas jerárquicas altamente ordenadas ha inspirado el uso de la ingeniería de proteínas para el desarrollo de estructuras supramoleculares autoensambladas.(Cortajarena & Grove, 2016; Whitesides et al., 1991)

El desarrollo de materiales basados en el autoensamblaje de proteínas presenta un reto adicional al autoensamblaje de moléculas pequeñas debido a que las proteínas son moléculas más complejas. Sin embargo, gracias a la estructura macromolecular de las proteínas, se pueden desarrollar materiales en los que es posible controlar mejor la geometría que con moléculas pequeñas. El ensamblado de proteínas en estos materiales puede inducirse mediante distintas estrategias. Uno de los enfoques más comunes es el diseño de interfaces hidrofóbicas para promover el ensamblaje de los componentes individuales, permitiendo controlar las interfaces de interacción entre las proteínas y, por ende, la geometría del material.(Tyka et al., 2011) Otros enfoques por los que se puede controlar la estabilidad y reproducibilidad de los ensamblajes incluyen: enlaces biotina-estreptavidina, enlaces disulfuro,(Mejías et al., 2014; Suzuki et al., 2016) interacciones mediadas por metales,(Suzuki et al., 2016) o enlaces asistidos por interacciones peptídicas. (Ferrari et al., 2012) El uso de estas estrategias ha permitido durante los últimos años el diseño y desarrollo de fibras,(Mejías et al., 2014; Phillips et al., 2012) cristales,(Ben-Sasson et al., 2021; Suzuki et al., 2016; Zhang et al., 2020) matrices, películas,(Carter & Grove, 2015; Grove et al., 2013; Mejías et al., 2021) y jaulas,(Divine et al., 2021) basadas en proteínas, que han presentado características prometedoras para el desarrollo de materiales bioactivos o incluso bioelectrónicos.(Lai et al., 2012)

Las proteínas de repetición son candidatas excepcionales para el desarrollo de materiales novedosos debido a su característica modularidad y estructura jerárquica. Especialmente, las proteínas CTPR presentan una tendencia de autoensamblaje intrínseca que ha permitido el desarrollo de materiales con una morfología controlada gracias a esta tendencia de autoorganización. Estas propiedades innatas de autoensamblaje están mediadas por interacciones axiales entre los extremos de las superhélices observadas en el empaquetamiento de los cristales,(Cortajarena et al., 2010; Kajander et al., 2007), películas sólidas,(Carter & Grove, 2015; Grove et al., 2013) y en solución,(Phillips

et al., 2012) así como por interacciones laterales entre superhélices también observadas en el empaquetamiento de cristales.(Cortajarena et al., 2010; Kajander et al., 2007)

Esta tendencia natural de autoensamblaje ha permitido el desarrollo de materiales basados en CTPRs con una morfología y propiedades físicas controladas.(Carter & Grove, 2015; Grove et al., 2013; Mejías et al., 2016) Un ejemplo de estos materiales se desarrolló en nuestro laboratorio, donde se crearon fibras nanométricas de CTPR formadas por su tendencia innata de interacción entre extremos de las superhélices. Además, la direccionalidad de las fibras y su autoensamblado fueron optimizados mediante la adición de cisteínas en los extremos N- y C-terminales, generado enlaces covalentes que promueven la estabilización de estructuras fibrilares unidimensionales (1D) de CTPRs.(Mejías et al., 2014) La dimensionalidad de estos materiales se extendió a la segunda dimensión gracias a la tendencia natural de interacción lateral entre las superhélices. Durante los últimos años, se han desarrollado varios materiales bidimensionales (2D) basados en CTPRs mediante diferentes enfoques, demostrando la versatilidad y el potencial de estas proteínas para formar materiales nanoestructurados. Un ejemplo fue en el que se desarrollaron monocapas de CTPR20 añadiendo una cisteína en el extremo C-terminal para adherirlas a una superficie de oro mediante el enlace oro-azufre. El autoensamblaje lateral natural entre las proteínas junto su unión a la superficie de oro mediante el enlace con las cisteínas permitió el desarrollo de una monocapa compacta de proteínas.(Mejías et al., 2016) Otro ejemplo es el desarrollo de películas delgadas de CTPRs mediante la disposición de estas sobre una película de teflón, en el que el secado facilita el autoensamblaje inherente de estas proteínas. Estas películas delgadas no solo demostraron tener orden macroscópico, sino que además las proteínas conservaron su estructura nativa en el propio material, siendo este un requisito fundamental para el desarrollo de materiales funcionales (Figura 3A).(Grove et al., 2013) La investigación sobre estos materiales basados en CTPRs dio un paso más adelante gracias al estudio de su capacidad conductora. Estos materiales basados en CTPRs autoensambladas mostraron conducción, aunque baja, la cual fue potenciada mediante la funcionalización de las proteínas con nanopartículas de oro (Figura 3B).(Mejías et al., 2021)

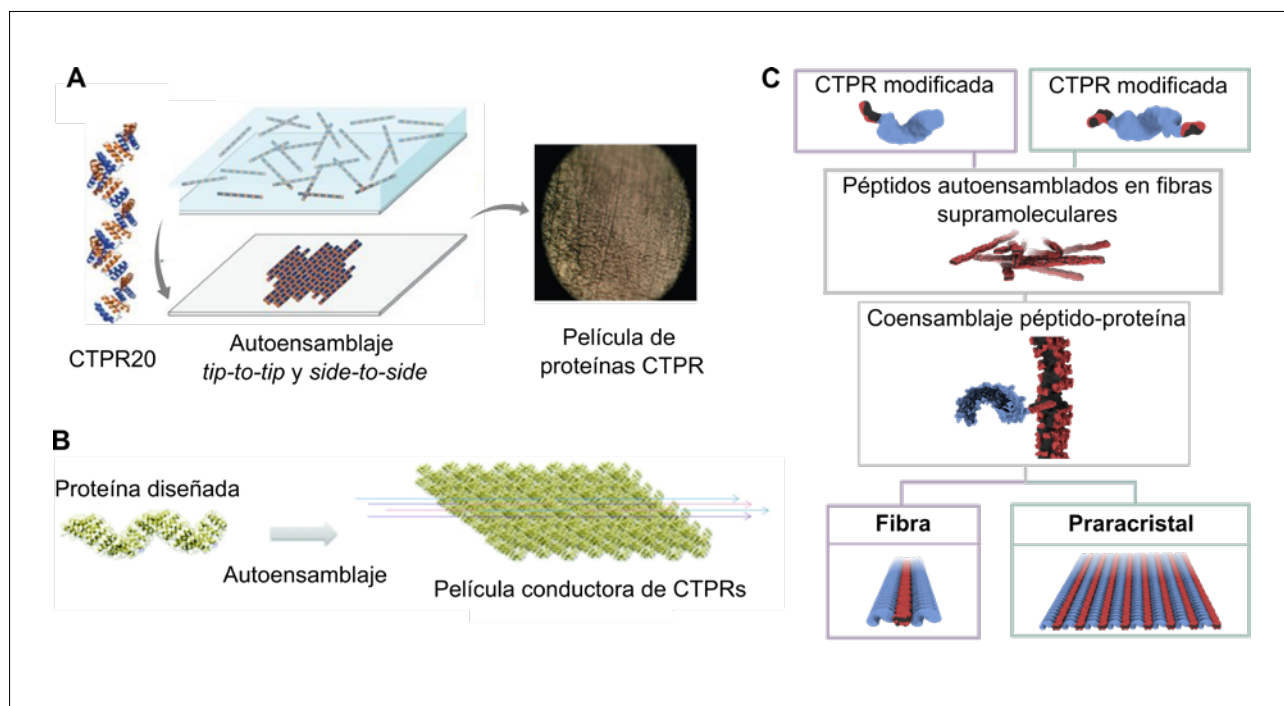


Figura 3. Materiales basados en el ensamblaje de CTPRs. A. Películas de CTPR autoensambladas. Esquema adaptado de la referencia y permiso de (Grove et al., 2013a). B. Películas autoensambladas de CTPR con capacidad conductora. Esquema adaptado de la referencia y permiso de (Mejías et al., 2021a). C. Coensamblaje entre fibras de péptidos autoensambladas con proteínas CTPR modificadas con uno o dos péptidos anfifílicos, dando lugar al desarrollo de fibras unidimensionales o un paracrystal bidimensional, respectivamente. Esquema adaptado de la referencia y permiso de (Perez-Chirinos et al., 2025).

A pesar del control sobre la morfología y propiedades de estas estructuras autoensambladas, aumentar la complejidad de estos sistemas puede tener grandes beneficios para ampliar el número de aplicaciones para los que se pueden usar estos materiales. La combinación de dos moléculas diferentes que se ensamblan para formar estructuras supramoleculares mediante interacciones no-covalentes se denomina coensamblaje. El coensamblaje de moléculas pequeñas derivadas de péptidos para formar estructuras supramoleculares se ha estudiado ampliamente durante los últimos años. (Alakpa et al., 2016; Freeman et al., 2018; Sasselli & Syrgiannis, 2020) Sin embargo, área desafiante en el desarrollo de materiales supramoleculares es el coensamblaje de proteínas. Un ejemplo de estos sistemas complejos formados por el coensamblaje de distintas proteínas fue la investigación llevada a cabo en el laboratorio del Prof. David Baker en el que desarrollaron una matriz bidimensional híbrida basado en la estructura de las capas S, compuesta por dos proteínas diseñadas completamente *de novo* espe-

cíficamente para coensamblarse en matrices hexagonales (Ben-Sasson et al., 2021).

Un paso extra de complejidad a incluir en estos sistemas es inducir el coensamblaje entre moléculas pequeñas y macromoléculas para formar sistemas con una topología determinada y ordenada. El coensamblaje entre péptidos y proteínas presenta un gran potencial para desarrollar materiales funcionales bioactivos gracias a la capacidad de ambos componentes como unidades estructurales para formar sistemas ordenados, su biocompatibilidad y funcionalidad, añadido a la amplia versatilidad que las proteínas presentan. Un ejemplo de estos sistemas fue el llevado a cabo en el laboratorio del Prof. Joel H. Collier en el que desarrollaron fibras unidimensionales mediante el coensamblaje de proteínas marcadas con péptidos amiloides y péptidos amiloides libres. (Hudalla et al., 2014) Otro ejemplo en el que el coensamblaje entre péptidos y proteínas se lleva a un nivel de complejidad mayor fue el desarrollado en nuestro grupo de investigación en



el que fueron capaces de modular la dimensionalidad (1D y 2D) de los materiales coensamblados, dependiendo del diseño específico de la proteína. En primer lugar, se diseñaron fibras supramoleculares compuestas por el autoensamblaje de péptidos anfifílicos. En segundo lugar, dos proteínas CTPR fueron diseñadas mediante la adición de uno o dos péptidos anfifílicos en los extremos de la proteína, por el que mediante el coensamblaje de los péptidos unidos a las proteínas y las fibras autoensambladas se desarrollaron materiales supramoleculares coensamblados unidimensionales y bidimensionales, respectivamente (Figura 3C). (Perez-Chirinos et al., 2025) El sistema bidimensional presentaba una anisotropía y orden características de un sistema paracristalino altamente ordenado, conseguido por el coensamblaje de ambos componentes que actúan como unidades estructurales.

NANOMATERIALES HÍBRIDOS BASADOS EN PROTEÍNAS

Los nanomateriales híbridos son estructuras formadas por la combinación de al menos un nanomaterial (material con al menos una dimensión en la escala nanométrica, es decir, menor a 10^{-9} metros) con uno o más materiales. Esta integración da lugar a una estructura única que mantiene sus dimensiones en la nanoescala y presenta propiedades emergentes derivadas de la interacción entre sus componentes. La estructura y funcionalidad de estos nanomateriales están determinadas por la naturaleza química y la arquitectura molecular de los componentes individuales, que al combinarse pueden generar nuevas propiedades o mejorar las ya existentes. (Yáñez-Seño et al., 2019)

En estos sistemas híbridos, cada componente desempeña al menos un papel específico. Uno de los componentes individuales suele proporcionar estabilidad estructural, mientras que el otro aporta funcionalidad como por ejemplo propiedades ópticas, conductoras o catalíticas. Los componentes orgánicos que se emplean para formar nanohíbridos incluyen pequeñas moléculas, polímeros, dendrímeros o biomoléculas, como ADN o proteínas. Entre los componentes inorgánicos más empleados se encuentran materiales como metales nobles, óxidos de hierro, puntos cuánticos o materiales de carbono.

La incorporación de biomoléculas en estos nanomateriales híbridos ofrece ventajas clave, como una mayor biocompatibilidad, solubilidad en medio acuoso, y estabilidad en condiciones biológicas, lo que los hace especialmente prometedores para aplicaciones en biomedicina o biotecnología.

La fabricación de estos bionanomateriales híbridos se realiza principalmente siguiendo dos metodologías diferentes, dependiendo del procedimiento de ensamblaje que se utiliza para la síntesis del elemento funcional. Una primera estrategia, consiste en la conjugación de los distintos componentes a través de enlaces moleculares o fuerzas fisicoquímicas. En el caso de los bionanomateriales basados en proteínas, se seleccionan normalmente los aminoácidos para la conjugación covalente o no covalente en la superficie de la proteína para llevar a cabo el anclaje del nanomaterial a la biomolécula. (Rana et al., 2010) La segunda estrategia para la generación de bionanomateriales es la síntesis *in situ*, que implica el crecimiento del nanomaterial en presencia de la biomolécula estabilizadora para dar lugar al nanomaterial híbrido. La biomolécula proporciona el soporte y ambiente químico adecuado para la estabilización del nanomaterial. En comparación con el enfoque de conjugación directa a proteínas mencionado anteriormente, la síntesis *in situ* permite protocolos sintéticos sencillos de un solo paso que determinan la ubicación del nanomaterial en sitios específicos dentro de la proteína, al tiempo que se preserva el tamaño a nanoescala del híbrido.

Las proteínas son especialmente atractivas como andamiaje para la síntesis de nanomateriales híbridos, ya que contienen numerosos grupos químicos funcionales (tioles, imidazoles y carboxilos) capaces de coordinar iones metálicos. (Degtyar et al., 2014; Holten-andersen & Buehler, 2021) que pueden utilizarse como sitios de unión y nucleación de metales, así como promover el crecimiento de los nanomateriales de forma controlada. Por ejemplo, se ha observado que las tirosinas reducen los iones metálicos, y que la capacidad de reducción aumenta a un pH superior al pKa de la cadena lateral fenólica de la tirosina (en torno a 10). (Xie et al., 2007) Esta característica posibilita la síntesis directa de nanopartículas (NP) a temperatura ambiente en una solución acuosa sin la necesidad de tensioactivos orgánicos ni reactivos tóxicos, que suponen un elevado coste y riesgos medioambientales. La comprensión de la función de los distintos aminoácidos en la coordinación y reducción de los iones metálicos permite

ajustar el tamaño y las características de las NP a través de la modificación de la secuencia de la proteína y, en consecuencia, de su estructura. Además, la biocompatibilidad de las proteínas facilita el posterior empleo de estos híbridos en aplicaciones biomédicas. El uso de andamios proteicos también puede mejorar la estabilidad, solubilidad en agua y las propiedades de orientación de los nanomateriales al actuar como interfaz entre la NP y el entorno. Por último, la diversidad química presente en la proteína permite modificar la superficie con otros elementos funcionales.(Meng et al., 2020)

Entre los híbridos proteína-metal, los nanoclústeres de metales nobles estabilizados con proteínas, en particular, los nanoclústeres de Au (AuNC) han atraído un interés considerable debido a su gran fotoluminiscencia, fluorescencia dependiente del tamaño, fotoestabilidad y biocompatibilidad. Estos nanoclústeres constan de unos pocos a cientos de átomos y tamaños inferiores a 2 nm, y se consideran intermedios entre las nanopartículas de oro (AuNP) y las moléculas aisladas. El método más utilizado para su síntesis mediada por proteínas consiste en la coordinación de iones Au(III) en aminoácidos reactivos, como cisteínas e histidinas, seguido de su reducción a Au(0) a un pH alto o mediante la adición de agentes reductores fuertes, como NaOH o NaBH_4 , o suaves como el ácido ascórbico, para lograr una reducción total o parcial del metal. Desde el primer trabajo publicado por Xie et al. en 2009,(Xie et al., 2009) en el que se empleó albúmina de suero bovino (BSA) para preparar nanomateriales de oro fluorescentes, se ha utilizado una gran cantidad de proteínas naturales como andamiaje molecular para la síntesis de este tipo de nanomateriales híbridos. La ovoalbúmina, papaína, glucosa oxidasa, peroxidasa de rábano, pepsina, tripsina o lisozima son algunas de las proteínas naturales que se han empleado como estructura biomolecular para la estabilización de híbridos de oro fluorescentes. Sin embargo, el uso de estas proteínas naturales para la síntesis de nanomateriales híbridos presenta limitaciones dadas por su propia secuencia y estructura molecular. Por el contrario, las proteínas diseñadas son una herramienta prometedora para la síntesis y estabilización de nanomateriales híbridos con propiedades mejoradas y funcionalidades biológicas codificadas por proteínas.(Beloqui & Cortajarena, 2020)

Nuestro grupo de investigación ha demostrado el potencial de las proteínas ingenierizadas en la generación de nanomateriales híbridos con propieda-

des ópticas definidas. Se demostró por primera vez que las proteínas de repetición CTPR con una sola cisteína en su secuencia pueden estabilizar AuNC de manera eficaz, dando lugar a nanoestructuras híbridas funcionales con emisión fotoluminiscente roja.(Couleaud et al., 2015) Además, mediante la ingeniería de proteínas se han introducido sitios de coordinación de metales en la secuencia de proteína CTPR para la síntesis de AuNC altamente luminiscentes. Los sitios de unión de metales, basados en residuos de histidinas, facilitaron la estabilización de híbridos proteína-AuNC con excelentes propiedades fluorescentes emisoras de luz azul, mientras que los basados en cisteínas produjeron AuNC tanto fluorescencia azul, como emisión dual, azul y roja, centradas en 450 y 700 nm, respectivamente.(Aires et al., 2019; Aires, Maestro, et al., 2021; Aires, Sousaraei, et al., 2021) También se ha demostrado que la introducción de triptófanos en posiciones específicas mejoraba las propiedades de fotoluminiscencia debido al entorno proteico rico en electrones proporcionado por los triptófanos y la transferencia de energía de estos aminoácidos a los AuNC.(Aires, Sousaraei, et al., 2021) Además, cuando se combinaron AuNC sin ligandos orgánicos con proteínas CTPR que contenían 16 aminoácidos de coordinación de histidina o cisteína, se obtuvieron híbridos con propiedades ópticas distintas en términos de emisión de fluorescencia y tiempos de vida de luminiscencia.(Lopez-Martinez et al., 2022)

Estas investigaciones han puesto de manifiesto el papel relevante del andamiaje proteico en las características fotofísicas de los híbridos resultantes, ya que las proteínas con estructuras similares y un entorno de coordinación distinto permitieron un ajuste preciso de la longitud de onda de emisión, rendimiento cuántico, tiempo de vida y mecanismos de emisión.

APLICACIONES

Las proteínas de diseño y los nanomateriales híbridos basados en proteínas ingenierizadas disponen de un amplio rango aplicaciones, que van desde la catálisis y la biomedicina hasta el desarrollo de materiales conductores. Entre estas aplicaciones, las nanopartículas funcionalizadas con proteínas destacan por su versatilidad y potencial para abordar retos específicos en diversas áreas.

Aplicaciones biomédicas

En el ámbito biomédico, las nanopartículas de óxido de hierro (IONP) han demostrado ser especialmente prometedoras, particularmente como agentes de contraste para imagen por resonancia magnética (IRM) debido a sus propiedades magnéticas y biocompatibilidad. Sin embargo, aunque varias IONP han sido aprobadas por las agencias reguladoras como agentes de contraste para IRM, su aplicación como agentes de contraste negativo limita su uso. Además, existe una creciente necesidad de desarrollar agentes de contraste moleculares capaces de dirigirse específicamente a biomarcadores, lo que permitiría diagnósticos más precisos y sensibles.(Wahsner et al., 2019)

Para abordar estos desafíos, se ha aplicado la ingeniería de proteínas para conseguir estabilizar IONPs con propiedades magnéticas definidas, creando nanopartículas de óxido de hierro estabilizadas con proteínas (Prot-IONPs)(Aires et al., 2022) y aprovechando la diversidad química de las proteínas para funcionalizar las Prot-IONPs con moléculas que reconozcan biomarcadores específicos (Figura 4).(Guedes et al., 2024)

La versatilidad química del andamiaje proteico CTPR y la estabilidad del sistema se utilizó para desarrollar un agente de contraste dirigido.(Guedes et al., 2024) Para ello, se utilizó una proteína ingenierizada para estabilizar IONPs, con valores

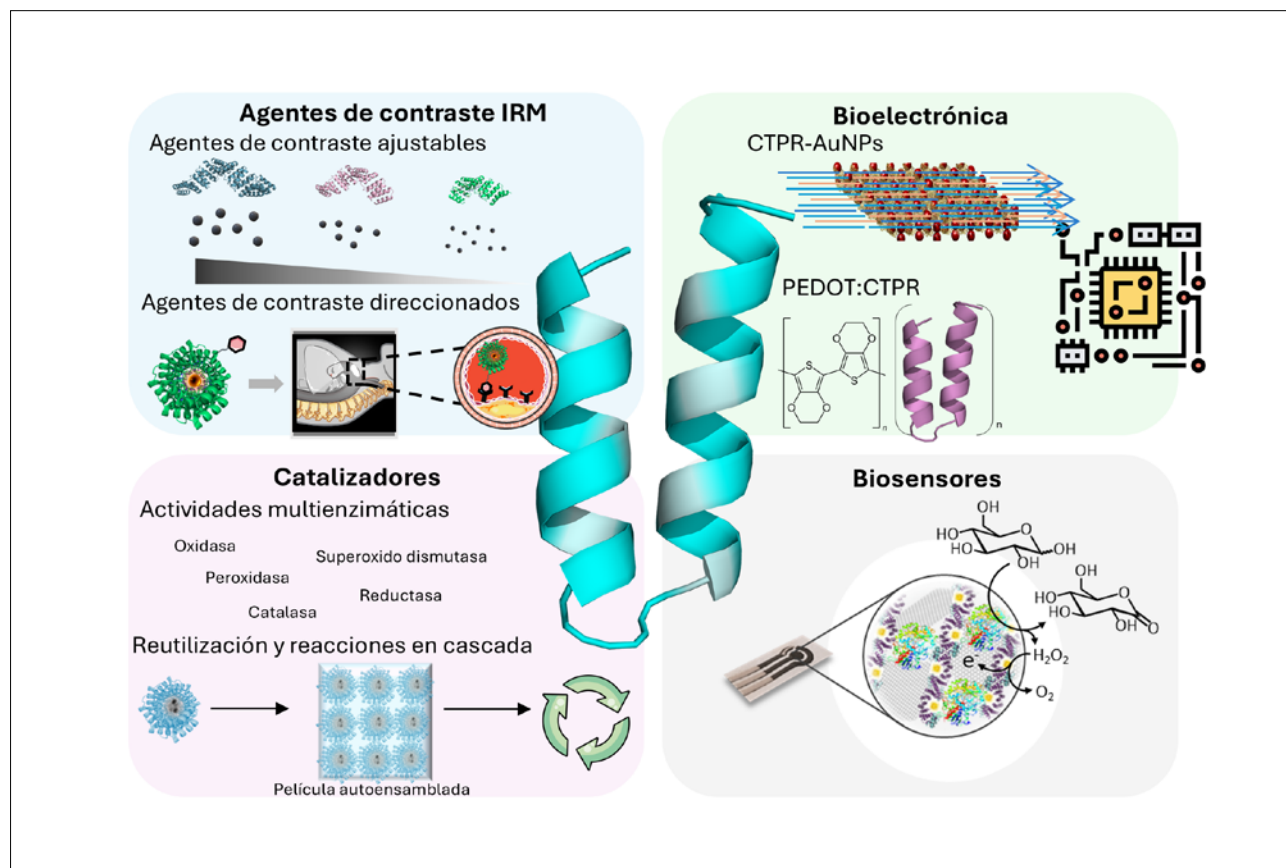


Figura 4. Versatilidad de las CTPRs para el desarrollo de materiales híbridos innovadores en distintos campos. Los avances más recientes incluyen el desarrollo de agentes de contraste de resonancia magnética mejorados y específicos, en los que las propiedades de relajividad pueden ajustarse en función del tamaño de la proteína; la creación de híbridos proteína-nanoclúster que presentan múltiples funciones catalíticas y pueden autoensamblarse y reutilizarse; el uso de coensamblados de péptido-proteína, la integración de proteínas-AuNPs, y de polímeros conductores dopados con proteínas para producir materiales conductores; y la aplicación de híbridos proteína-nanoclúster como biosensores de alta sensibilidad. La figura fue generada parcialmente utilizando Servier Medical Art, proporcionado por Servier, licenciado bajo una licencia Creative Commons Atribución 3.0 unported. Paneles adaptados con permiso de (Guedes et al., 2024), (Mejías et al., 2021) y (Silvestri et al., 2023).

de relaxividad mejorados en comparación con los agentes de contraste utilizados en la práctica clínica.(European Medicines Agency, n.d.; Rohrer et al., 2005; Wahsner et al., 2019) Este híbrido mostró los valores de relaxividad más altos entre múltiples andamiajes proteicos evaluados, y no presentó citotoxicidad, convirtiéndose en el candidato ideal para el desarrollo de agentes de contraste dirigidos. Dada su prevalencia, se seleccionó la detección de aterosclerosis, y para ello, el andamiaje proteico se conjugó con alendronato una molécula selectiva de las calcificaciones de las placas de ateroma.(Caffarelli et al., 2017; Li et al., 2016; Pellico et al., 2021) Aunque en este estudio el alendronato sirvió como prueba de concepto de agente diana para las calcificaciones en la aterosclerosis, podrían emplearse otras moléculas, estableciendo así una plataforma versátil y biocompatible para la detección de diversas afecciones. Gracias al sencillo protocolo de conjugación basado en la química tiol-maleimida desarrollado, es posible utilizar cualquier pequeña molécula inorgánica, lo que permite el desarrollo de agentes de contraste «a la carta» para una gran variedad de enfermedades. Además, este estudio demostró la robustez de la estrategia de conjugación y del híbrido proteína-nanomaterial resultante, que mantiene su estabilidad tras una inyección intravenosa *in vivo* y se acumula en la diana, permitiendo la detección de la placa aterosclerótica con contraste positivo.

Aplicaciones en catálisis

En el ámbito de la catálisis, las enzimas desempeñan un papel crucial en nuestra vida cotidiana, siendo esenciales en una amplia gama de procesos biológicos, así como en la industria biotecnológica, médica y alimentaria.(Reetz et al., 2024; Wu et al., 2021; Yushkova et al., 2019) Sin embargo, estas presentan inconvenientes inherentes, como la pérdida de actividad debido a su desnaturalización y las dificultades de purificación, almacenamiento y reciclado, lo que limita sus aplicaciones. Las nanozimas artificiales han surgido como un enfoque alternativo que puede adaptarse a necesidades específicas y modularse para superar los inconvenientes de las enzimas. La actividad de los nanozimas se asemeja a la de las enzimas, y adicionalmente poseen una gran estabilidad estructural, actividad catalítica ajustable, diversidad funcional, versatilidad, reciclabilidad y viabilidad en la

preparación a gran escala.(Wei & Wang, 2013) En colaboración entre nuestro laboratorio y el grupo de la Dra. Ana Beloqui se diseñaron y desarrollaron nanozimas basadas en la proteína CTPR como guía para el crecimiento y la estabilización de nanoclústeres metálicos (NCs) sintetizadas *in situ*. Las nanozimas basadas en platino (Pt), que utilizan un andamiaje proteínico CTPR con sitios de coordinación de histidina diseñados, presentaron una mayor termoestabilidad y resistencia al peróxido de hidrógeno que las peroxidasas naturales, como la peroxidasa de rábano. Además, se fabricaron películas compuestas de nanozimas utilizando las propiedades de autoensamblaje del andamiaje CTPR. Estos materiales demuestran un rendimiento catalítico sostenido a lo largo de múltiples ciclos de reacción, mostrando el potencial de las nanozimas provocadas por proteínas como una alternativa prometedora a las enzimas naturales en diversas aplicaciones. (López-Domene et al., 2023) (Figura 4).

Aplicaciones en bioelectrónica

Un enfoque innovador que podría revolucionar diferentes campos de aplicación es el desarrollo de materiales conductores basados en proteínas. Como se ha demostrado y discutido anteriormente, las capacidades de autoensamblaje permiten la fabricación de ensamblajes funcionales.(López-Andarias et al., 2018; Mejías et al., 2016) Trabajos paralelos demostraron que la incorporación de AuNPs para la interconexión eléctrica de enzimas redox, o el ensamblaje de la proteína hemo asistido por AuNPs mejoraban efectivamente de la eficiencia de transferencia de carga a larga distancia.(Abad et al., 2009; Jensen et al., 2007; Xiao et al., 2003) Esto inspiró el uso de AuNPs como elementos conductores en películas híbridas macroscópicas basadas en CTPR (Figura 4). En esta investigación, llevada a cabo en nuestro laboratorio, las proteínas CTPRs fueron diseñadas para moldear AuNPs,(Mejías et al., 2021) desarrollando películas sólidas tanto de CTPR como de CTPR-AuNPs.(Grove et al., 2013) Estas películas de CTPR mostraron una conductividad registrable a escalas de longitud micro-métricas y atribuida principalmente al transporte de carga protónica. Además, las películas híbridas CTPR-AuNPs presentaron una mejora en la conductividad en comparación con las películas CTPR y, presumiblemente, diferentes propiedades de transporte de carga. En un estudio posterior, se



desarrollaron unas películas de un material con orden anisotrópico basado en el coensamblaje de fibras de péptidos autoensamblados y CTPRs modificadas, que presentó las características de conductividad protónica típicas de las películas formadas por el autoensamblaje de proteínas CTPR.(Perez-Chirinos et al., 2025) Estos resultados resaltan la importancia de la proteína CTPR como material bioconductor, que puede ser mejorada mediante el uso de nanoelementos altamente conductores, y con la posibilidad de obtener un material con una topología altamente ordenada mediante el coensamblaje con otras biomoléculas sin perder las capacidades conductoras de las CTPRs, para la futura aplicación de sistemas híbridos basados en proteínas en el campo de la bioelectrónica.

Como enfoque alternativo, la utilización de proteínas como dopantes de polímeros conductores de la electricidad podría proporcionar una plataforma flexible y adaptable para la ingeniería de materiales con diversas morfologías y funciones, mejorando al mismo tiempo la biocompatibilidad de los compuestos. En un estudio pionero, se dopó PEDOT (poli(3,4-etilendioxitiofeno)) con una familia de proteínas CTPR de distintas longitudes para crear un nuevo material conductor.(Dominguez-Alfaro et al., 2024) La interacción entre las CTPRs y PEDOT dio lugar a un material con una conducción mixta iónica-electrónica, con valores de conductividad electrónica comparables a los de PEDOT:PSS, el sistema de referencia en bioelectrónica. Además, mostró una biocompatibilidad mejorada con fibroblastos. Este estudio pone de manifiesto que el PEDOT:CTPR es una alternativa prometedora al PEDOT:PSS en bioelectrónica, ya que combina excelentes propiedades electrónicas, biocompatibilidad e idoneidad para técnicas de fabricación avanzadas como la impresión por inyección de tinta.

Aplicaciones en biosensores

Por último, una aplicación similar derivada de estos nanomateriales fue la generación de tintas electroactivas y autoensamblables para impresión por inyección, basadas en la combinación de nanohíbridos metálicos proteicos y grafeno exfoliado. La formulación de la tinta incluye proteínas CTPR que se emplearon como andamiaje para la síntesis de NC bimetalicos de Au y Pt y como unidad

estructural para la formación de películas de proteínas autoensambladas en seco. La incorporación de grafeno en la formulación de la tinta, mejora drásticamente las propiedades electrocatalíticas de la tinta, obteniendo un material híbrido eficiente para la detección electroquímica de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Utilizando esta biotinta, se pueden fabricar dispositivos analíticos electroquímicos basados en papel (ePAD) desechables y sostenibles para detectar H_2O_2 . Además, se pueden incluir enzimas oxidoreductasas en la composición, con el fin de imprimir por inyección de tinta distintos biosensores amperométricos enzimáticos, como, por ejemplo, sensores de glucosa. (Silvestri et al., 2023)

CONCLUSIONES

Este artículo pone de manifiesto el gran potencial de las proteínas de repetición, y en particular el de las CTPRs, como plataformas versátiles para el desarrollo de materiales funcionales. Su simplicidad estructural y modularidad permiten un alto grado de control sobre el diseño de materiales autoensamblados e híbridos, con propiedades específicas, como conductividad eléctrica, fotoconducción, capacidad para generar contraste en imagen molecular y catálisis, entre otras.

Los avances descritos en este trabajo demuestran cómo estas proteínas de repetición, gracias a su naturaleza modular, se han consolidado como plataformas eficaces para el diseño de materiales funcionales. Paralelamente, los avances recientes en la ingeniería de proteínas han impulsado una expansión acelerada del campo, permitiendo el diseño de proteínas con funciones específicas para abordar retos complejos. En los próximos años, se espera que esta disciplina continúe avanzando, impulsada por mejoras en aproximaciones computacionales y la aplicación de inteligencia artificial, así como avances experimentales con metodologías de alto rendimiento. Esto permitirá diseñar proteínas con propiedades optimizadas para aplicaciones específicas de forma más rápida y con un mayor grado de complejidad, ofreciendo soluciones desde la ingeniería de proteínas a desafíos globales, como enfermedades emergentes, terapias avanzadas, sostenibilidad ambiental y energética, entre otros.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores/as de este artículo declaran no tener ningún tipo de conflicto de intereses respecto a lo expuesto en el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aires, A., Fernández-Afonso, Y., Guedes, G., Guisasola, E., Gutiérrez, L., & Cortajarena, A. L. (2022). Engineered Protein-Driven Synthesis of Tunable Iron Oxide Nanoparticles as T1 and T2 Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *Chemistry of Materials*, 34(24), 10832–10841. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.2c01746>
2. Aires, A., Llarena, I., Moller, M., Castro-Smirnov, J., Cabanillas-Gonzalez, J., & Cortajarena, A. L. (2019). A Simple Approach to Design Proteins for the Sustainable Synthesis of Metal Nanoclusters. *Angew. Chem.*, 131(19), 6280–6285. <https://doi.org/10.1002/ange.201813576>
3. Aires, A., Lopez-Martinez, E., & Cortajarena, A. (2018). Sensors Based on Metal Nanoclusters Stabilized on Designed Proteins. *Biosensors*, 8(4), 110. <https://doi.org/10.3390/bios8040110>
4. Aires, A., Maestro, D., Ruiz del Rio, J., Palanca, A. R., Lopez-Martinez, E., Llarena, I., Geraki, K., Sanchez-Cano, C., Villar, A. V., & Cortajarena, A. L. (2021). Engineering multifunctional metal/protein hybrid nanomaterials as tools for therapeutic intervention and high-sensitivity detection. *Chemical Science*, 12(7), 2480–2487. <https://doi.org/10.1039/D0SC05215A>
5. Aires, A., Sousaraei, A., Möller, M., Cabanillas-Gonzalez, J., & Cortajarena, A. L. (2021). Boosting the Photoluminescent Properties of Protein-Stabilized Gold Nanoclusters through Protein Engineering. *Nano Letters*, 21(21), 9347–9353. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.1c03768>
6. Alakpa, E. V., Jayawarna, V., Lampel, A., Burgess, K. V., West, C. C., Bakker, S. C. J., Roy, S., Javid, N., Fleming, S., Lamprou, D. A., Yang, J., Miller, A., Urquhart, A. J., Frederix, P. W. J. M., Hunt, N. T., Péault, B., Ulijn, R. V., & Dalby, M. J. (2016). Tunable Supramolecular Hydrogels for Selection of Lineage-Guiding Metabolites in Stem Cell Cultures. *Chem*, 1(2), 298–319. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2016.07.001>
7. Andrade, M. A., Perez-Iratxeta, C., & Ponting, C. P. (2001). Protein repeats: Structures, functions, and evolution. *Journal of Structural Biology*, 134(2–3), 117–131. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2001.4392>
8. Baek, M., DiMaio, F., Anishchenko, I., Dauparas, J., Ovchinnikov, S., Lee, G. R., Wang, J., Cong, Q., Kinch, L. N., Schaeffer, R. D., Millán, C., Park, H., Adams, C., Glassman, C. R., DeGiovanni, A., Pereira, J. H., Rodrigues, A. V., van Dijk, A. A., Ebrecht, A. C., ... Baker, D. (2021). Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science*, 373(6557), 871–876. <https://doi.org/10.1126/science.abj8754>
9. Beloqui, A., & Cortajarena, A. L. (2020). Protein-based functional hybrid bionanomaterials by bottom-up approaches. *Current Opinion in Structural Biology*, 63, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.04.005>
10. Ben-Sasson, A. J., Watson, J. L., Sheffler, W., Johnson, M. C., Bittleston, A., Somasundaram, L., Decarreau, J., Jiao, F., Chen, J., Mela, I., Drabek, A. A., Jarrett, S. M., Blacklow, S. C., Kaminski, C. F., Hura, G. L., De Yoreo, J. J., Kollman, J. M., Ruohola-Baker, H., Derivery, E., & Baker, D. (2021). Design of biologically active binary protein 2D materials. *Nature*, 589(7842), 468–473. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03120-8>
11. Binz, H. K., Stumpp, M. T., Forrer, P., Amstutz, P., & Plückthun, A. (2003). Designing repeat proteins: Well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins. *Journal of Molecular Biology*, 332(2), 489–503. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00896-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00896-9)
12. Boersma, Y. L., & Plu, A. (2011). DARPin and other repeat protein scaffolds: advances in engineering and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 849–857. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.06.004>



13. Caffarelli, C., Montagnani, A., Nuti, R., & Gonnelli, S. (2017). Bisphosphonates, atherosclerosis and vascular calcification: Update and systematic review of clinical studies. *Clinical Interventions in Aging*, 12, 1819–1828. <https://doi.org/10.2147/CIA.S138002>
14. Carter, N. A., & Grove, T. Z. (2015). Repeat-Proteins Films Exhibit Hierarchical Anisotropic Mechanical Properties. *Biomacromolecules*, 16(3), 706–714. <https://doi.org/10.1021/bm501578j>
15. Coquille, S., Filipovska, A., Chia, T., Rajappa, L., Lingford, J. P., Razif, M. F. M., Thore, S., & Rakhman, O. (2014). An artificial PPR scaffold for programmable RNA recognition. *Nature Communications*, 5, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms6729>
16. Cortajarena, A. L., Mochrie, S. G. J., & Regan, L. (2011). Modulating repeat protein stability: The effect of individual helix stability on the collective behavior of the ensemble. *Protein Science*, 20(6), 1042–1047. <https://doi.org/10.1002/pro.638>
17. Cortajarena, A. L., Wang, J., & Regan, L. (2010). Crystal structure of a designed tetratricopeptide repeat module in complex with its peptide ligand. *The FEBS Journal*, 277(4), 1058–1066. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07549.x>
18. Couleaud, P., Adan-Bermudez, S., Aires, A., Mejías, S. H., Sot, B., Somoza, A., & Cortajarena, A. L. (2015). Designed Modular Proteins as Scaffolds to Stabilize Fluorescent Nanoclusters. *Biomacromolecules*, 16(12), 3836–3844. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01147>
19. Degtyar, E., Harrington, M. J., Politi, Y., & Fratzl, P. (2014). The Mechanical Role of Metal Ions in Biogenic Protein-Based Materials. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(45), 12026–12044. <https://doi.org/10.1002/anie.201404272>
20. Divine, R., Dang, H. V., Ueda, G., Fallas, J. A., Vulovic, I., Sheffler, W., Saini, S., Zhao, Y. T., Raj, I. X., Morawski, P. A., Jennewein, M. F., Homad, L. J., Wan, Y.-H., Tooley, M. R., Seeger, F., Etemadi, A., Fahning, M. L., Lazarovits, J., Roederer, A., ... Baker, D. (2021). Designed proteins assemble antibodies into modular nanocages. *Science*, 372(6537). <https://doi.org/10.1126/science.abd9994>
21. Dominguez-Alfaro, A., Casado, N., Fernandez, M., Garcia-Esnaola, A., Calvo, J., Mantione, D., Calvo, M. R., & Cortajarena, A. L. (2024). Engineering Proteins for PEDOT Dispersions: A New Horizon for Highly Mixed Ionic-Electronic Biocompatible Conducting Materials. *Small*, 20(22), 1–16. <https://doi.org/10.1002/sml.202307536>
22. Donnelly, A. E., Murphy, G. S., Digianantonio, K. M., & Hecht, M. H. (2018). A de novo enzyme catalyzes a life-sustaining reaction in *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology*, 14(3), 253–255. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2550>
23. European Medicines Agency. (n.d.). Gadolinium-containing contrast agents. Retrieved November 30, 2021, from <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/gadolinium-containing-contrast-agents>
24. Ferrari, E., Soloviev, M., Niranjana, D., Arsenault, J., Gu, C., Vallis, Y., O'Brien, J., & Davletov, B. (2012). Assembly of Protein Building Blocks Using a Short Synthetic Peptide. *Bioconjugate Chemistry*, 23(3), 479–484. <https://doi.org/10.1021/bc2005208>
25. Freeman, R., Han, M., Álvarez, Z., Lewis, J. A., Wester, J. R., Stephanopoulos, N., McClendon, M. T., Lynsky, C., Godbe, J. M., Sangji, H., Luijten, E., & Stupp, S. I. (2018). Reversible self-assembly of superstructured networks. *Science*, 362(6416), 808–813. <https://doi.org/10.1126/science.aat6141>
26. Grove, T. Z., Regan, L., & Cortajarena, A. L. (2013). Nanostructured functional films from engineered repeat proteins. *Journal of The Royal Society Interface*, 10(83), 20130051. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0051>
27. Guedes, G., Uribe, K. B., Martínez-Parra, L., Aires, A., Beraza, M., Ruiz-Cabello, J., & Cortajarena, A. L. (2024). Engineering Protein–Nanoparticle Hybrids as Targeted Contrast Agents. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 16(44), 59849–59861. <https://doi.org/10.1021/acsami.4c12799>
28. Gully, B. S., Shah, K. R., Lee, M., Shearston, K., Smith, N. M., Sadowska, A., Blythe, A. J., Bernath-Levin, K., Stanley, W. A., Small, I. D., & Bond, C. S. (2015). The design and structural characterization of a synthetic pentatricopeptide repeat



- protein. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 71, 196–208. <https://doi.org/10.1107/S1399004714024869>
29. Holten-andersen, N., & Buehler, M. J. (2021). Transition-metal coordinate bonds for bioinspired macromolecules with tunable mechanical properties. *Nature Reviews Materials*, 6, 421–436. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-00270-z>
30. Huang, P.-S., Boyken, S. E., & Baker, D. (2016). The coming of age of de novo protein design. *Nature*, 537(7620), 320–327. <https://doi.org/10.1038/nature19946>
31. Hudalla, G. A., Sun, T., Gasiorowski, J. Z., Han, H., Tian, Y. F., Chong, A. S., & Collier, J. H. (2014). Gradated assembly of multiple proteins into supramolecular nanomaterials. *Nature Materials*, 13(8), 829–836. <https://doi.org/10.1038/nmat3998>
32. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
33. Kajander, T., Cortajarena, A. L., Main, E. R. G. G., Mochrie, S. G. J. J., & Regan, L. (2005). A New Folding Paradigm for Repeat Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 127(29), 10188–10190. <https://doi.org/10.1021/ja0524494>
34. Kajander, T., Cortajarena, A. L., Mochrie, S., & Regan, L. (2007). Structure and stability of designed TPR protein superhelices: unusual crystal packing and implications for natural TPR proteins. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 63(7), 800–811. <https://doi.org/10.1107/S09074444907024353>
35. L. Cortajarena, A., & Z. Grove, T. (2016). Protein-based Engineered Nanostructures (Vol. 940).
36. Lai, Y.-T., King, N. P., & Yeates, T. O. (2012). Principles for designing ordered protein assemblies. *Trends in Cell Biology*, 22(12), 653–661. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.08.004>
37. Lee, S. C., Park, K., Han, J., Lee, J. J., Kim, H. J., Hong, S., Heu, W., Kim, Y. J., Ha, J. S., Lee, S. G., Cheong, H. K., Jeon, Y. H., Kim, D., & Kim, H. S. (2012). Design of a binding scaffold based on variable lymphocyte receptors of jawless vertebrates by module engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(9), 3299–3304. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113193109>
38. Leman, J. K., Weitzner, B. D., Lewis, S. M., Adolf-Bryfogle, J., Alam, N., Alford, R. F., Aprahamian, M., Baker, D., Barlow, K. A., Barth, P., Basanta, B., Bender, B. J., Blacklock, K., Bonnet, J., Boyken, S. E., Bradley, P., Bystroff, C., Conway, P., Cooper, S., ... Bonneau, R. (2020). Macromolecular modeling and design in Rosetta: recent methods and frameworks. *Nature Methods*, 17(7), 665–680. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-0848-2>
39. Li, N., Song, J., Zhu, G., Shi, X., & Wang, Y. (2016). Alendronate conjugated nanoparticles for calcification targeting. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 142, 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.015>
40. López-Domene, R., Vázquez-Díaz, S., Modin, E., Beloqui, A., & Cortajarena, A. L. (2023). An Emerging Nanozyme Class for à la carte Enzymatic-Like Activities based on Protein-Metal Nanocluster Hybrids. *Advanced Functional Materials*, 33(37), 1–13. <https://doi.org/10.1002/adfm.202301131>
41. Lopez-Martinez, E., Gianolio, D., Garcia-Orrit, S., Vega-Mayoral, V., Cabanillas-Gonzalez, J., Sanchez-Cano, C., & Cortajarena, A. L. (2022). Tuning the Optical Properties of Au Nanoclusters by Designed Proteins. *Advanced Optical Materials*, 10(1), 2101332. <https://doi.org/10.1002/adom.202101332>
42. MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., ... Karplus, M. (1998). All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(18), 3586–3616. <https://doi.org/10.1021/jp973084f>



43. Main, E. R. G., Xiong, Y., Cocco, M. J., D'Andrea, L., & Regan, L. (2003). Design of Stable α -Helical Arrays from an Idealized TPR Motif. *Structure*, 11(5), 497–508. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(03\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(03)00076-5)
44. Marcos, E., & Silva, D. (2018). Essentials of de novo protein design: Methods and applications. *WIREs Computational Molecular Science*, 8(6). <https://doi.org/10.1002/wcms.1374>
45. Mejias, S. H., Couleaud, P., Casado, S., Granados, D., Garcia, M. A., Abad, J. M., & Cortajarena, A. L. (2016). Assembly of designed protein scaffolds into monolayers for nanoparticle patterning. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 141, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.039>
46. Mejias, S. H., López-Martínez, E., Fernandez, M., Couleaud, P., Martin-Lasanta, A., Romera, D., Sanchez-Iglesias, A., Casado, S., Osorio, M. R., Abad, J. M., González, M. T., & Cortajarena, A. L. (2021). Engineering conductive protein films through nanoscale self-assembly and gold nanoparticles doping. *Nanoscale*, 13(14), 6772–6779. <https://doi.org/10.1039/D1NR00238D>
47. Mejías, S. H., Sot, B., Guantes, R., & Cortajarena, A. L. (2014). Controlled nanometric fibers of self-assembled designed protein scaffolds. *Nanoscale*, 6(19), 10982–10988. <https://doi.org/10.1039/C4NR01210K>
48. Meng, X., Zare, I., Yan, X., & Fan, K. (2020). Protein-protected metal nanoclusters: An emerging ultra-small nanozyme. *WIREs Biomedicine and Nanobiotechnology*, 12(3), e1602. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/wnan.1602>
49. Park, H., Bradley, P., Greisen, P., Liu, Y., Mulligan, V. K., Kim, D. E., Baker, D., & DiMaio, F. (2016). Simultaneous Optimization of Biomolecular Energy Functions on Features from Small Molecules and Macromolecules. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(12), 6201–6212. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.6b00819>
50. Parmeggiani, F., & Huang, P. (2017). Designing repeat proteins: a modular approach to protein design. *Current Opinion in Structural Biology*, 45, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.02.001>
51. Parmeggiani, F., Pellarin, R., Larsen, A. P., Varadasetty, G., Stumpp, M. T., Zerbe, O., Caflisch, A., & Plückthun, A. (2008). Designed Armadillo Repeat Proteins as General Peptide-Binding Scaffolds: Consensus Design and Computational Optimization of the Hydrophobic Core. *Journal of Molecular Biology*, 376(5), 1282–1304. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.014>
52. Pellico, J., Fernández-Barahona, I., Ruiz-Cabello, J., Gutiérrez, L., Muñoz-Hernando, M., Sánchez-Guisado, M. J., Aiestaran-Zelaia, I., Martínez-Parra, L., Rodríguez, I., Bentzon, J., & Herranz, F. (2021). HAP-Multitag, a PET and Positive MRI Contrast Nanotracer for the Longitudinal Characterization of Vascular Calcifications in Atherosclerosis. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(38), 45279–45290. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c13417>
53. Perez-Chirinos, L., Almonte, L., Cortés-Osea, J. D., Solano, E., Calvo, M. R., Sasselli, I., & L. Cortajarena, A. (2025). Tuning the Dimensionality of Protein–Peptide Coassemblies to Build 2D Conductive Nanomaterials. *ACS Nano* 2025, 19, 17, 16500–16516. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.4c18613>
54. Phillips, J. J., Millership, C., & Main, E. R. G. (2012). Fibrous Nanostructures from the Self-Assembly of Designed Repeat Protein Modules. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(52), 13132–13135. <https://doi.org/10.1002/anie.201203795>
55. Ponder, J. W., & Case, D. A. (2003). Force Fields for Protein Simulations (pp. 27–85). [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(03\)66002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(03)66002-X)
56. Rana, S., Yeh, Y.-C., & Rotello, V. M. (2010). Engineering the nanoparticle–protein interface: applications and possibilities. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(6), 828–834. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.10.001>
57. Reetz, M. T., Qu, G., & Sun, Z. (2024). Engineered enzymes for the synthesis of pharmaceuticals and other high-value products. *Nature Synthesis*, 3(1), 19–32. <https://doi.org/10.1038/s44160-023-00417-0>
58. Rohrer, M., Bauer, H., Mintorovitch, J., Requardt, M., & Weinmann, H.-J. (2005). Comparison of Magnetic Properties of MRI Contrast Media So-



- lutions at Different Magnetic Field Strengths. *Investigative Radiology*, 40(11), 715–724. <https://doi.org/10.1097/01.rli.0000184756.66360.d3>
59. Romeo, M. V., López-Martínez, E., Berganza-Granda, J., Goñi-de-Cerio, F., & Cortajarena, A. L. (2021). Biomarker sensing platforms based on fluorescent metal nanoclusters. *Nanoscale Advances*, 3(5), 1331–1341. <https://doi.org/10.1039/D0NA00796J>
60. Sasselli, I. R., & Syrgiannis, Z. (2020). Small Molecules Organic Co-Assemblies as Functional Nanomaterials. *European Journal of Organic Chemistry*, 2020(33), 5305–5318. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202000529>
61. Saven, J. G. (2010). Computational protein design: Advances in the design and redesign of biomolecular nanostructures. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1–2), 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.06.002>
62. Silvestri, A., Vázquez-Díaz, S., Misia, G., Poletti, F., López-Domene, R., Pavlov, V., Zanardi, C., Cortajarena, A. L., & Prato, M. (2023). An Electroactive and Self-Assembling Bio-Ink, based on Protein-Stabilized Nanoclusters and Graphene, for the Manufacture of Fully Inkjet-Printed Paper-Based Analytical Devices. *Small*. <https://doi.org/10.1002/SMLL.202300163>
63. Suzuki, Y., Cardone, G., Restrepo, D., Zavattieri, P. D., Baker, T. S., & Tezcan, F. A. (2016). Self-assembly of coherently dynamic, auxetic, two-dimensional protein crystals. *Nature*, 533(7603), 369–373. <https://doi.org/10.1038/nature17633>
64. Tyka, M. D., Keedy, D. A., André, I., DiMaio, F., Song, Y., Richardson, D. C., Richardson, J. S., & Baker, D. (2011). Alternate States of Proteins Revealed by Detailed Energy Landscape Mapping. *Journal of Molecular Biology*, 405(2), 607–618. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.11.008>
65. Uribe, K. B., Guisasaola, E., Aires, A., López-Martínez, E., Guedes, G., Sasselli, I. R., & Cortajarena, A. L. (2021). Engineered Repeat Protein Hybrids: The New Horizon for Biologic Medicines and Diagnostic Tools. *Accounts of Chemical Research*, 54(22), 4166–4177. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00440>
66. Wahsner, J., Gale, E. M., Rodríguez-Rodríguez, A., & Caravan, P. (2019). Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers. *Chemical Reviews*, 119(2), 957–1057. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00363>
67. Watkins, D. W., Jenkins, J. M. X., Grayson, K. J., Wood, N., Steventon, J. W., Le Vay, K. K., Goodwin, M. I., Mullen, A. S., Bailey, H. J., Crump, M. P., MacMillan, F., Mulholland, A. J., Cameron, G., Sessions, R. B., Mann, S., & Anderson, J. L. R. (2017). Construction and in vivo assembly of a catalytically proficient and hyperthermostable de novo enzyme. *Nature Communications*, 8(1), 358. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00541-4>
68. Wei, H., & Wang, E. (2013). Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. *Chemical Society Reviews*, 42(14), 6060. <https://doi.org/10.1039/c3cs35486e>
69. Whitesides, G. M., Mathias, J. P., & Seto, C. T. (1991). Molecular Self-Assembly and Nanochemistry: a Chemical Strategy for the Synthesis of Nanostructures. *Science*, 254(5036), 1312–1319. <https://doi.org/10.1126/science.1962191>
70. Wu, S., Snajdrova, R., Moore, J. C., Baldenius, K., & Bornscheuer, U. T. (2021). Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. *Angewandte Chemie - International Edition*, 60(1), 88–119. <https://doi.org/10.1002/anie.202006648>
71. Xie, J., Lee, J. Y., Wang, D. I. C., & Ting, Y. P. (2007). Silver Nanoplates: From Biological to Biomimetic Synthesis. *ACS Nano*, 1(5), 429–439. <https://doi.org/10.1021/nn7000883> CCC:
72. Xie, J., Zheng, Y., & Ying, J. Y. (2009). Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters. *Journal of the American Chemical Society*, 131(3), 888–889. https://doi.org/10.1021/JA806804U/SUPPL_FILE/JA806804U_SI_001.PDF
73. Yáñez-Sedeño, P., Villalonga, R., & Pingarrón, J. M. (2019). Electroanalytical Methods Based on Hybrid Nanomaterials. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (pp. 1–22). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9394.pub2>



74. Yushkova, E. D., Nazarova, E. A., Matyuhina, A. V., Noskova, A. O., Shavronskaya, D. O., Vinogradov, V. V., Skvortsova, N. N., & Krivoshapkina, E. F. (2019). Application of Immobilized Enzymes in Food Industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(42), 11553–11567. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04385>
75. Zhang, S., Alberstein, R. G., De Yoreo, J. J., & Tezcan, F. A. (2020). Assembly of a patchy protein into variable 2D lattices via tunable multiscale interactions. *Nature Communications*, 11(1), 3770. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17562-1>

Si desea citar nuestro artículo:

Perez-Chirinos L, Guedes G, Saa L, L. Cortajarena A. Ingeniería de Proteínas: Innovaciones para Biomedicina, Biotecnología y Bioelectrónica. RACSG.2025;113(01):78-95. [rac.2025.113.1.org06](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1131-1_06)