



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Evaluación de la interacción de la proteína LIN28B con los  
miRNAs de la familia de let-7”**

**TESIS**

**Que presenta**

**IBQ. PABLO ALBERTO FRANCO URQUIJO**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

en la especialidad de

**GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Directores de Tesis**

Dr. Luis Marat Alvarez Salas

Dra. Aida Margarita Zamora Contreras

Ciudad de México

AGOSTO, 2018

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Luis Marat Alvarez Salas en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Durante su realización, el autor contó con una beca personal otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de CVU 777606.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	7
ABSTRACT .....	8
1.INTRODUCCIÓN .....	9
1.1 Características de los microRNAs (miRNAs) .....	9
1.2 Biogénesis de miRNAs.....	10
1.3 miRNAs de la familia let-7 .....	13
1.4 Biogénesis de la familia let-7.....	13
1.5 Regulación de let-7 por LIN28 .....	15
3. JUSTIFICACIÓN .....	21
4. HIPÓTESIS .....	22
5. OBJETIVOS .....	23
5.1 Objetivo General .....	23
5.2 Objetivos Específicos .....	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
6.1 Producción de la proteína recombinante LIN28B humana.....	24
6.1.1 Clonación de <i>gstlin28b</i> .....	24
6.1.2 Inducción de <i>LIN28B</i> .....	25
6.1.3 Purificación de la proteína <i>LIN28B</i> recombinante .....	25
6.1.4 Electroinmunotransferencia.....	26
6.1.5 Secuenciación .....	26
6.2 Producción <i>in vitro</i> de diferentes variantes de let-7 .....	28
6.2.1 Generación de molde de doble cadena .....	28
6.2.2 Transcripción <i>in vitro</i> .....	29
6.2.3 Purificación de la transcripción <i>in vitro</i> .....	30
6.3 Evaluación de la interacción entre LIN28B y pre-miRNAs de la familia let-7 por medio de ensayos de retardamiento electroforético (EMSA) .....	30
6.3.1 Ensayos EMSA .....	30
7. RESULTADOS .....	32
7.1 Producción de la proteína recombinante LIN28B humana.....	32
7.1.1 Clonación de <i>gstlin28b</i> en <i>pGEX4T1</i> .....	32

7.1.2 Análisis de restricción de la secuencia de la proteína <i>gstlin28b</i> .....	33
7.1.3 Secuenciación de la clonación .....	34
7.1.4 Inducción de <i>GSTLIN28B</i> .....	35
7.2 Producción <i>in-vitro</i> de diferentes variantes de let-7 .....	38
7.2.1 Producción de moldes de doble cadena .....	38
7.2.2 Purificación de la transcripción <i>in vitro</i> .....	38
7.3 Evaluación de la interacción entre LIN28B y pre-miRNAs de la familia let-7 por medio de ensayos de retardamiento electroforético .....	40
7.3.1 Ensayos de EMSA.....	40
8. DISCUSIÓN .....	49
9. CONCLUSIONES .....	54
10. PERSPECTIVAS.....	55
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biogénesis de miRNAs	12
Figura 2 Biogénesis de let-7 dependiente de TUTasas	14
Figura 3. Representación esquemática de Lin28A y Lin28B humana	16
Figura 4. Regulación de la biogénesis de let-7 por LIN28A y LIN28B	17
Figura 5. Regiones críticas para la unión de LIN28 a let-7	18
Figura 6. Modelo de unión de LIN28 a pre-let-7	19
Figura 7 Clonación y digestión de lin28b.	32
Figura 8. Colonias candidatas	33
Figura 9. Análisis de restricción	34
Figura 10. Secuenciación realizada con el cebador pGEX5` de la secuencia clonada.	34
Figura 11. Secuenciación realizada con el cebador pGEX3` de la secuencia clonada.	35
Figura 12. Inducción de GSTLIN28.	35
Figura 13. Electroinmunotransferencia contra LIN28B.	36
Figura 14. Purificación de inducción con perlas de glutatión agarosa.	37
Figura 15. PCR de precursores de let-7	38
Figura 16. Transcripción in vitro fría de los precursores de let-7	39
Figura 17. Transcripción in vitro marcada de los precursores	40
Figura 18. Curva de concentración de RNA	41
Figura 19. Curva de concentración de LIN28 para pre-let7c	42
Figura 20. Curva de concentración de LIN28 para pre-let7g	43
Figura 21. Curva de concentración de LIN28 para pre-let7f-1	43
Figura 22. Curva de concentración de LIN28B para pre-miR-98	44
Figura 23. Ensayo de especificidad	45
Figura 24. Ensayo de interacción entre pre-let-7c y LIN28B para la determinación de la $K_D$ .	46
Figura 25. Ensayo de interacción entre pre-let-7g y LIN28B para la determinación de la $K_D$	46
Figura 26. Ensayo de interacción entre pre-let-7f-1 y LIN28B para la determinación de la $K_D$	47
Figura 27. Ensayo de interacción entre pre-miR-98 y LIN28B para la determinación de la $K_D$	47
Figura 28. Comparación entre las constantes de disociación	48

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencia de los primers empleados para secuenciar	27
Cuadro 2. Oligonucleótidos molde de los precursores de let-7	29
Cuadro 3. Cebadores empleados para producir a los precursores de let-7	29

## RESUMEN

Los miRNAs de la familia de let-7 regulan distintos procesos celulares como pluripotencia, diferenciación, proliferación, control del ciclo celular, inflamación y metabolismo. Su expresión se encuentra alterada en distintos tipos de cáncer y son regulados de manera negativa por la familia altamente conservada de LIN28 que a través de sus dominios de unión a RNA “cold-shock” (CSD) y dedos de zinc (CCHCX2), impiden el procesamiento por las ribonucleasas tipo III *Drosha* o *Dicer*. A pesar de que algunos de estos mecanismos de regulación se encuentran bien caracterizados (LIN28A), la interacción con LIN28B no ha sido ampliamente estudiada.

En nuestro grupo de trabajo se observó que en líneas celulares de cáncer cervical algunos precursores de let-7 parecen escapar de la regulación mediada por LIN28B. Para determinar si el mecanismo de escape depende en una diferencia en la afinidad de interacción entre los diversos let-7 y LIN28B, se expresó la proteína LIN28B recombinante con un *tag* de GST en *Escherichia coli* Rosetta. La proteína se cortó con trombina y fue purificada con perlas de glutatión agarosa. La confirmación de la clonación y correcta expresión de LIN28B se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida y ensayos de inmunotransferencia (*Western blot*). La producción de los precursores de let-7 se realizó a partir de un molde sintético con el promotor de la RNA polimerasa T7, después se llevó a cabo una PCR para generar un molde de doble cadena que sirvió para la síntesis de RNA *in vitro*.

Para medir las diferencias de unión de afinidad, se llevaron a cabo ensayos de retardamiento electroforético y se determinaron las constantes de disociación aplicando una regresión no lineal. No se encontró diferencia significativa entre las constantes de disociación de pre-let-7c, pre-let7f-1 y pre-miR-98 por lo que se sugiere que no existe correlación entre el largo del precursor y la afinidad de unión. Por tales razones es necesario estudiar otros factores que pudieran explicar el patrón de expresión diferencial previamente reportado en líneas celulares de cáncer cervical.

## ABSTRACT

Let-7 miRNAs regulate several cellular processes such as pluripotency, differentiation, proliferation, cell cycle control, inflammation and metabolism. Thus, let-7 miRNAs are generally considered as tumor suppressors. They have been reported deregulated in many types of cancers and are negatively regulated by the highly conserved LIN28 family through their RNA binding domains: the cold-shock domain (CSD) and two CCHC-type zinc finger domains impeding further processing by *Drosha* or *Dicer*. Despite some of these mechanisms are well characterized (LIN28A), the interaction with LIN28B has not been widely studied.

Our research group found that in some cervical cancer cell lines many let-7 miRNAs precursors with particularly long structures near its binding domains appear to escape LIN28B-mediated regulation. To determine if there is a different binding affinity depending on the length of these regions, we first cloned the sequence of Lin28B from a commercial plasmid into a PGEX4T-1 plasmid using restriction enzymes, and then we expressed the protein with a GST tag in *Escherichia coli* Rosetta. The protein was cleaved with thrombin and purified with glutathione agarose beads. To confirm cloning and protein expression we performed a series of restriction analysis, Sanger sequencing, Western blot and coomassie staining. For the production of let-7s miRNAs precursors, we started from a synthesized template with a T7 RNA polymerase promoter, then we performed PCR to generate double stranded template for *in vitro* synthesis of RNA using  $\alpha$ -[32P]-UTP.

In order to measure the differences in binding affinity, electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were performed and dissociation constants were determined by applying a nonlinear regression. No significant difference was found between pre-let-7c, pre-let7f-1 and pre-mir98 dissociation constants implying there is no correlation between precursor length and binding affinity implying that other several factors are necessary to study in order to explain the differential expression previously reported.



# 1.INTRODUCCIÓN

## 1.1 Características de los microRNAs (miRNAs)

Los miRNAs son una clase de RNA no codificante pequeño de doble cadena con aproximadamente 22 nucleótidos de longitud<sup>1</sup>, que juegan un papel central en la diferenciación, proliferación y supervivencia celular por medio de la unión complementaria a transcritos blanco, que resulta en su inhibición traduccional o degradación<sup>2</sup>.

El primer miRNA fue identificado en 1993 como un RNA pequeño transcrito del locus *lin-4* de *Caenorhabditis elegans* y 7 años después fue descubierto el primer miRNA de mamífero, *let-7*. La pérdida de *lin-4* o *let-7* en *C. elegans* resulta en severos defectos en el desarrollo, incluido un destino celular aberrante, indicando que estos genes son factores clave en el desarrollo.<sup>2</sup> La validación funcional de los miRNAs ha permitido un mejor entendimiento de la biología celular y del desarrollo, así como de varias enfermedades, hallándose desregulados en padecimientos degenerativos como el cáncer y enfermedades cardiovasculares<sup>3,4,5</sup>.

Los miRNAs comprenden alrededor del 1-2% de todos los genes expresados en gusanos, insectos y mamíferos<sup>1</sup>. Se encuentran localizados entre intrones y exones de genes que codifican proteínas o regiones intergénicas<sup>6</sup>. La mayoría de los genes de miRNAs proviene de regiones del genoma distantes de genes previamente anotados implicando que derivan de unidades transcripcionales independientes. Sin embargo, algunos miRNAs se originan de intrones de transcritos primarios en la misma orientación que los mRNAs sugiriendo que no se transcriben de sus propios promotores sino son procesados por la maquinaria de *splicing*. Este arreglo provee un mecanismo conveniente para la regulación coordinada de la expresión de proteínas y miRNAs. Otros genes de miRNAs se encuentran agrupados en el genoma en un patrón de arreglo y expresión que implican la producción de un

transcrito primario multi-cistrónico. Estos miRNAs se encuentran en *clusters* genómicos que ocasionalmente contienen genes relacionados entre sí <sup>7</sup>.

En animales, la mayoría de miRNAs forman dúplex parciales con sus blancos y son regulados mediante interacciones con el 3' UTR. La secuencia de interacción más común de apareamiento con el blanco se encuentra entre los nucleótidos 2 y 7 en la región 5' del miRNA que es llamado región semilla. Un apareamiento imperfecto del extremo 5' del miRNA muchas veces es compensado por una extensiva interacción en el extremo 3'. Adicionalmente, sitios en la región media del miRNA realizan apareamiento de bases con la secuencia blanco<sup>8</sup>. Se ha demostrado que, dado el apareamiento imperfecto, un mismo miRNA es capaz de controlar la expresión de más de un transcrito blanco y que cada mRNA podría ser regulado por múltiples miRNAs,

siendo la región 5' del miRNA la que usualmente contribuye a la especificidad y unión al blanco de acuerdo a la evidencia experimental<sup>1</sup>.

## 1.2 Biogénesis de miRNAs

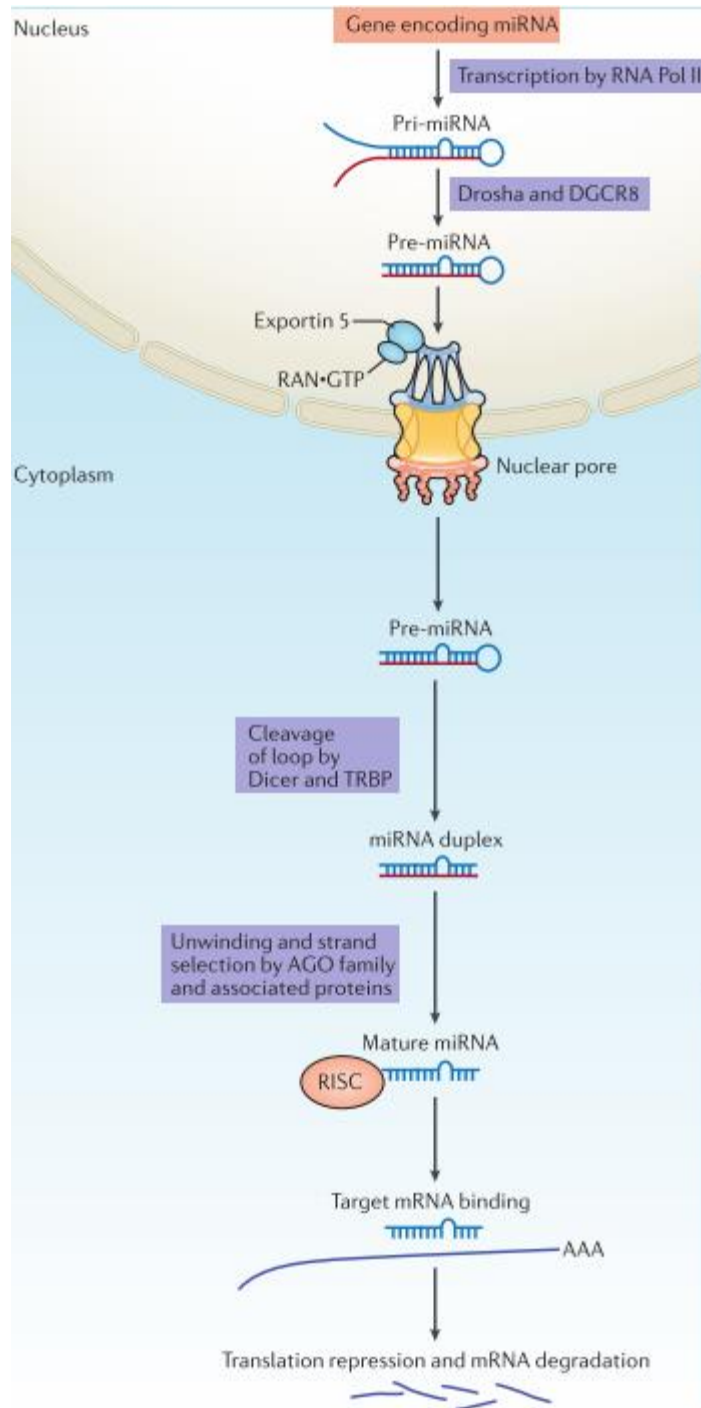
La biogénesis canónica de miRNAs (Figura 1) comienza por lo general con la transcripción por la RNA polimerasa II. Este transcrito denominado miRNA primario o pri-miRNA es típicamente mayor a 1kb y consiste en un tallo o “*stem*” de 33-35 pares de bases, un lazo o “*loop*” terminal y segmentos de RNA en el extremo 5' y 3'<sup>10</sup>.

El proceso de maduración comienza con *Drosha* una RNAsa tipo III que junto con el cofactor proteico DGCR8 (DiGeorge síndrome critical region 8) forman un complejo llamado *Microprocesador* que se une al pri-miRNA. Los dos dominios de ribonucleasa III (RNAasa III) presentes en *Drosha* llevan a cabo el corte de las hebras 3' y 5' de los pri-miRNAs para generar un miRNA precursor (pre-miRNA), esto se lleva a cabo por el corte del *stem-loop* que permite liberar un pequeño RNA

con forma de horquilla o “*hairpin*” de aproximadamente 65 nucleótidos de longitud<sup>10,2</sup>.

Posteriormente, el complejo exportina 5-RAN-GTP media el movimiento del pre-miRNA del núcleo al citoplasma. Una vez en el citoplasma, la RNasa III *Dicer* y TRBP (TAR RNA binding protein) se unen al pre-miRNA y cortan el *loop* terminal resultando en un dúplex del miRNA. *Dicer* se une al pre-miRNA con una preferencia por 2 nucleótidos sobresalientes u “*overhang*” en el extremo 3´ que inicialmente son generados por *Drosha*<sup>10</sup>.

El pequeño dúplex de RNA generado por *Dicer* es cargado subsecuentemente a la proteína Argonata (AGO) para formar el complejo efector llamado RISC (*RNA induced silencing complex*). RISC se ensambla en dos pasos: la carga del dúplex de RNA y el subsecuente desdoblamiento. Estudios sugieren que *Dicer* y TRBP (o PACT) podrían tener un papel en este ensamblaje de RISC. Una cadena (cadena guía) se une a AGO (posiblemente reclutada por TRBP) para formar un complejo RISC activado, que será la que tiene como blanco la regulación de mRNA, mientras que la otra cadena se degrada (cadena pasajera). Esta selección de la cadena es promovida por la falta apareamientos de la cadena guía en posiciones 2-8 y 12-15 que favorecen el desdoblamiento de los dúplex de miRNAs de manera independiente de ATP. Por último, el miRNA maduro es capaz del reconocimiento del blanco. La unión del miRNA maduro a RISC conlleva a elegir como blanco mRNAs con sitios complementarios, que resulta en la represión traduccional o degradación de mRNA<sup>10,2</sup>.



**Figura 1. Biogénesis de miRNAs<sup>1</sup>.** La biogénesis de los miRNAs comienza cuando la RNA polimerasa transcribe un RNA de aproximadamente 1 kb de longitud denominado pri-miRNA que será procesado por *Drosha* y su cofactor DGCR8 dando lugar al pre-miRNA. Este transcrito posteriormente es transportado desde el núcleo hasta el citoplasma por el complejo EXP5-RAN-GTP y procesado por *Dicer* y TRBP para generar un RNA de doble cadena (miRNA maduro) que será cargado al complejo efector denominado RISC que permitirá llevar a cabo diversas funciones como represión traduccional.

### 1.3 miRNAs de la familia let-7

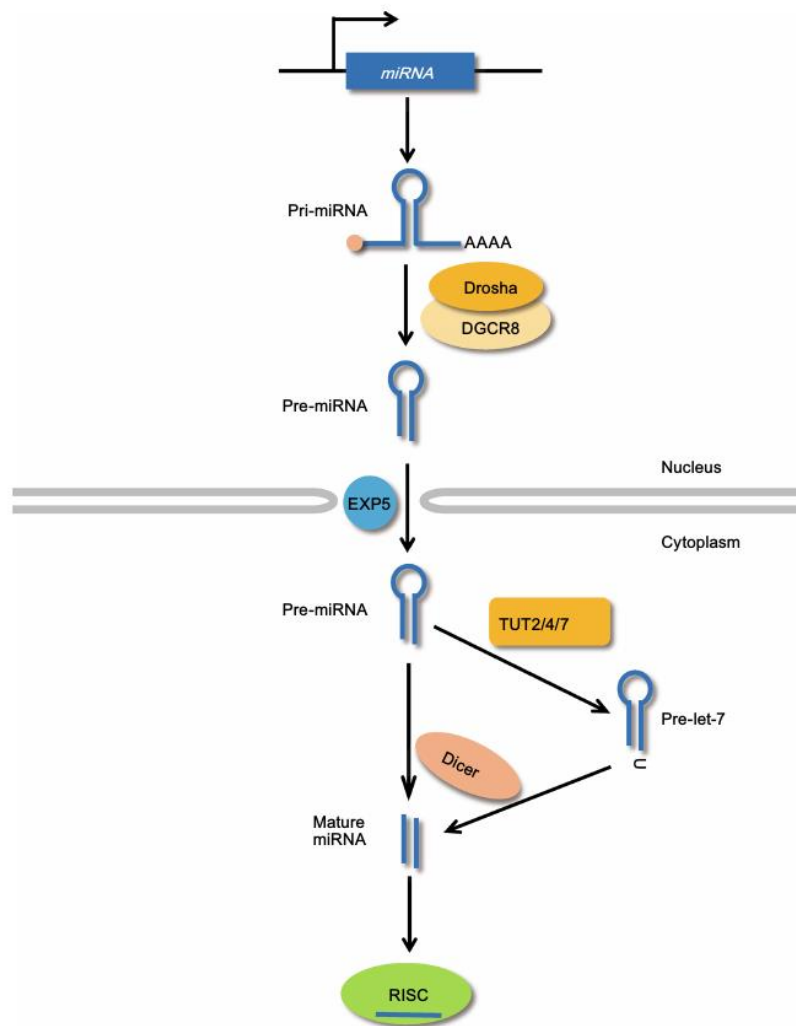
El miRNA let-7 (lethal-7) fue uno de los primeros miRNAs descubiertos. Se identificó como un regulador del tiempo del desarrollo de *C. elegans* y descrito como un gen heterocrónico (aquellos que gobiernan la progresión de los estadios de un organismo). En organismos superiores existen múltiples isoformas de los miRNAs de let-7 que comparten la misma región semilla. En humanos, la familia de let-7 se compone de 12 miRNAs maduros que se encuentran en 8 cromosomas y 4 *clusters* distintos<sup>11</sup>. Los diferentes miembros de la familia let-7 son let-7a-1, 7a-2, 7a-3, 7b, 7c, 7c-2, 7e, 7f-1, 7f-2, 7g, 7i, y miR-98<sup>12</sup>.

Las funciones biológicas de let-7 en animales incluyen la regulación de la diferenciación de células troncales en *C. elegans*, desarrollo neuromuscular en *Drosophila*, desarrollo de extremidades en ratones y pollos, así como proliferación y diferenciación celular<sup>13</sup>. También se ha reportado que funciona como supresor de tumores, teniendo como blanco varios oncogenes como MYC, RAS, y HMGA2<sup>14</sup>. Siendo destacable que, para algunas formas de cáncer, la mayoría o todos los miembros de la familia let-7 se encuentran desregulados<sup>15,16</sup>. Así mismo se ha observado sobre-expresión de let-7 durante el desarrollo del cerebro en mamíferos, permaneciendo alta en tejidos adultos<sup>11</sup>.

### 1.4 Biogénesis de la familia let-7

La maduración de let-7 generalmente sigue la vía canónica de biogénesis de miRNAs; sin embargo, algunos miembros requieren un paso regulatorio adicional (Figura 2). Normalmente *Drosha* inicia la maduración por el corte del pri-miRNA y libera un pre-miRNA con 2 nucleótidos sobresalientes en el 3' que *Dicer* reconoce para procesar selectivamente a los pre-miRNAs<sup>17</sup>. En los pre-let-7a-2, -7c y -7e se presentan los 2 nucleótidos sobresalientes típicos en el extremo 3' (grupo I) lo que supone una regulación canónica. No obstante, el resto de los pre-let-7 (grupo II) presentan una adenosina o uridina sobresaliente cerca del sitio de procesamiento

por *Drosha*, lo que impide el reconocimiento de la base terminal y resulta en la generación de un solo nucleótido 3' *overhang*. Por esta razón, los let-7 grupo II requieren una mono-uridilación en el extremo 3' para el procesamiento de *Dicer*. Las uridil transferasas (TUTasas) actúan específicamente sobre dsRNAs con un 3' sobresaliente de un nucleótido para crear el 3' sobresaliente de dos nucleótidos requerido. Por esta razón la biogénesis de los let-7 grupo II requiere un paso adicional que asegure la actividad de *Dicer*. Las enzimas TUT2/PAPD4/GLD2, TUT4/ZCCHC11 y TUT7/ZCCH6 mono-uridilan el 3' de los pre-let-7 grupo II, dejando los dos nucleótidos sobresalientes en 3' requeridos por *Dicer*<sup>11,17</sup>.



**Figura 2 Biogénesis de let-7 dependiente de TUTasas<sup>11</sup>** Diagrama esquemático de la biogénesis de let-7. Un pri-miRNA es producido por la RNA polimerasa II es procesado por Microprocesador en el núcleo. El pre-miRNA generado es transportado al citoplasma por el

complejo EXP5-Ran-GTP y procesado por *Dicer* para generar un miRNA maduro. Precursores de let-7 del grupo dos son monouridilados en el extremo 3' por TUTasas reclutadas por LIN28A antes del procesamiento por Dicer. Posteriormente el miRNA maduro se carga al complejo efector RISC para inhibir la traducción del transcrito blanco.

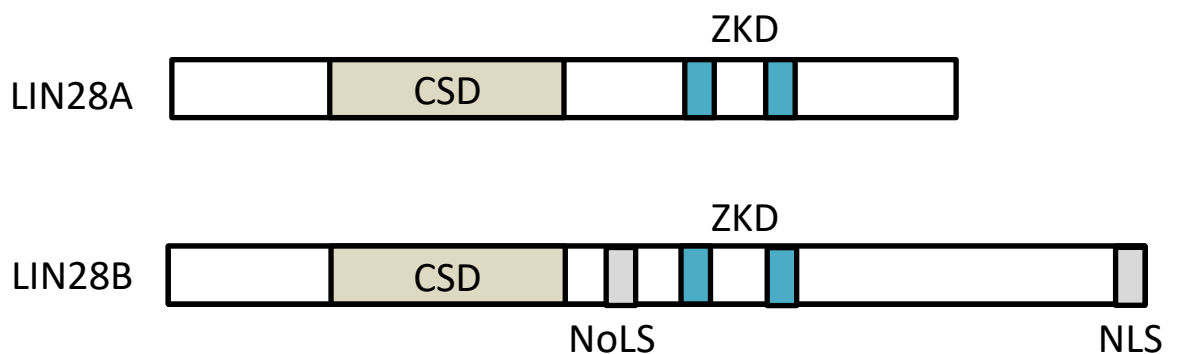
### **1.5 Regulación de let-7 por LIN28**

LIN28 es una proteína reguladora de unión a RNA conservada en eucariotas superiores reprime selectivamente la expresión de los miRNAs let-7. Esta regulación postranscripcional de let-7 por LIN28 es requerida para el desarrollo normal y contribuye al estado pluripotente de la célula, previniendo que let-7 medie la diferenciación de células troncales embrionarias por lo que la expresión de la familia let-7 se ve estrictamente regulada<sup>18,19,20</sup>. Los mamíferos codifican para dos parálogos de LIN28: LIN28A y LIN28B<sup>17</sup>. Ambas proteínas se sobreexpresan durante la embriogénesis, pero permanecen silenciadas en la mayoría de tejidos adultos. LIN28A se expresa durante el desarrollo temprano mostrando una acumulación en los cuerpos precursores nucleolares durante la segunda etapa celular de la embriogénesis. Una vez que el desarrollo es completo, LIN28A sigue siendo expresado en las células epiteliales del asa de Henle, el colector del riñón, en musculo cardiaco y esquelético<sup>21</sup>.

Se ha reportado que LIN28 promueve la proliferación de células troncales embrionarias en parte debido a la unión y al incremento de la traducción de mRNAs relacionados con el ciclo celular. Debido a esto, la expresión aberrante de LIN28 puede tener un impacto en el cambio de mantenimiento de un estado pluripotente a un estado canceroso y que posiblemente explica la asociación de LIN28A/B con distintos tipos de cáncer como neuroblastoma, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de esófago, entre otros<sup>22</sup>.

LIN28A y LIN28B actúan como reguladores negativos de la biogénesis de los miRNAs let-7 y reguladores postranscripcionales de la traducción de mRNA. En su estructura terciaria se presentan dos dominios de unión a RNA (RBDs): un dominio

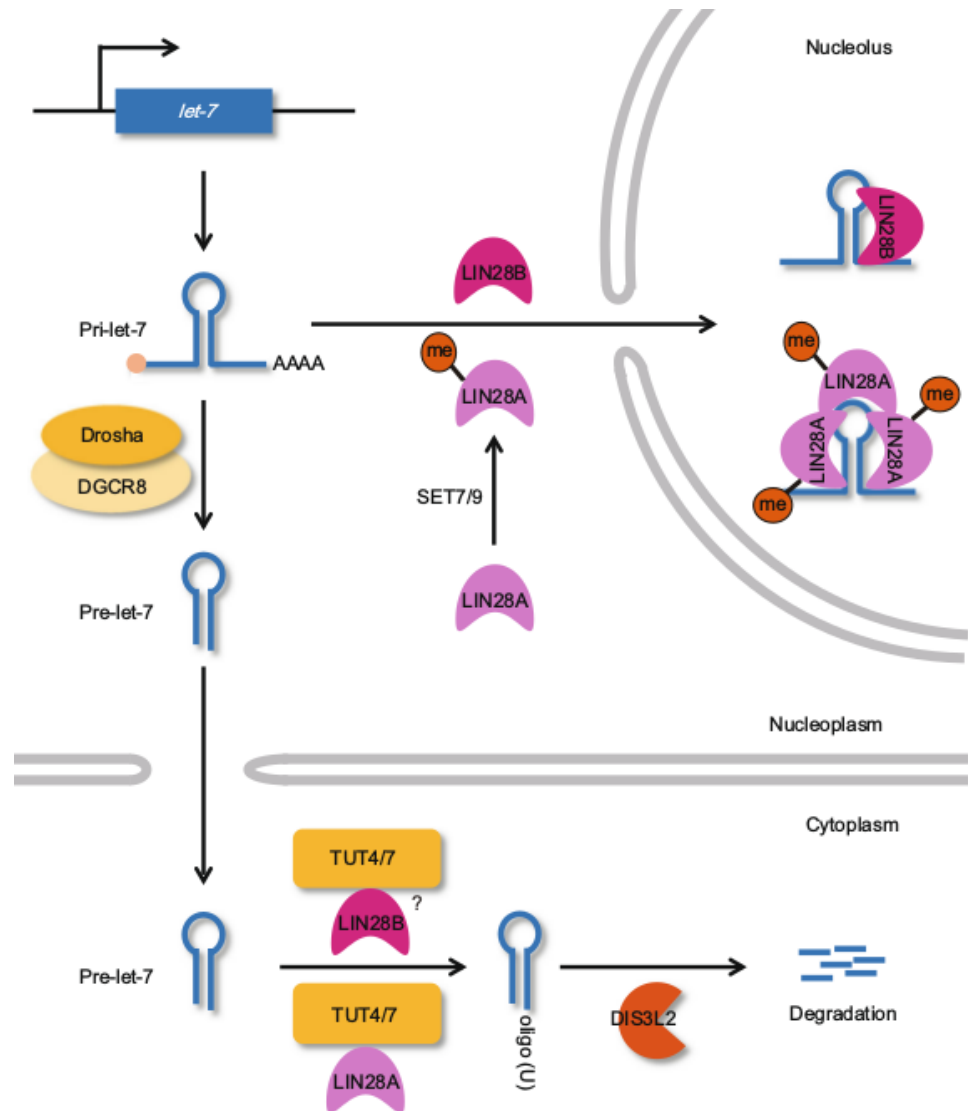
cold-shock (CSD) N-terminal y un dominio de dedos de zinc (ZKD) C-terminal compuesto de dos dedos de zinc tipo retrovirales (CCHC) ordenados en tándem (Figura 3). Estas proteínas parálogas poseen una identidad de secuencia del 65% y regiones de baja complejidad en el extremo N-terminal. Comparten una secuencia bipartita de localización nucleolar (NoLS) y una señal de localización nuclear en el extremo C-terminal para el caso de LIN28B. Ambas proteínas se pueden localizar en el citosol y núcleo e interactuar con los pri o pre-miRNAs de let-7 impidiendo su maduración<sup>23</sup>.



**Figura 3. Representación esquemática de LIN28A y LIN28B humana<sup>23</sup>.** LIN28A y LIN28B comparten un 65% de identidad, poseen dominios CSD y ZKD, mientras que LIN28B posee NoLS y NLS

La regulación de la biogénesis de let-7 por LIN28A y LIN28B puede ser dependiente e independiente de TUTasas (Figura 4). Se ha reportado que LIN28A bloquea el procesamiento del precursor let-7, ya que LIN28A ayuda a las TUTasas a oligouridilar pre-let7. La cola de uridinas (aproximadamente de 14 nucleótidos) resiste el corte de *Dicer* y se hace susceptible a degradación por la nucleasa DIS3L2. Un LIN28A metilado por SET7/9 también es capaz de prevenir la biogénesis de una manera independiente de TUTasas, uniéndose a pri-let-7 en el núcleo y secuestrándolo al nucléolo para prevenir el procesamiento por *Drosha*. Se ha reportado que LIN28B es capaz de inhibir la biogénesis de let-7 uniéndose a pri-let7 en el núcleo y secuestrándolo al nucléolo. También se sospecha que participa en la vía dependiente de TUTasas, ya que muestra interacción con la exonucleasa DIS3L2 citoplasmática, sin embargo, su relación necesita ser mejor entendida<sup>11,17</sup>.

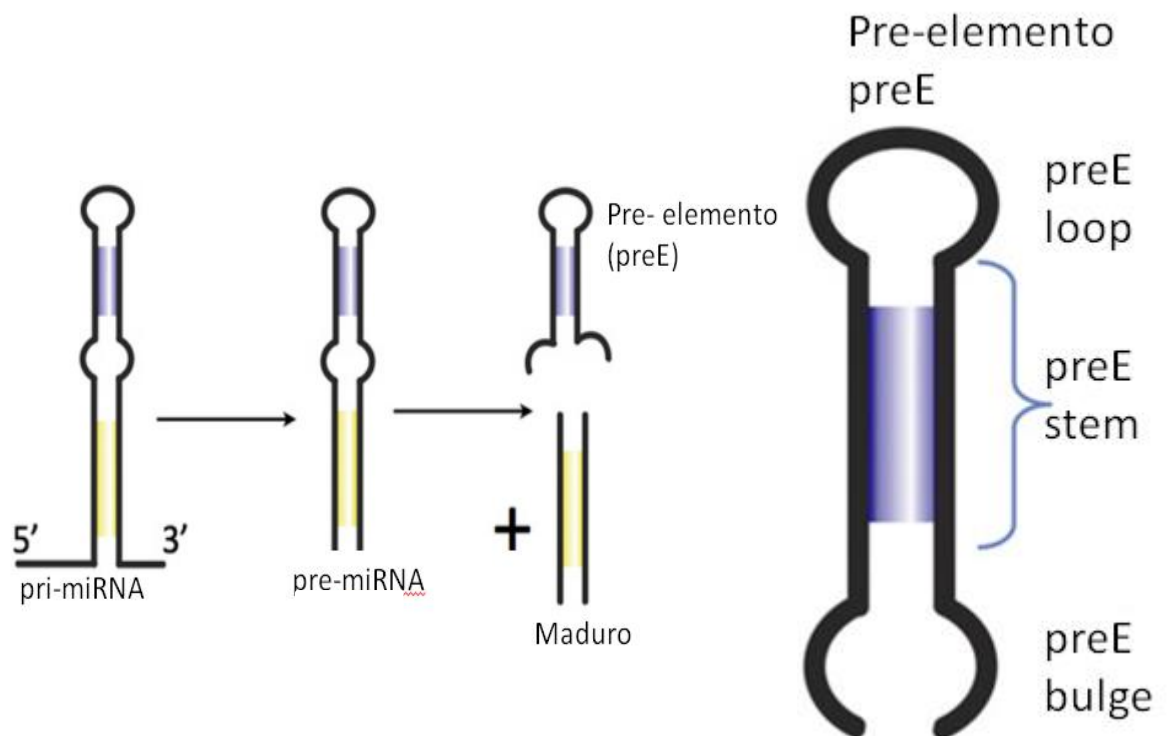




**Figura 4. Regulación de la biogénesis de let-7 por LIN28A y LIN28B<sup>11</sup>.** La biogénesis puede ser inhibida de manera dependiente e independiente de TUTasas. LIN28A ayuda a las TUTasas a oligouridilar a los pre-let-7 o metilarse y secuestrar al pri-let-7 al núcleo. LIN28B bloquea la biogénesis por medio del secuestro al nucléolo del pri-let-7 y probablemente por una vía dependientemente de TUTasas.

## 2. ANTECEDENTES

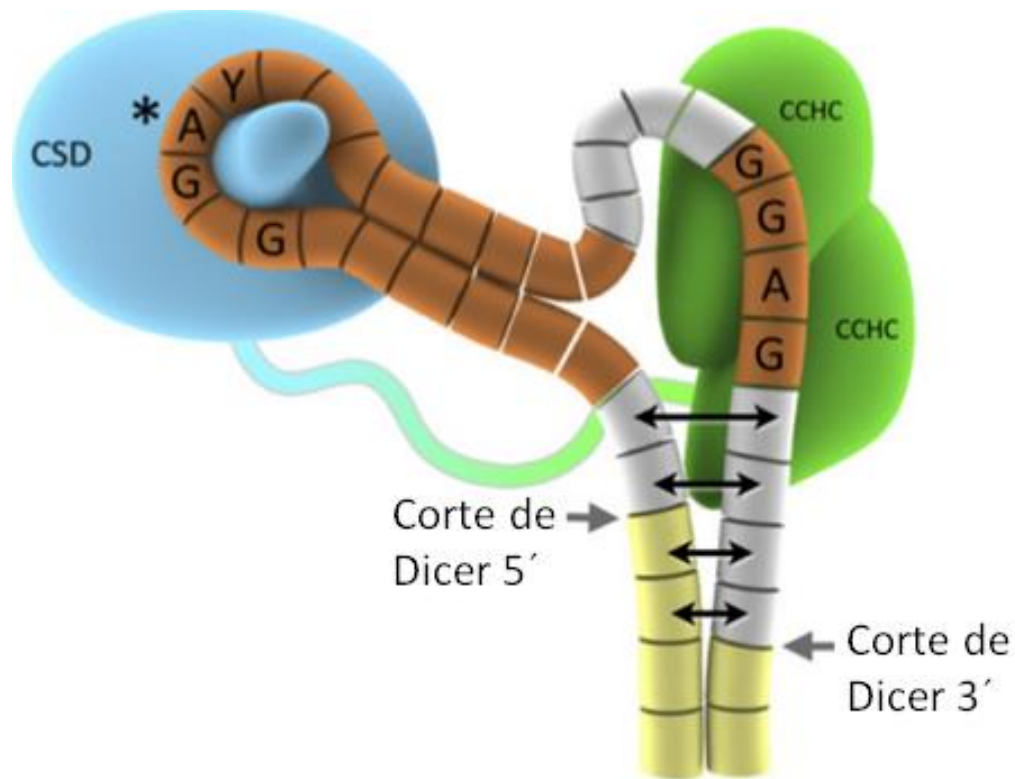
El reconocimiento de LIN28 con miRNAs let-7 durante la regulación de la biogénesis requiere de dos regiones críticas para su unión que pueden observarse en la figura 5. La primera región incluye el *preE stem* y el *preE loop*: La otra región es el motivo GGAG que se encuentra al extremo 3' del final de *preE bulge* y se encuentra bien conservado a través de la familia let-7<sup>24</sup>.



**Figura 5. Regiones críticas para la unión de LIN28 a let-7<sup>24</sup>.** La región estructural que permite la regulación de let-7 denominada Pre-elemento consta de un *preE loop*, *preE stem* y *preE bulge* presentes en el pri y pre-miRNA<sup>24</sup>.

El evento de unión a LIN28 puede inhibir el procesamiento del pre-let-7 en al menos dos formas. 1) LIN28 puede actuar como “cuña” doblando la región de doble cadena madura del miRNA situando el motivo GGAG en una conformación particular en una de las hebras, de esta manera *Dicer* no puede ser capaz de reconocer el sustrato apropiadamente. 2) Debido a la ubicación del sitio de unión CCHCx2, el volumen de CCHCx2 y la ubicación del extremo N terminal a través de la secuencia interdominios tiene que cruzar hacia el dominio CSD, es muy probable que LIN28

choque con los dominios de unión RNA de doble cadena y enmascare uno de los sitios de corte<sup>24</sup>.



**Figura 6. Modelo de unión de LIN28 a pre-let-7.** Para LIN28: CDS (azul), CCHCx2 (verde) *linker* (azul-verde). Para pre-let-7 la región madura (amarillo); bases nucleotídicas incluidas en la cristalización (naranja), gris partes del Pre-elemento no incluidas en el cristal. Sitios ocultos donde corta *Dicer* (flechas grises) y posible desdoblamiento de dsRNA (flechas negras).

Calcagno y colaboradores encontraron que a pesar de que LIN28A y LIN28B exhiben un grado de represión similar en diferentes *let-7*, un miembro específico de la familia, *let-7a-3* humano y su ortólogo murino *let-7c-2*, evitan la regulación mediada por LIN28A en células cancerosas humanas y ESCs de ratón. A través de ensayos EMSA, se estimó la afinidad relativa a diferentes miembros de pre-*let-7* y se concluyó que *let-7a-3* y *let-7c-2* escapan de la regulación, encontrando que una secuencia de 5 nucleótidos de longitud en el extremo corto apical del *stem loop* de *let-7c* que no permite la unión *in vitro* de LIN28A y que al reemplazar esta secuencia con los nucleótidos correspondientes del *preE loop* del pre-*let-7a-1* se restaura la interacción con LIN28A<sup>25</sup>.

En otro artículo Zamora-Contreras y Alvarez-Salas, encontraron que existe una diferencia en los niveles de los pre-miRNAs de let-7 en células tumorales de cáncer cervical donde no se expresa LIN28A. Se observaron altos niveles los pre-miR-98 y pre-let-7f-1 mostrando una correlación positiva con LIN28B, sugiriendo que no están siendo regulados por LIN28B o se están regulando por alguna otra vía. Por otra parte, los niveles de los pre-miRNAs como let-7a-2 y let-7a-3 poseen una correlación negativa con LIN28B sugiriendo que se están llevando a degradación o no se expresan en estas líneas celulares. Debido a que estos pre-miRNAs presentan una estructura con distintas longitudes, se realizó un análisis bioinformático y se encontraron dos grupos de pre-miRNAs, un grupo que contiene un *pre-stem* largo y que mostró altos niveles de expresión de precursores y un grupo corto que incluye los precursores expresados con bajos y medianos niveles. De esta manera se sugiere que la longitud del *preE stem* puede ser un elemento regulatorio adicional en la unión y regulación de estos miRNAs.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La interacción entre los LIN28 y la familia let-7 no ha sido completamente entendida; aún no se comprende si existe una relevancia biológica entre la presencia de distintos pre-let-7 con la misma región semilla y su diferente patrón de expresión. Se ha reportado que uno de ellos (hsa-let-7a-3) escapa a la regulación de LIN28A generando un indicio de una diferencia de regulación que pudiera ser importante para la regulación de distintos oncogenes blanco. Así mismo, el patrón característico de distintos niveles en los precursores previamente observados en nuestro grupo de trabajo deja abierta la pregunta de porque ciertos precursores se expresan al mismo tiempo que LIN28B y qué consecuencias tiene.

Debido a que la familia let-7 es considerada como supresores de tumor con una región semilla idéntica y LIN28B es una proteína relacionada con la pluripotencia y proliferación y es sobreexpresada en distintos tipos de cáncer, se ha asumido que la interacción entre los precursores de la familia de let-7 es la misma para la LIN28A y LIN28B. No obstante, es necesario explorar la posibilidad de que el largo del *preE stem* o tallo sea un elemento regulatorio clave que podría explicar la diferencia de los distintos niveles de los precursores ya que la inhibición por *Drosha* o *Dicer* podría repercutir en los niveles de los precursores previamente reportados y ayudarnos a entender este mecanismo molecular que se encuentra implicado en distintas funciones biológicas y que en algún futuro podría llegar a ser blanco terapéutico o marcador.

## 4. HIPÓTESIS

La diferencia de longitud del tallo del pre-elemento de los pre-miRNAs de let-7 tiene un efecto en la afinidad y/o interacción con LIN28B. Siendo los tallos más largos los que poseen mayor afinidad.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Evaluar la importancia de la longitud del *preE stem* de pre-let-7 para la interacción con LIN28B.

### 5.2 Objetivos Específicos

- Producción y purificación de la proteína recombinante LIN28B humana
- Producción *in-vitro* de diferentes variantes de let-7
- Evaluación de la interacción entre LIN28B y pre-miRNAs de la familia let-7 por medio de ensayos de retardamiento electroforético (EMSA).

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Producción de la proteína recombinante LIN28B humana

#### 6.1.1 Clonación de *gstlin28b*

La secuencia del gen *lin28B* humano se amplificó a partir un plásmido comercial (OriGene sc-300636) con los siguientes cebadores: FwLin28U (5`-TAT TAC GGA TCC ATG GCC GAA GG-3`) y RvLin28L (5`-GAT GGC GTC GAC TTA TGT CTT TTT CC-3`) empleando la siguiente mezcla de reacción: dNTPs 2mM (R0161, Fermentas), buffer de reacción Q5 (B9027S, NEB) 1X, FwLin28U 0.5µM, RvLin28L 0.5µM, 0.1 unidades/µL de polimerasa de alta fidelidad Q5 (M0491S, NEB), 1.12 mM de molde en un volumen de 25 µL y las siguientes condiciones de ciclaje: desnaturalización inicial de 98 °C durante 1:30 min. 35 ciclos de desnaturalización de 98 °C durante 10 segundos, alineamiento de 64 °C durante 30 segundos y extensión de 72 °C durante 30 segundos más una extensión final de 72 °C durante 2 min. Esta secuencia amplificada se digirió con las enzimas de restricción BamHI y Sall y fue purificada por gel para posteriormente llevar a cabo una reacción de ligación con el vector pGEX4T1 previamente digerido y purificado de la misma manera. La reacción de ligación se llevó a cabo empleando la siguiente mezcla de reacción: Buffer T4 ligasa 1X (Y9001, Invitrogen), 1 U/µL de Ligasa T4 (15224-025, Invitrogen), rATP 1mM (18862508, Promega) y una relación molar 1:5 entre inserto y vector que fue incubada a 14 °C durante 12 horas. Posteriormente, 5µL de esta reacción fue transformada en *Escherichia coli* DH5α F<sup>-</sup> φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>) phoA supE44 λ<sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1 competentes e incubada 30 min en hielo, 2 min a 42 °C y 3 min en hielo. Se añadió 1mL de medio SOC e incubó a 37 °C durante dos horas. Se plaqueó e incubó a 37 °C durante 16 horas, se picaron colonias aisladas y se purifico el plásmido.



### 6.1.2 Inducción de LIN28B

Se transformaron 50  $\mu$ L de *E. coli* Rosetta F-  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-, mK+) phoA supE44  $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1 químicamente competentes con 5 $\mu$ L de la mezcla de ligación para gstlin28b. Se incubaron 30 min en hielo, 2 minutos a 42 °C, 3 min en hielo y se plaquearon en agar LB con ampicilina y cloranfenicol (100mg/ $\mu$ L y 35 mg/ $\mu$ L respectivamente) e incubaron a 37 °C durante 16 horas.

Se picaron colonias aisladas y se dejaron crecer en 3.3mL en medio LB con ampicilina y cloranfenicol (100mg/ $\mu$ L y 35 mg/ $\mu$ L respectivamente) durante 16 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó una dilución 1:10 (30mL) con el medio anterior y se dejaron crecer 3:30 horas a 37 °C a 200 rpm. Posteriormente, se llevó a cabo la inducción con 300 $\mu$ L de IPTG 0.1 M durante 1:20 horas.

### 6.1.3 Purificación de la proteína LIN28B recombinante

Los cultivos previamente inducidos se centrifugaron 8 min a 13,539 g se desechó el sobrenadante y se juntaron las pastillas. Se añadió 1.5mL de buffer de lisis por cada pastilla obtenida y se sonicaron (10 pulsos de 10 segundos y 30 segundos de descanso). Se centrifugaron 3 min a 13,500 rpm y se obtuvo la fase soluble. Por cada 1.4mL fase soluble obtenida se añadieron 80 $\mu$ L de perlas de glutatión agarosa (100004810, Invitrogen) y se incubaron 1:20 horas a 4 °C en agitación constante. Una vez terminado el tiempo de incubación se centrifugó 1 min a 13,500 rpm, se retiró el sobrenadante y agregó PBS 1X filtrado para lavar las perlas. Se repitió este último paso 7 veces y se suspendieron las perlas en 50 $\mu$ L de PBS 1X filtrado. Se añadieron 3 unidades de trombina (1280801, Invitrogen) y se dejaron incubando 12 horas a temperatura ambiente, se centrifugo 1 min a 17,136 g y se tomó el sobrenadante (sobrenadante 1), se repitió este paso 2 veces más para obtener el

sobrenadante 2 y 3. La proteína fue cuantificada utilizando el kit *Pierce® BCA Protein Assay* (23225, Thermo Scientific)

#### *6.1.4 Electroinmunotransferencia*

A las muestras se les añadió buffer Laemmli 2X (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glicerol 25%, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 2% (v/v), azul de bromofenol 0.01% (p/v)) y se llevaron a ebullición durante 5 minutos. Se cargaron en geles de poliacrilamida-bisacrilamida 29:1 y la electroforesis se llevó a cabo utilizando un gel concentrador al 4% (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 0.1% (p/v)) y un gel separador al 10% (Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 0.1% (p/v)) en buffer TGS (Tris 25mM pH 8.3, glicina 192mM, SDS 0.1% (p/v)) durante 1:40 horas a 125 volts. El gel se transfirió a una membrana de PVDF (Millipore Corporation, Bedford MA) empleando buffer Towbin (Tris-base 25mM, glicina 192mM, Metanol 20% (v/v)) y dos ciclos de turbo blot para mini geles en un Transblot® (Trans-Blot®Turbo™ Transfer System Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con leche descremada en polvo al 15% en PBS-Tween (PBS con Tween 0.1% v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo anti-LIN28B (sc-130802, Lot # K2114, Santa Cruz Biotechnology) o anti-GST (sc-138, Lot #1009, Santa Cruz Biotechnology) 1:1000 en PBS-Tween, en agitación suave durante 12 horas. Se lavó la membrana tres veces con 20 mL de PBS-Tween 0.1% (v/v) y se incubó el anticuerpo secundario anti-rabbit (1:1000 en PBS-Tween 0.1% (v/v)) durante 1 hora. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces con 20 mL de PBS-Tween 0.1% (v/v) y se revelaron con ECL en un C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR Biosciences Inc., Lincoln NE) usando el protocolo estándar.

#### *6.1.5 Secuenciación*

La verificación de la secuencia de la clonación *gstlin28B* se llevó a cabo empleando el producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como molde para la secuenciación de Sanger. Se utilizaron los cebadores pGEX5' y pGEX3' y la siguiente mezcla de reacción: dNTPs 2mM (R0161, Fermentas), Buffer de reacción Q5 (B9027S, NEB) 1X, pGEX5' 0.5 $\mu$ M, pGEX3' 0.5 $\mu$ M, 0.1 unidades/ $\mu$ L de

polimerasa de alta fidelidad Q5 (M0491S, NEB) en un volumen de 20 µL y las siguientes condiciones de ciclaje: desnaturalización inicial de 98 °C durante 1:30 min. 35 ciclos de desnaturalización de 98 °C durante 10 segundos, alineamiento de 54 °C durante 30 segundos y extensión de 72 °C durante 30 segundos más una extensión final de 72 °C durante 2 min. El producto de la PCR se precipitó con acetato de amonio llevándolo a una concentración de 2.5M, se centrifugó a 17,136 g durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavó con etanol al 75% (v/v) y centrifugó durante 15 minutos a 17,136 g (dos veces), se dejó secar y suspendió en 20µL en H<sub>2</sub>O libre de nucleasas.

El amplicón generado se empleó para la reacción de secuenciación de la manera siguiente: Big Dye Terminator Sequencing buffer® 1X (4337455, Thermofisher), Big Dye Terminator Ready Reaction Mix® 2µL (4337455, Thermofisher), el amplicón (21.39 mM), pGEX5' o pGEX3' 2 pMol en un volumen de 20 µL. Se emplearon las condiciones de ciclaje de desnaturalización inicial de 94 °C durante 3 min, y 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30s, extensión 60 °C durante 30 s y una extensión final de 72 °C durante 1 min. Una vez terminada la reacción se incubó durante 30 min con 5µL de EDTA 125mM, se incubó durante 12 horas con 60µL de etanol absoluto, se centrifugó 1 hora a 17,136 g, se le agrego etanol al 75% (v/v) y se centrifugó a 17,136 g durante 30 min (dos veces). Se decantó el etanol y se dejó secar, para posteriormente llevar a cabo la secuenciación.

**Cuadro 1. Secuencia de los cebadores empleados para secuenciar.**

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>
<b>pGEX5'</b>	(5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3')
<b>pGEX3'</b>	(5'-CCGGGAGCTGCATGTGTTCAGAGG-3')

## 6.2 Producción *in vitro* de diferentes variantes de let-7

### 6.2.1 Generación de molde de doble cadena

El cDNA de los precursores de la familia de let-7 se sintetizó con la secuencia del promotor de la RNA polimerasa T7 en el 5' (T4oligo). Se generó DNA de doble cadena de los precursores de let-7c, let-7g y miR-98 mediante una PCR con la siguiente mezcla de reacción: dNTPs 2mM (R0161, Fermentas), Buffer 1X (Y02028b, Invitrogen), cebador *forward* correspondiente 0.5µM, cebador *reverse* correspondiente 0.5µM, 2.5 U/µL de Taq polimerasa (18038-042, Invitrogen), 10<sup>7</sup> moléculas de oligonucleótido sintético correspondiente en un volumen de 20 µL.

Se emplearon las siguientes condiciones de ciclaje: desnaturalización inicial de 95 °C durante 5 min. 25 ciclos de desnaturalización de 94 °C durante 30 segundos, alineamiento de 56 °C durante 30 segundos y extensión de 72 °C durante 30 segundos más una extensión final de 72 °C durante 5 min. Se cargó 2µL de cada producto de PCR en un gel nativo de acrilamida al 10% 19:1 y se corrió durante 1:30 horas a 125 Volts.

Se generó DNA de doble cadena del precursor de let-7f-1 mediante una PCR con la siguiente mezcla de reacción. dNTPs 2mM (R0161, Fermentas), Buffer 1X (Y02028b, Invitrogen), cebador *forward* 1.25mM, cebador *reverse* 1.25mM, 2.5 unidades/µL de Taq polimerasa (18038-042, Invitrogen), 5nM de oligonucleótido sintético en un volumen de 20 µL.

Se emplearon las siguientes condiciones de ciclaje: desnaturalización inicial de 95 °C durante 5 min. 35 ciclos de desnaturalización de 95 °C durante 15 segundos, alineamiento de 56 °C durante 30 segundos y extensión de 72°C durante 30 segundos. Se cargaron 2µL de cada producto de PCR en un gel nativo de acrilamida al 10% 19:1 y se corrió durante 1:30 horas a 125 Volts para visualizar el producto.

**Cuadro 2. Oligonucleótidos molde de los precursores de let-7.**

cDNA	Secuencia
<b>let-7c</b>	5'-GCAGGTAATACGACTCACTATAGGGCATCCGGGTTGAGGTAGTAGGTTGTATGGT TTAGAGTTACACCCTGGGAGTTAACTGTACAACCTTCTAGCTTTCCTTGGAGC-3'
<b>let-7g</b>	5'-GCACGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCTGAGGTAGTAGTTTGTACAGTTTGGAG GGTCTATGATACCACCCGGTACAGGAGATAACTGTACAGGCCACTGCCTTGCCA-3'
<b>mir-98</b>	5'-CGTAATACGACTCACTATAGGGAGGATTCTGCTCATGCCAGGGTGAGGTAGTAAG TTGTATTGTTGTGGGGTAGGGATATTAGGCCCAATTAGAAGATAACTATACAACCTTAC TACTTTCCTGGTGTGTGGCATATTCA-3'
<b>let-7f-1</b>	5'-TCAGAGTGAGGTAGTAGATTGTATAGTTGTGGGGTAGTGATTTTACCCTGTT CAGGAGATAACTATACAATCTATTGCCTTCCCTGA-3'

**Cuadro 3. Cebadores empleados para producir a los precursores de let-7.**

Cebador	Secuencia
<b>Fwlet-7c</b>	5'-GCAGGTAATACGACTCACTATAGGG-3'
<b>Rvlet-7c</b>	5'-GCT CCAAGGAAAGCTAGAAGG TTG TAC-3'
<b>Fwlet-7g</b>	5'-GCACGTAATACGACTCACTATAGGGAGG-3'
<b>Rvlet-7g</b>	5'-TGG CAAGGCAGTGGCCTG-3'
<b>Fwmir-98</b>	5'-CGTAATACGACTCACTATAGGGAGGATTCTGC-3'
<b>Rvmir-98</b>	5'-TGAATATGCCACACACCAGGGAAAG-3'
<b>Fwlet-7f-1</b>	5'-TAATACGACTCACTATAGGGTCAGAGTG-3'
<b>Rvlet-7f-1</b>	5'-TCAGGGAAGGCAATAGATTGTATAG-3'

### 6.2.2 Transcripción *in vitro*

La transcripción *in vitro* de los precursores se llevó a cabo empleando la siguiente mezcla de reacción: DTT 5mM (Y00147, Invitrogen), Buffer de transcripción 1X (EP0111, Thermo Scientific), rNTPs 0.42 nM (1 277 057, Roche), 30 µL de producto de PCR, 0.33 unidades de T7 RNA polimerasa (EP0111, Thermo Scientific) y 0.33 unidades de Ribolock® (EO0381, Thermo Scientific) en un volumen de 60 µL. Esta mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 12 horas.

Para la transcripción *in vitro* marcada radioactivamente, se empleó la mezcla de reacción antes mencionada sustituyendo UTP por 1 µL de α-[<sup>32</sup>P]-UTP (NEG507H, Perkin Elmer).

### 6.2.3 Purificación de la transcripción *in vitro*

Al producto de la transcripción *in vitro* se le añadió 60µL de Buffer STOP 2X (EDTA 0.5mM, SDS 0.025%, Formamida 95% (v/v)), se calentó a 65 °C durante 10 minutos y se corrieron en un gel desnaturizante de poliacrilamida (acrilamida-bis acrilamida 19:1 urea 7M 18%, y acrilamida-bisacrilamida 19:1 urea 7M 8% para mir-98) durante 3 horas después de que el colorante Xilen-cianol saliera del gel. La banda correspondiente al producto se cortó y colocó en buffer de elución (NH<sub>4</sub>OOCCH<sub>3</sub> 0.5M, EDTA 1mM, SDS 0.1% (p/v)) e incubó a 4 °C durante 24 horas. El RNA eluido se purificó mediante una extracción fenólica con TRIzol® (15596026, Invitrogen) seguido de una precipitación con isopropanol absoluto y dos lavados con etanol al 75% (v/v). Los RNAs fríos se cuantificaron en el espectrofotómetro Nanodrop 2000® (Thermo Scientific). A los RNAs marcados se les determinó las cuentas por minuto mediante el contador de centello líquido LS6500® (Beckman Coulter) y se calculó la molaridad de estos para los ensayos posteriores.

## 6.3 Evaluación de la interacción entre LIN28B y pre-miRNAs de la familia let-7 por medio de ensayos de retardamiento electroforético (EMSA)

### 6.3.1 Ensayos EMSA

Distintas concentraciones de proteína LIN28B y RNA de let-7 radioactivo fueron incubados 1 hora a temperatura ambiente en Buffer de unión (Tris pH 8.6 20mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, glicerol 10%, DTT 5mM, 2 U/µL de Ribolock® (EO0381, Thermo Scientific). Las muestras se cargaron en un gel nativo de poliacrilamida-bisacrilamida al 8% con una relación 37.5:1 y se corrieron a 200 V durante 1 hora 52 min. con Buffer TB frío. Los geles se secaron, se expusieron durante 48 horas a una placa GE Storage Phosphor Screen (Molecular Dynamics) y fueron leídos en el escáner fluorográfico de barrido Typhoon Trio® (GE Healthcare). Las imágenes fueron visualizadas con el software ImageJ y se determinó el porcentaje de saturación fraccional (RNA unido/ RNA unido + RNA libre). Se graficó el porcentaje

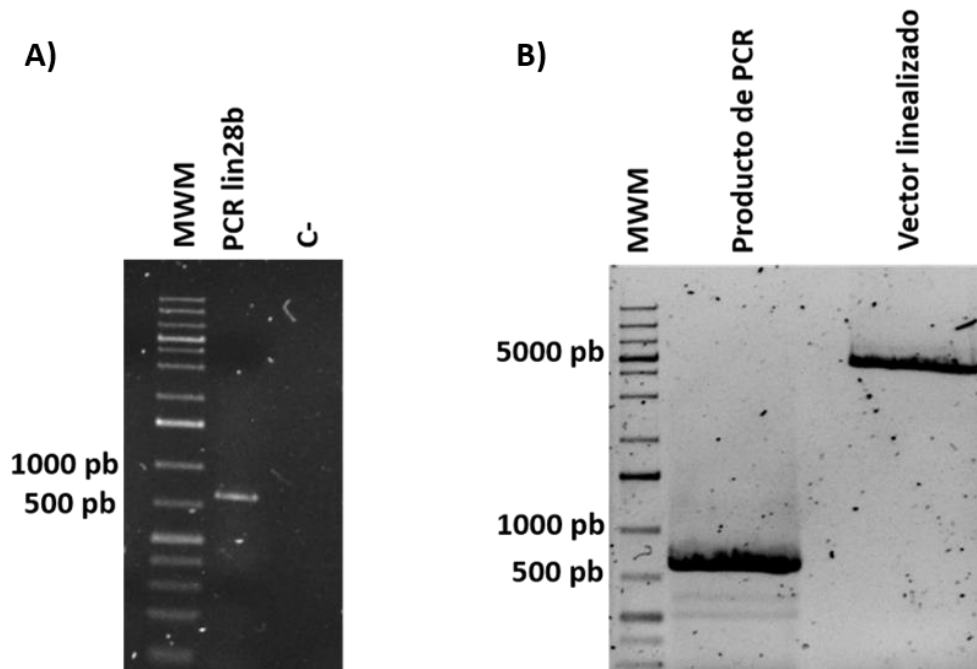
de saturación fraccional contra la concentración de proteína y se calculó la constante de disociación empleando un modelo de regresión no lineal para un solo sitio de unión específico utilizando la ecuación:  $Y = B_{max} * X / (K_d + X)$  mediante el software GraphPad Prism 6.

# 7. RESULTADOS

## 7.1 Producción de la proteína recombinante LIN28B humana

### 7.1.1 Clonación de *gstlin28b* en *pGEX4T1*

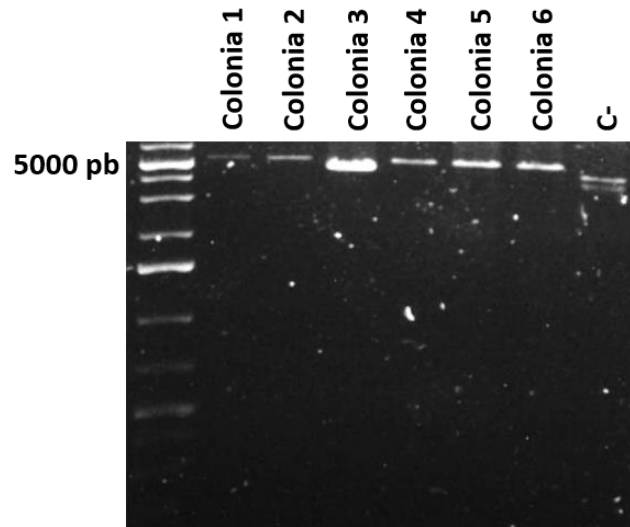
La clonación se inició amplificando la secuencia del plásmido OriGene sc-300636 con una polimerasa de alta fidelidad. En la figura 7, podemos observar la secuencia amplificada de 750 pares de bases que posteriormente fue purificada y digerida con las enzimas BamHI y Sall, de igual manera que el vector pGEX4T1 que posee una longitud de 4969 pares de bases. Una vez que estos componentes fueron digeridos, purificados y ligados, se seleccionaron 8 colonias candidatas cuyo plásmido fue purificado. En la figura 8 podemos observar un retraso en la migración electroforética con respecto al vector pGEX4T1 que nos indica un mayor peso molecular.



**Figura 7. Clonación y digestión del cDNA de *lin28b* humano.** A) PCR que se realizó a partir del plásmido comercial y que se empleó para realizar la clonación de la proteína *gstlin28b*.

B) Digestión de la PCR y vector pGEX4T1 con las enzimas de restricción BamHI y Sall.

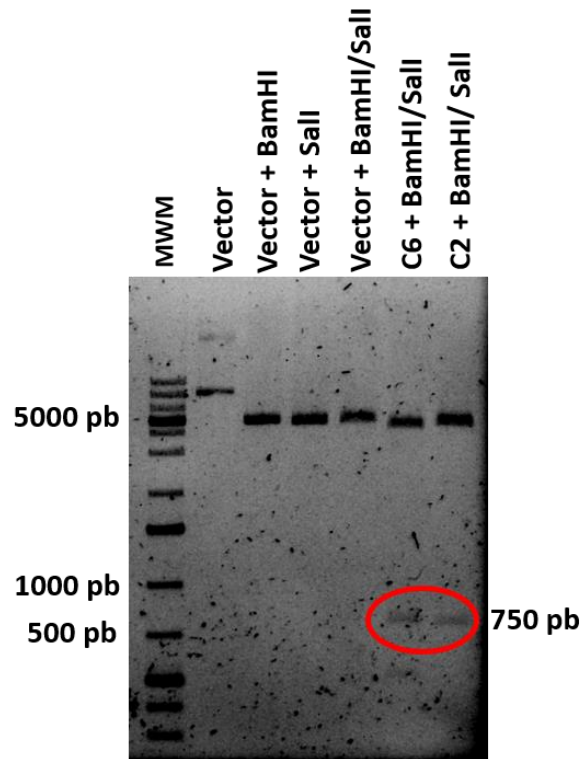




**Figura 8. Colonias candidatas.** En este gel de agarosa al 1% se puede apreciar la diferencia de migración entre las colonias candidatas obtenidas de la transformación de la ligación y el vector pGEX4T1.

#### 7.1.2 Análisis de restricción de la secuencia de la proteína *gstlin28b*

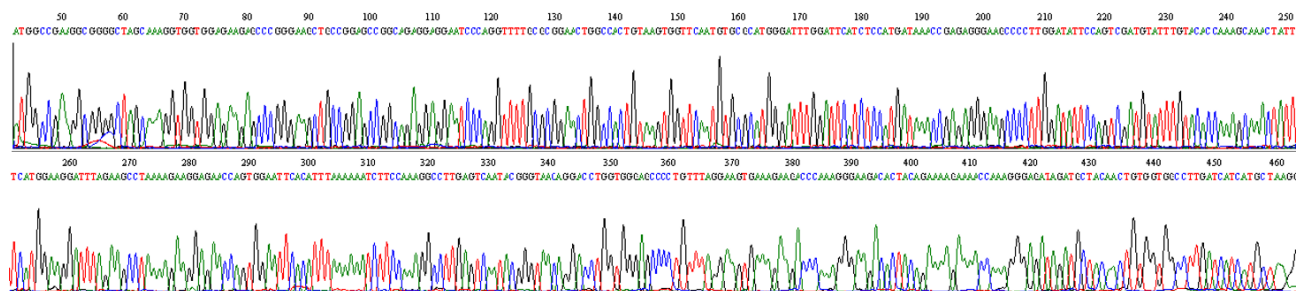
Una vez realizada la clonación se determinó la presencia del tamaño del inserto por medio de un análisis de restricción empleando los plásmidos purificados de las colonias candidatas número 6 (C6) y número 2 (C2) utilizando las enzimas de restricción BamHI y Sall. Se observó el fragmento esperado de 750 pares de bases únicamente en las colonias seleccionadas debido a que estos sitios de corte se encuentran en el sitio múltiple de clonación.



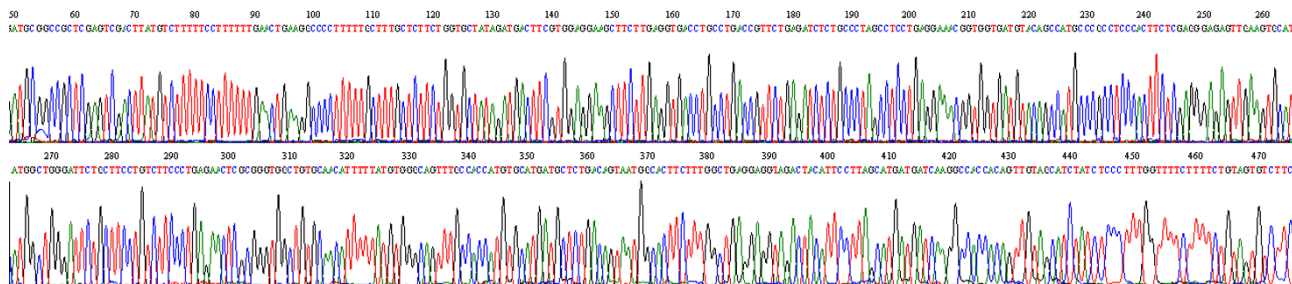
**Figura 9. Análisis de restricción.** Gel de agarosa al 1% donde se observa un fragmento de aproximadamente 750 pares de bases en las colonias C6 y C2 que corresponde al tamaño de la secuencia clonada.

### 7.1.3 Secuenciación de la clonación

Se llevó a cabo la secuenciación del fragmento observado. Se emplearon los cebadores pGEX5' y pGEX3' y se determinó que la identidad de la secuencia corresponde con la región codificante de lin28b con un 100% identidad mediante un BLAST.



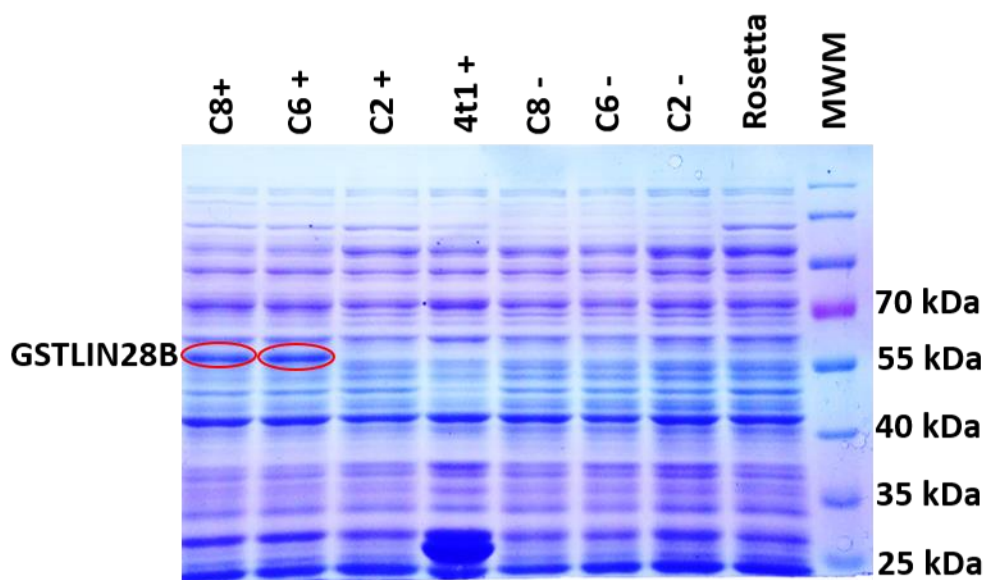
**Figura 10. Secuenciación realizada con el cebador pGEX5' de la secuencia clonada.**



**Figura 11. Secuenciación realizada con el cebador pGEX3' de la secuencia clonada.**

#### 7.1.4 Inducción de GSTLIN28B

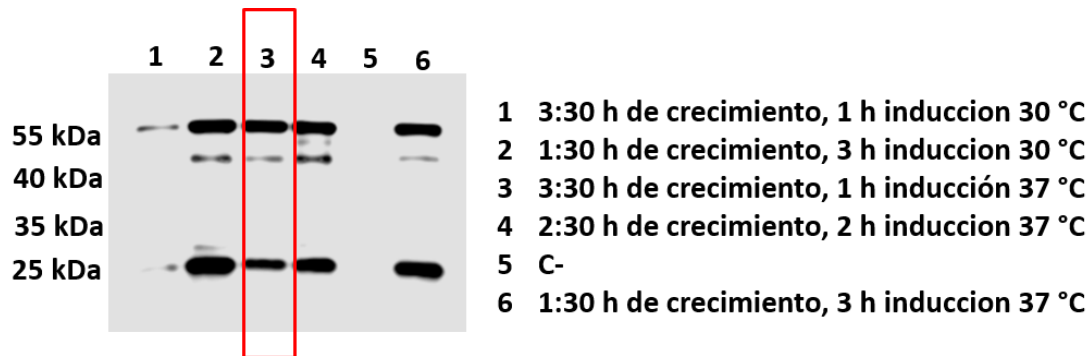
Tres colonias de pGSTLIN28B transformadas en *E. coli* Rosetta (DE3) fueron inducidas y los extractos proteicos fueron evaluados por SDS-PAGE y teñidas con Azul de Coomassie. Dos de estas colonias inducidas mostraron un producto a la altura de los 55 kDa que corresponde al peso de la proteína recombinante GSTLIN28B. Se seleccionó a la colonia número 6 y se continuó usando en los siguientes experimentos.



**Figura 12. Inducción de GSTLIN28.** SDS-PAGE poliacrilamida-bisacrilamida 29:1 al 10% teñido con Coomassie en el que se presentan los extractos proteicos totales de las colonias inducidas número 8 (C8+), número 6 (C6+), número 2 (C2+) y una colonia que solo posee el vector pGEX4T1 que expresa a la proteína GST (4T1). Además, se muestran a las colonias sin inducir número 8, número 6, número 2 y la cepa *E. coli* Rosetta. En este gel podemos observar que la colonia número 8 y número 6 expresan a la proteína GSTLIN28B cuya migración corresponde a su peso molecular.

La expresión de la proteína GST-LIN28B fue confirmada mediante una electroinmunotransferencia empleando un anticuerpo específico contra LIN28B con el fin de determinar la condición ideal de crecimiento e inducción.

En la figura 13 se observa la presencia de distintas bandas que migran a la altura de 55kDa y corresponden a la proteína GSTLIN28B así como la presencia de otras dos bandas que migran aproximadamente a la altura de 25 y 40 kDa que posiblemente se traten de proteína incompleta. Se eligió la condición número 3 debido a que presenta una banda que migra a la altura de 55 kDa con mayor intensidad con respecto a las otras dos.

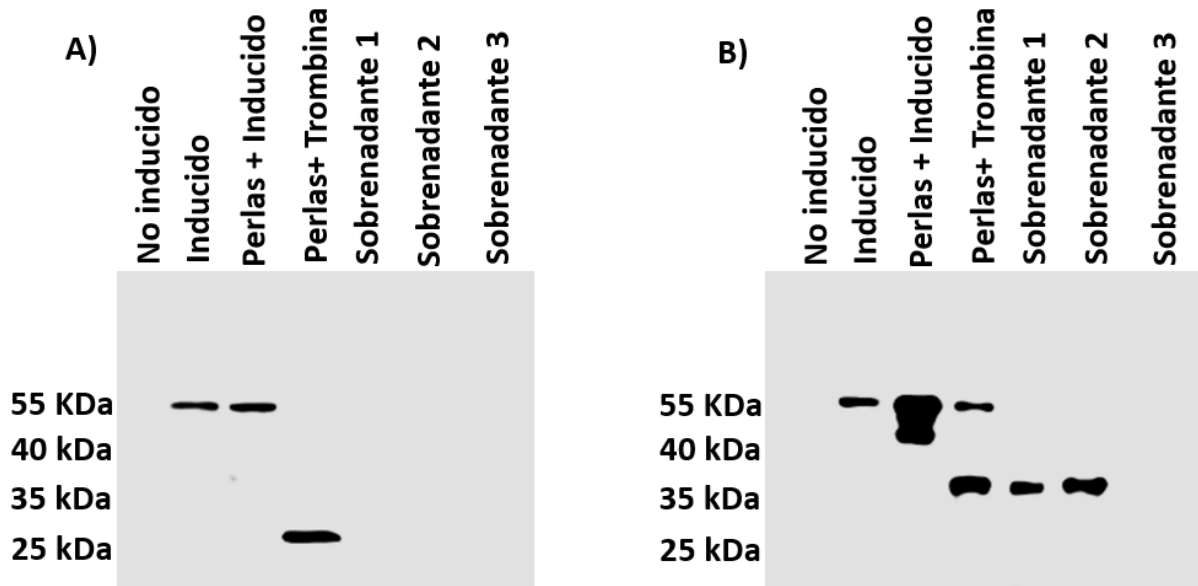


**Figura 13. Electroinmunotransferencia contra LIN28B.** En esta figura se puede observar distintas condiciones a las que se cultivaron e indujeron las bacterias *E. coli* Rosetta que fueron transformadas con la construcción pGSTLIN28B. Además, se aprecia como la condición 3 resultó ser la condición que nos permitió obtener mayor cantidad de proteína completa y menor cantidad de proteína incompleta.

Una vez determinada las condiciones de inducción, se purificó a la proteína GSTLIN28B con perlas de glutatión agarosa y se corroboró su purificación mediante electroinmunotransferencia.

En la figura 14 se presentan dos electroinmunotransferencias, una contra GST y otra contra LIN28B en las cuales se aprecia la presencia de una banda que corresponde al peso de 55kDa previamente observado. Además, cuando se añade trombina a las perlas de glutatión agarosa el tag de GST es liberado ya que se nota la presencia de una banda que migra aproximadamente a la altura de 26 kDa en la

electroinmunotransferencia contra GST. Así mismo, se observa en la electroinmunotransferencia contra LIN28B una banda cuya migración corresponde al peso de LIN28B al añadir la trombina en las perlas y en los sobrenadantes recuperados.



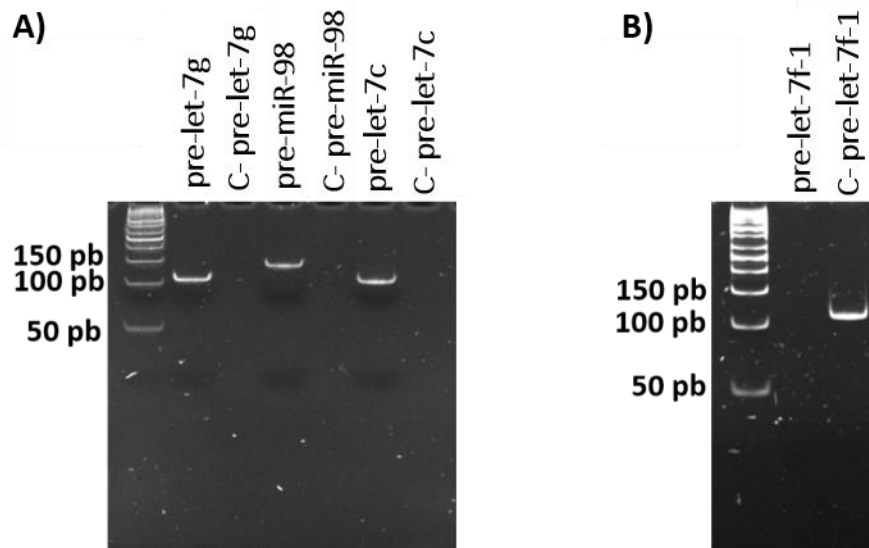
**Figura 14. Purificación de inducción con perlas de glutatión agarosa.**

A) Electroinmunotransferencia contra GST en la que se puede observar una banda característica de la proteína GSTLIN28B en el extracto proteico inducido y en las perlas de glutatión agarosa además de una banda que corresponde al peso de la proteína GST cuando se añade trombina a las perlas de glutatión agarosa. B) Electroinmunotransferencia contra LIN28B en la que se puede observar una banda que corresponde al peso de la proteína GSTLIN28B en el extracto proteico inducido, en las perlas de glutatión agarosa y en las perlas de glutatión agarosa con trombina. Además, se observa que al añadir trombina se libera la proteína LIN28B observándose una banda que migra de acuerdo al patrón de migración electroforético correspondiente a la proteína LIN28B cuando se añade trombina a las perlas de glutatión agarosa y en los sobrenadantes 1 y 2 obtenidos después de la purificación.

## 7.2 Producción *in-vitro* de diferentes variantes de let-7

### 7.2.1 Producción de moldes de doble cadena

Con el fin de obtener un molde de doble cadena necesario para poder llevar a cabo la transcripción *in vitro* se llevó a cabo una serie de PCRs. En la figura 15 se observan los amplicones producidos de cada precursor de let-7 que su vez poseen el promotor de la RNA polimerasa T7. Además, se aprecia que los productos de PCR migraron al peso esperado ya que let-7c, let-7g y let-7f-1 se encuentran a una altura por encima de los 100 pb, mientras que miR-98 migra cerca de los 150 pb.

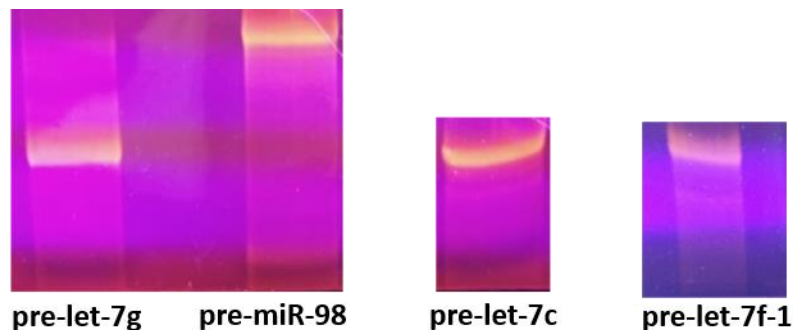


**Figura 15. PCR de precursores de let-7.** Geles de acrilamida-bisacrilamida al 10% 19:1 en los que se observa el producto de la PCR de los precursores. A) Precursores de let-7c, miR-98 y let-7g con sus respectivos controles negativos. B) Producto de la PCR del precursor de let-7f-1.

### 7.2.2 Purificación de la transcripción *in vitro*

Se llevó a cabo la purificación de la transcripción *in vitro* fría con el fin de determinar las condiciones ideales para llevar a cabo la transcripción marcada radioactivamente. En la figura 16 se observan los productos de la transcripción *in*

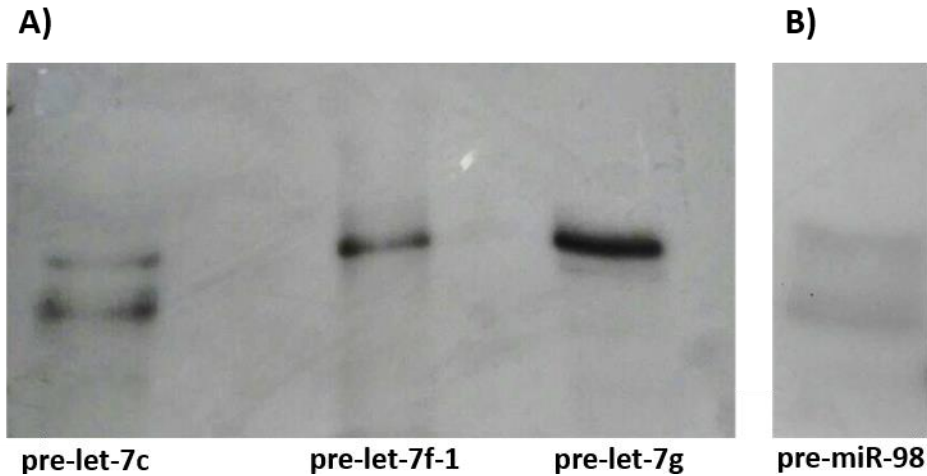
*in vitro* de los 4 precursores cuyo peso fue determinado de acuerdo a la migración relativa de los colorantes azul de bromofenol y xilen-cianol y su migración con respecto a otros oligonucleótidos, cuyo peso corresponde al tamaño esperado, siendo notable miR-98 el que posee menor migración electroforética.



**Figura 16. Transcripción *in vitro* fría de los precursores de let-7.** En esta imagen se presenta la transcripción de los precursores de let-7c, mir-98, let-7g y let-7f-1 que fueron purificados en un gel de poliacrilamida-bisacrilamida al 8% 19:1 urea 7M.

Una vez determinadas las condiciones de la transcripción *in vitro* fría se procedió con la transcripción *in vitro* marcada con  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-UTP. Esta se llevó a cabo en un gel al 18% de poliacrilamida-bisacrilamida 19:1 7M de urea con el objetivo de obtener una mayor resolución y una mejor purificación, sin embargo, debido al tamaño de pre-miR-98, este se purificó en un gel al 8% poliacrilamida-bisacrilamida 19:1 7M. En la figura 17 se observan a los distintos precursores en los geles que fueron expuestos a una película radiográfica y migraron al tamaño esperado. Además, se notó que el precursor de let-7g es el que se transcribe mejor. Por otra parte, pre-let-7c y pre-miR-98 mostraron dos productos transcritos. Sin embargo, se eligieron los que migraron de acuerdo con el patrón de migración electroforética correspondiente.

Una vez purificados cada uno de los precursores se determinó la concentración de estos de acuerdo a las cuentas por minuto obtenidas y se llevaron a cabo los ensayos de interacción.



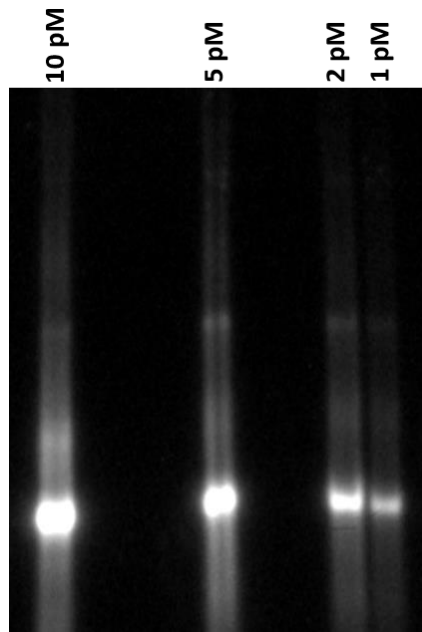
**Figura 17. Transcripción *in vitro* marcada de los precursores.** A) Transcripción de los precursores de let-7c, let-7f-1 y let-7g purificados en un gel de poliacrilamida-bisacrilamida al 18% 19:1 urea 7M. B) Transcripción de pre-miR-98 purificado en un gel poliacrilamida-bisacrilamida al 8% 19:1 urea 7M.

### 7.3 Evaluación de la interacción entre LIN28B y pre-miRNAs de la familia let-7 por medio de ensayos de retardamiento electroforético

#### 7.3.1 Ensayos de EMSA.

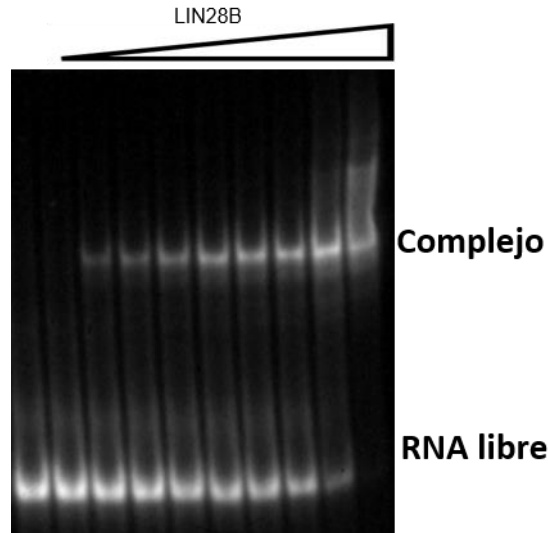
Para llevar a cabo los ensayos de EMSA, fue necesario determinar la cantidad de RNA a utilizar que permitiera ser visualizada de manera correcta en el analizador de imágenes fluorográficas de barrido Typhoon Trio®. En la figura 18 podemos observar como a medida que se incrementa la concentración de precursor la intensidad de la señal aumenta. Se determinó que la concentración ideal para comenzar a realizar los estudios de interacción es 1 pM presentando una señal visible con poco fondo.





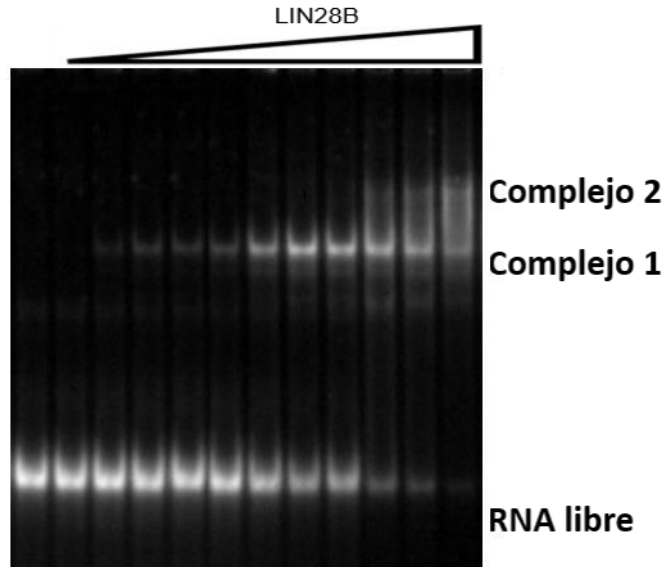
**Figura 18. Curva de concentración de RNA.** En esta imagen se muestran las distintas concentraciones de pre-let-7c que se emplearon con el fin de determinar la concentración de RNA a emplear.

Una vez determinada la concentración óptima de RNA a usar en los EMSA se procedió a calibrar las distintas concentraciones de la proteína LIN28B a usar. En la figura 19 podemos observar como de acuerdo al incremento de la concentración de proteína, se incrementa la cantidad de complejo formado, así como también se disminuye la cantidad de RNA libre. Se llevó a cabo una curva en la que se incrementa la concentración de proteína empleada y se determinó el rango empleado para cada precursor.

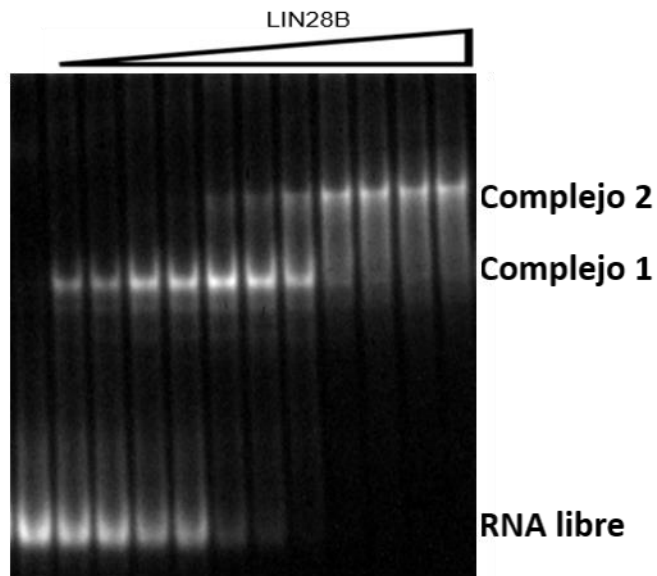


**Figura 19. Curva de concentración de LIN28B para pre-let7-c.** EMSA entre pre-let-7c y LIN28B empleando 1 pM de pre-let-7c marcado con  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -UTP y concentraciones crecientes de LIN28B (0 nM, 1nM, 2nM, 4nM, 8nM, 8nM, 10nM, 16nM, 32nM, 64nM y 128nM).

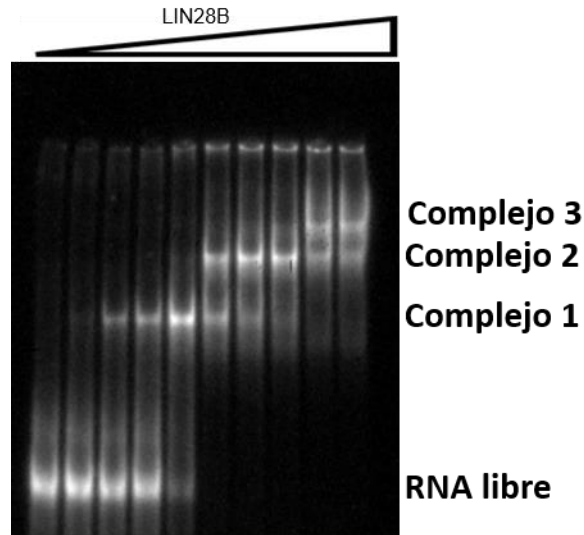
Interesantemente se observó la formación de más de un complejo para cada precursor a partir de una determinada concentración de LIN28B, sin embargo, se decidió determinar la constante de disociación para el primer complejo debido a que el cálculo involucra la cantidad de RNA libre por lo que no es posible determinar las otras constantes de disociación, aunado a esto en la bibliografía en la que se reporta la afinidad de LIN28 con algunos precursores solo muestran la formación de un complejo y las concentraciones de proteína son demasiado altas para la formación de los mismos. En la figura 20, 21 y 22 se pueden observar las curvas que se realizaron para el precursor de let-7g, let-7f-1 y miR-98. Cabe destacar que la concentración de proteína a la que se forman los complejos varía entre estos sin embargo la concentración a la que llegan a la mitad de la saturación ( $K_D$ ) no varía significativamente y se discutirá más adelante.



**Figura 20. Curva de concentración de LIN28B para pre-let7-g.** EMSA entre pre-let-7g y LIN28B empleando 1 pM de pre-let-7g marcado con  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-UTP y concentraciones crecientes de LIN28B (0 nm,4 nM, 8nM, 10nM, 16nM, 32nM, 64nM, 96nM, 128nM, 160M, 192nM y 224nM).

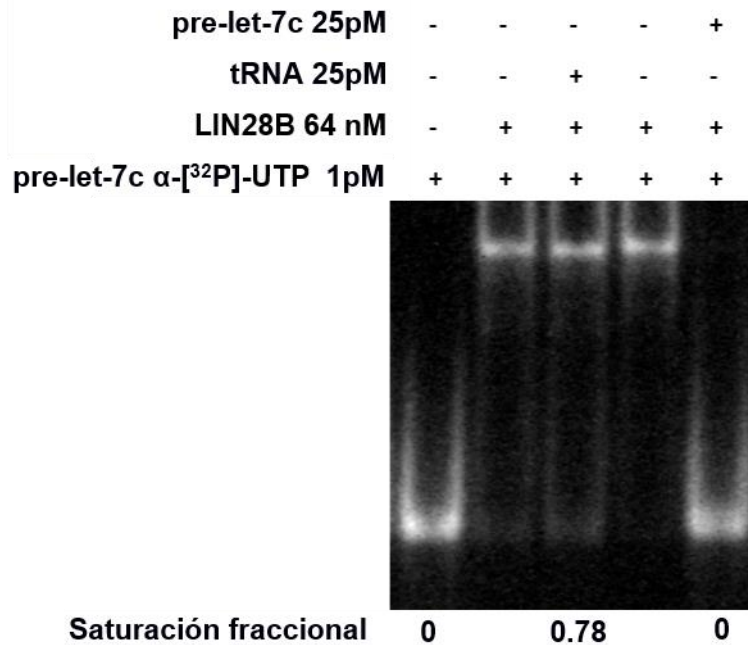


**Figura 21. Curva de concentración de LIN28B para pre-let7f-1.** EMSA entre pre-let-7f-1 y LIN28B empleando 1 pM de pre-let-7f-1 marcado con  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-UTP y concentraciones crecientes de LIN28B (0 nm,8 nM, 10nM, 12nM, 14nM, 16nM, 32nM, 64nM, 96nM, 128M, 160nM y 192nM).



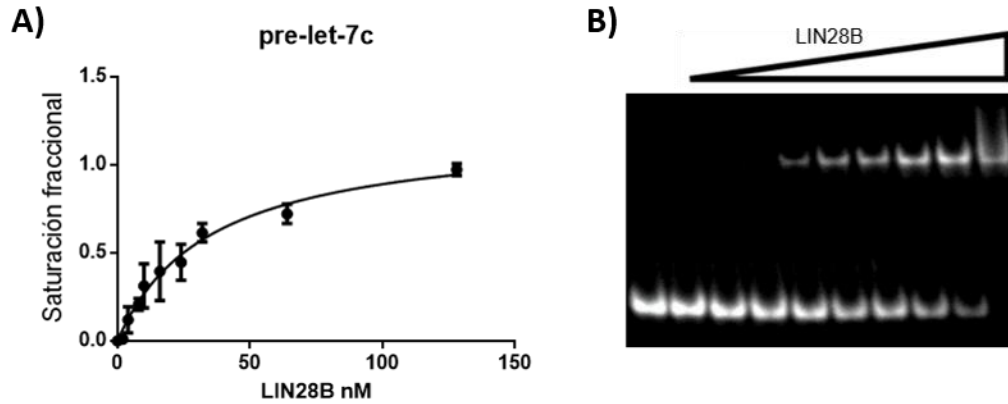
**Figura 22. Curva de concentración de LIN28B para pre-miR-98.** EMSA entre pre-miR-98 y LIN28B empleando 1 pM de pre-miR-98 marcado con  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -UTP y concentraciones crecientes de LIN28B (0 nM, 2nM, 4nM, 8nM, 16nM, 32nM, 64nM, 96nM, 128nM, 160nM).

Con el fin de determinar si la interacción se lleva a cabo de manera específica, fue necesario llevar a cabo un experimento en el cual se empleó una concentración fija de proteína y añadió tRNA y precursor frío 25 veces la concentración de precursor marcado. En este experimento (figura 22) se puede apreciar como al añadir precursor frío el complejo formado pierde la señal completamente y solo se observa el RNA libre, mientras que al añadir tRNA el complejo no muestra una diferencia significativa con el complejo formado únicamente con la proteína. Con esto se determinó que se trata de una interacción específica y se prosiguió con la determinación de las constantes de disociación.

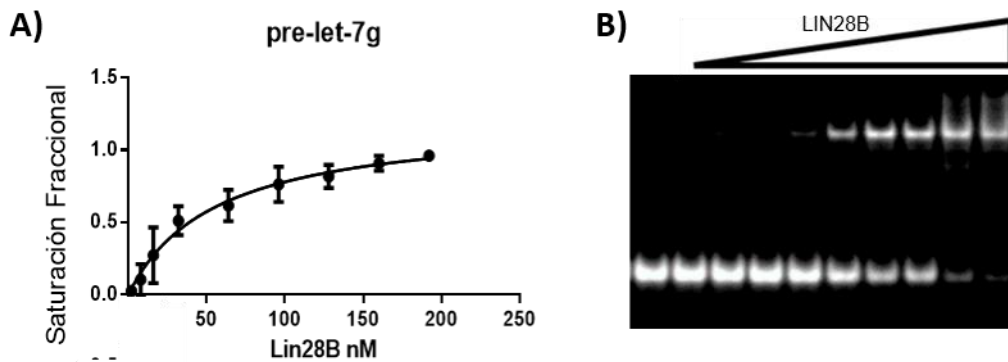


**Figura 23. Ensayo de especificidad.** EMSA entre pre-let-7c y LIN28B en el que se empleó para todos los carriles 1 pM de pre-let-7c marcado con  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-UTP y una concentración fija de LIN28B para los siguientes 3 carriles. Se empleó una concentración de 25 veces más tRNA y precursor frío con el fin de determinar la especificidad de la interacción.

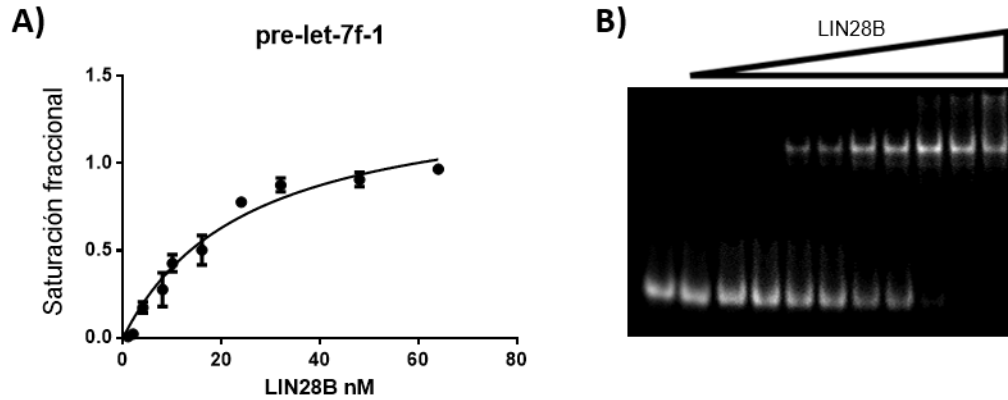
Una vez determinadas las concentraciones de proteína se llevaron a cabo los EMSAs necesarios para calcular las constantes de disociación de los 4 precursores. Estos geles fueron expuestos más de 48 horas a las placas de almacenamiento fluorográfico con el fin de reducir la mayor cantidad de fondo posible. Posteriormente, se determinaron las constantes de disociación empleado una regresión no lineal y se obtuvieron las constantes de disociación que podemos observar en la figura 23, 24, 25 y 26 donde además se pueden apreciar las gráficas generadas a partir de sus respectivos geles.



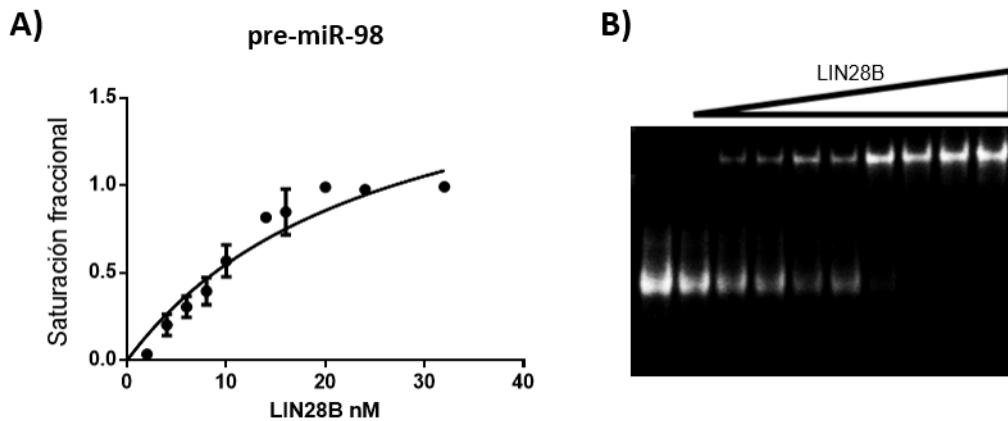
**Figura 24. Ensayo de interacción entre pre-let-7c y LIN28B para la determinación de la constante de disociación ( $K_D$ ).** A) EMSA realizado empleando 1 pM de pre-let-7c marcado con  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -UTP y concentraciones crecientes de LIN28B. b) Saturación fraccional de pre-let-7c como función de la concentración de la proteína ( $K_D = 35 \pm 5.98$ ,  $R^2 = 0.92$  y  $n=3$ ).



**Figura 25. Ensayo de interacción entre pre-let-7g y LIN28B para la determinación de la constante de disociación ( $K_D$ ).** A) EMSA realizado empleando 1 pM de pre-let-7g marcado con  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -UTP y concentraciones crecientes de LIN28B. b) Saturación fraccional de pre-let-7g como función de la concentración de la proteína ( $K_D = 55.80 \pm 11.98$ ,  $R^2 = 0.93$  y  $n=3$ ).

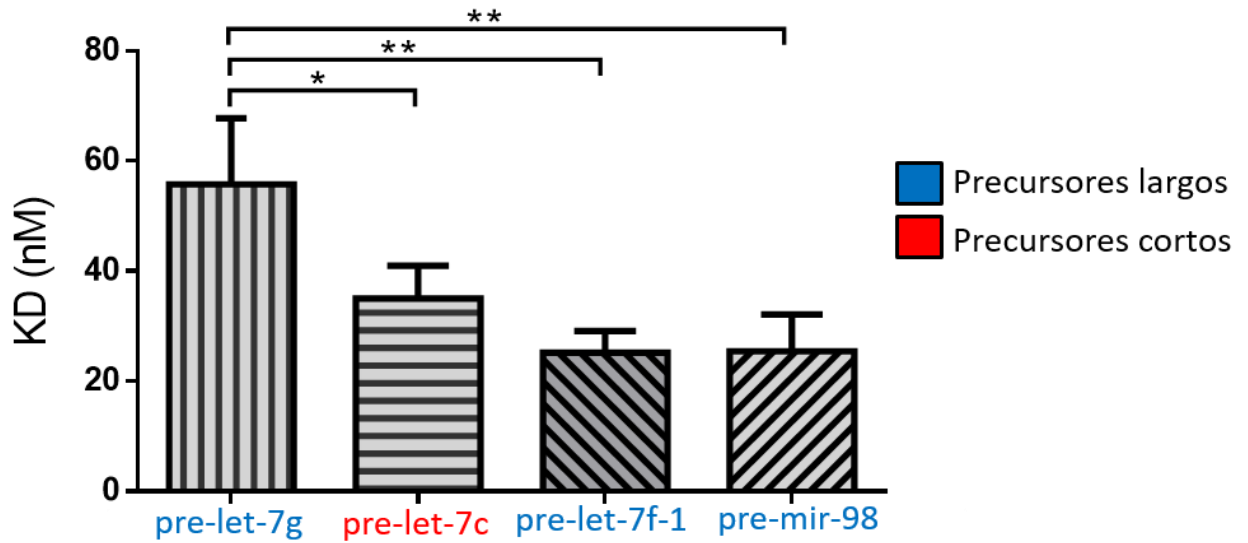


**Figura 26. Ensayo de interacción entre pre-let-7f-1 y LIN28B para la determinación de la constante de disociación ( $K_D$ ).** A) EMSA realizado empleando 1 pM de pre-let-7f-1 marcado con  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -UTP y concentraciones crecientes de LIN28B. b) Saturación fraccional de pre-let-7f-1 como función de la concentración de la proteína ( $K_D = 25.14 \pm 3.99$ ,  $R^2 = 0.96$  y  $n=3$ ).



**Figura 27. Ensayo de interacción entre pre-miR-98 y LIN28B para la determinación de la constante de disociación ( $K_D$ ).** A) EMSA realizado empleando 1 pM de pre-miR-98 marcado con  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -UTP y concentraciones crecientes de LIN28B. b) Saturación fraccional de pre-mir98 como función de la concentración de la proteína ( $K_D = 25.44 \pm 6.64$ ,  $R^2 = 0.91$  y  $n=3$ ).

Una vez obtenidas las  $K_D$  se llevó a cabo un análisis estadístico empleando ANOVA de 1 vía que permitió comparar los valores de las constantes de disociación (figura 27). De acuerdo con esto, el precursor con menor afinidad fue let-7g, mientras que la afinidad de los precursores de let-7c, let-7-f1 y miR-98 no presenta diferencias significativas.



**Figura 28. Comparación entre las constantes de disociación.** En esta figura se muestran y comparan las constantes de disociación obtenidas de los precursores de la familia de let-7 empleando ANOVA de 1 vía.



## 8. DISCUSIÓN

La interacción de let-7 con LIN28 ha sido ampliamente descrita y se han propuesto los mecanismos moleculares por los que se lleva a cabo dicha interacción. Nam y colaboradores describen un modelo en el cual el let-7g posee dos motivos conservados que permiten su interacción con los dominios de unión de LIN28A. Esta interacción es fundamental en la regulación de let-7 ya que la unión con LIN28A o LIN28B es capaz de inhibir el procesamiento por *Dicer* o *Drosha*. Además, se ha descrito que LIN28A y se sugiere que LIN28B promueve la poliuridilación de los precursores a través de las TUTasas que permite llevarlos a degradación<sup>27, 11</sup>.

A pesar de que la interacción LIN28/let-7 se ha estudiado exhaustivamente aún no se comprenden del todo los mecanismos regulatorios entre LIN28 y let-7, así mismo se asume que no existe diferencia entre la interacción de LIN28A/let-7 y LIN28B/let-7 siendo interesante que existan dos proteínas parálogas que regulan a la familia de let-7 y que además se presente una diferencia de expresión en sus miRNAs que dependa del tejido o patología a pesar de que contengan la misma región semilla.

En nuestro grupo de trabajo, Zamora-Contreras encontró distintos niveles de precursores de let-7 en un panel de líneas celulares de cáncer cervical en correlación positiva con LIN28B. Esto junto con otros reportes de escape a la regulación previamente descritos como el de Triboulet y colaboradores, genera distintas interrogantes en el circuito regulatorio LIN28B/let-7. ¿Por qué existe una diferencia en la expresión de los precursores? ¿Tienen algún significado biológico los altos niveles detectados de precursores que se correlacionan con LIN28B? ¿Por qué existen algunos precursores cuyos altos niveles se correlacionan con LIN28B y qué consecuencias tiene? Debido a que LIN28B es una proteína reguladora que afecta directamente la biogénesis de los miRNAs inhibiendo el procesamiento de *Drosha* y *Dicer*, el sistema regulatorio let-7/LIN28B supone una alternativa factible de estudio que proponga un mecanismo molecular que explique los distintos niveles

de precursores, así mismo la correlación observada entre los niveles de los precursores de let-7 y LIN28B podrían indicarnos que existe una relación entre afinidad, regulación de procesamiento y niveles de expresión. Se ha estudiado y propuesto que la estructura y secuencia del precursor son determinantes en la afinidad de los mismos; sin embargo, mediante un análisis bioinformático Sharma & Mohant determinaron que la estructura de let-7 es más importante que la secuencia. Una de las características que presentaron los precursores observados con altos niveles en el estudio de Zamora-Contreras fue una longitud mayor del *stem* con respecto a los precursores reportados con niveles bajos. Por estas razones la longitud del pre-elemento de let-7 se propuso como un elemento clave que afecta la afinidad con LIN28B y pudiera explicar los distintos niveles de precursores previamente descritos.

Con este objetivo presente, se llevaron a cabo los ensayos de interacción por medio de EMSAs, en los que una vez determinada la concentración de RNA se determinó el rango de proteína a emplear. Durante estos ensayos se observó cómo a medida que se incrementa la concentración de proteína la formación de un complejo aumenta y la cantidad de RNA libre disminuye. Interesantemente conforme esta concentración incrementa se detectó la formación de un segundo y tercer complejo. Esta formación de otros complejos coincide con los resultados previamente reportados Desjardins y colaboradores en donde reportan que let-7g es capaz de llevar a cabo la formación de un complejo secundario y ternario además de proponer un modelo de unión entre let-7g y LIN28A. En este modelo la primera molécula de LIN28A inicia la formación de un complejo entre el dominio de dedos de zinc y la secuencia conservada 5'-GAGGG-3' en el bulto 5' y el dominio CSD con la secuencia conservada 5'-AUGAUAC-3' de tal manera que estas interacciones desestabilizan las interacciones que ocurren en el *loop* terminal y exponen una segunda región conservada 5'-GGAG-3' en la cadena 3' permitiendo la unión de una segunda molécula de LIN28A por medio del dominio ZKD que a su vez permite la relocalización del dominio CSD de la primera molécula de LIN28A y con esto la unión de otra molécula de LIN28A.

A pesar de la formación de estos complejos se decidió delimitar nuestro estudio a determinar la constante de disociación para el primer complejo debido a que el cálculo involucra la cantidad de RNA libre por lo que no es posible determinar las otras constantes de disociación. Aunado a esto en la bibliografía en la que se reporta la afinidad de LIN28A con algunos precursores solo muestran la formación de un complejo, por lo que, si pretendemos comparar la afinidad con otros estudios, la  $K_D$  del primer complejo es suficiente. Además, algunos autores determinan que la estequiometría de la unión es 1:1<sup>24,30,31,32</sup> e incluso se propone que es necesario una alta afinidad para iniciar el primer complejo que permitirá llevar a cabo la formación de un complejo secundario y ternario<sup>29</sup>.

Una vez determinadas las condiciones de los ensayos de interacción y la cantidad de proteína a emplear, se logró obtener las constantes de disociación y se compararon. Esta comparación realizada mediante anova de 1 vía sugiere que el largo no influye en la afinidad de los precursores, incluso se puede apreciar que pre-let-7g a pesar de tener un *stem* largo no posee mayor afinidad que pre-let-7c cuyo *stem* es corto. Así mismo no existe una diferencia significativa entre pre-miR-98, pre-let-7f-1 y pre-let-7c a pesar de que pre-miR-98 se trata del precursor más largo. Estos resultados sugieren que la afinidad de LIN28B no está relacionada con los diferentes niveles previamente observados. Cabe destacar que las  $K_D$  obtenidas para distintos precursores de let-7 con LIN28B son similares a las previamente reportadas de LIN28A mediante ensayos de ELISA por Loughlin y colaboradores encontrándose en el mismo orden de magnitud; sin embargo, presentan algunas diferencias de afinidad. Por ejemplo, aquellos obtuvieron una  $K_D$  para los precursores de let-7f-1 de 0.15 nM y let-7g de 0.18 nM. Siendo destacable que a pesar de que se determinaron distintas constantes de disociación, no es posible llevar a cabo una comparación ya que cuentan con desviaciones estándar cerca del 30%.

Interesantemente en nuestros experimentos se observó que la formación de los complejos ocurre con menor cantidad de proteína para los precursores de miR-98 y

let-7f-1 y esto quizá pudiera explicarse de acuerdo algunas estructuras predichas *in silico*. Las predicciones nos muestran que quizá pre-miR-98 y pre-let-7f-1 poseen secuencias conservadas más accesibles para la unión con LIN28B, sin embargo, es posible que los precursores con *stem* cortos como let-7c compensen de alguna manera la interacción.

Se observó que a pesar de las diferencias en la cantidad de proteína necesaria para la formación de distintos complejos la  $K_D$  no varía significativamente debido a las características asintóticas que presentan las curvas. Esto nos indica que no varía significativamente la concentración en la cual la mitad de los sitios de unión se encuentran disponibles. No obstante, un incremento en la  $B_{max}$  nos sugiere que poseen una mayor capacidad de unión. La formación de los distintos complejos no se presentó de manera inesperada ya que previamente fue observada por Desjardins y colaboradores que de manera recalable podría tener consecuencias en el procesamiento por *Dicer*. Estos autores reportan que la multimerización del *loop* terminal de pre-let-7a-1 disminuye el procesamiento por *Dicer* en un 35 y 45 % conforme ocurre la formación de un complejo secundario y ternario sin embargo otros precursores como pre-let-7g y pre-let-7d no demostraron inhibir el procesamiento de *Dicer* conforme ocurre la multimerización o formación de dichos complejos, siendo factible que las diferencias observadas en los niveles de los precursores se deba a la inhibición por *Dicer* debido a la formación de estos complejos y al cambio conformacional adoptado que en primera instancia se debe a la estructura que define la secuencia de cada precursor.

Además de lo descrito anteriormente existen otros factores que deben ser estudiados para esclarecer este patrón de distintos niveles observados en el trabajo de Zamora-Contreras, ya que múltiples variables pueden regular la biogénesis de los miRNAs let-7 que van desde la regulación de la transcripción de los pri-miRNAs, regulación del procesamiento de *Drosha* y *Dicer* hasta los niveles de las proteínas Argonauta o incluso edición de RNA, SNPs y mutaciones puntuales. Entre estos distintos tipos de regulación la presencia de factores de transcripción como c-MYC

se ha observado que es capaz de regular la expresión de distintos let-7 de una manera diferencial, siendo miR-98 uno de los miembros que no es regulado<sup>34</sup>. La modulación de la actividad de *Drosha* es otro punto clave en la regulación de los niveles pri-miRNAs y pre-miRNAs siendo reportado que algunos pri-let-7s son regulados de manera positiva por KSRP<sup>35,36</sup> o negativa por hnRNPA1<sup>36,37,38</sup> y NF90<sup>39</sup>. Así mismo se ha reportado que *Dicer* puede ser regulado por la familia de miRNAs let-7 ya que su transcrito posee sitios de unión complementarios a la región semilla de los miRNAs<sup>40</sup>. Por último, se ha reportado que una desregulación en los niveles de la proteína Ago2 produce la acumulación de pre-let7s<sup>41</sup>. Todos estos factores en adición a otros elementos no determinados previamente en nuestro grupo de trabajo como la cuantificación de los miRNAs, la identificación de la clase de precursores detectados (pri o pre-miRNAs) y la localización de LIN28B en el núcleo o citoplasma hace difícil especular qué factores reguladores de la biogénesis pudieran estar influyendo en los resultados previamente observados. Así mismo existen autores que han reportado que diferencias en la secuencia del *hairpin* pueden producir un procesamiento distinto por *Drosha*<sup>42</sup> por lo que la diferencia de secuencias que desde un principio se ha descrito no queda exenta.

De acuerdo a las Kb obtenidas en adición a los factores que pueden estar involucrados y que no se han analizado, se sugiere que nuestra hipótesis no fue correcta. Sin embargo, este es uno de los primeros estudios donde se analiza la afinidad de varios precursores con LIN28B por lo que era necesario explorar la posibilidad de que el largo del pre-elemento fuera un elemento clave en su regulación ya que suponía una hipótesis bastante factible, accesible y relativamente sencilla para explicar la expresión diferencial de los precursores que pudiesen participar como parte de un elemento clave en la regulación negativa.

## 9. CONCLUSIONES

-Los precursores de let-7 presentan constantes de disociación que no dependen del largo del pre-elemento.

-El pre-elemento no es un elemento clave de los factores que determinan la unión con LIN28B y por lo tanto su regulación.

-Se sugiere que los niveles previamente reportados por nuestro grupo de trabajo no dependen directamente del largo del pre-elemento y otros factores necesitan ser estudiados.

## 10. PERSPECTIVAS

- Verificar mediante distintos ensayos de competencia la diferencia de afinidad entre precursores.
- Calcular las  $K_D$  para los precursores restantes de la familia de let-7.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cai, Y., Yu, X., Hu, S., & Yu, J. (2009). A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 7(4), 147–154. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(08\)60044-3](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(08)60044-3)
2. Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(3), 203–221. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246>
3. Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* 12, 861–874 (2011).
4. Iorio, M. V. & Croce, C. M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol. Med.* 4, 143–159 (2012)
5. Rupaimoole, R., Calin, G. A., Lopez-Berestein, G. & Sood, A. K. miRNA deregulation in cancer cells and the tumor microenvironment. *Cancer Discov.* 6, 235–246 (2016).
6. Slezak-Prochazka, I., Durmus, S., Kroesen, B. J., & van den Berg, A. (2010). MicroRNAs, macrocontrol: Regulation of miRNA processing. *Rna*, 16(6), 1087–1095. <https://doi.org/10.1261/rna.1804410>.
7. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5).



8. Pasquinelli, A. E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 271–282. <https://doi.org/10.1038/nrg3162>
9. Slezak-Prochazka, I., Durmus, S., Kroesen, B. J., & van den Berg, A. (2010). MicroRNAs, macrocontrol: Regulation of miRNA processing. *Rna*, 16(6), 1087–1095. <https://doi.org/10.1261/rna.1804410>.
10. Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.
11. Lee, H., Han, S., Kwon, C. S., & Lee, D. (2016). Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein and Cell*, 7(2), 100–113. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0212-y>.
12. Boyerinas, B., Park, S. M., Hau, A., Murmann, A. E., & Peter, M. E. (2010). The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 17(1). <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0184>
13. Roush, S., & Slack, F. J. (2008). The let-7 family of microRNAs. *Trends in Cell Biology*, 18(10), 505–516. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.07.007>.
14. Liao, T. T., Hsu, W. H., Ho, C. H., Hwang, W. L., Lan, H. Y., Lo, T., Yang, M. H. (2016). Let-7 Modulates Chromatin Configuration and Target Gene Repression through Regulation of the ARID3B Complex. *Cell Reports*, 14(3), 520–533. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.064>.
15. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y et al. 2004 Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Research* 64, 3753–3756.

16. Dahiya N, Sherman-Baust CA, Wang TL, Davidson B, Shih le M, Zhang Y, Wood W III, Becker KG & Morin PJ 2008 MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer. PLoS ONE 3 e2436.
17. Piskounova, E., Polytarchou, C., Thornton, J. E., Lapierre, R. J., Pothoulakis, C., Hagan, J. P., LLiopoulos D., Gregory, R. I. (2011). Lin28A and Lin28B inhibit let-7 MicroRNA biogenesis by distinct mechanisms. *Cell*, 147(5), 1066–1079. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.039>.
18. Martinez, N.J., and Gregory, R.I. (2010). MicroRNA gene regulatory pathways in the establishment and maintenance of ESC identity. *Cell Stem Cell* 7, 31–35.
19. Melton, C., Judson, R.L., and Blelloch, R. (2010). Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* 463, 621–626.
20. Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007b). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.
21. Zhang, J., Ratanasirintrawoot, S., Chandrasekaran, S., Wu, Z., Ficarro, S. B., Yu, C., ... Daley, G. Q. (2016). LIN28 Regulates Stem Cell Metabolism and Conversion to Primed Pluripotency. *Cell Stem Cell*, 19(1), 66–80. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.05.009>.
22. Zhou, J., Ng, S. B., & Chng, W. J. (2013). LIN28/LIN28B: An emerging oncogenic driver in cancer stem cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(5), 973–978. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.006>.

23. Mayr, F., & Heinemann, U. (2013). Mechanisms of Lin28-mediated miRNA and mRNA regulation--a structural and functional perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 16532–16553. <https://doi.org/10.3390/ijms140816532>.
24. Nam, Y., Chen, C., Gregory, R. I., Chou, J. J., & Sliz, P. (2011). Molecular basis for interaction of let-7 MicroRNAs with Lin28. *Cell*, 147(5), 1080–1091. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.020>.
25. Calcagno, C., Lobatto, M. E., Robson, P. M., & Millon, A. (2016). A single let-7 microRNA bypasses LIN28-mediated repression, 28(10), 1304–1314. <https://doi.org/10.1002/nbm.3369>.
26. Jiang, Jinmai, et.al. (2005) Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *NAR* 33 (17), 5394-5403.
27. Tsalikas, J., & Romer-Seibert, J. (2015). LIN28: roles and regulation in development and beyond. *Development*, 142(14), 2397–2404. <https://doi.org/10.1242/dev.117580>.
28. Sharma, C., & Mohanty, D. (2017). Molecular Dynamics Simulations for Deciphering the Structural Basis of Recognition of Pre-let-7 miRNAs by LIN28. *Biochemistry*, 56 (5), 723–735. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00837>
29. Desjardins, A., Bouvette, J., & Legault, P. (2014). Stepwise assembly of multiple Lin28 proteins on the terminal loop of let-7 miRNA precursors. *Nucleic Acids Research*, 42(7), 4615–4628. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1391>.
30. Desjardins, A., Yang, A., Bouvette, J., Omichinski, J. G., & Legault, P. (2012). Importance of the NCp7-like domain in the recognition of pre-let-7g by the pluripotency factor Lin28. *Nucleic Acids Research*, 40(4), 1767–1777. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr808>

31. Heo, I., Joo, C., Kim, Y. K., Ha, M., Yoon, M. J., Cho, J., ... Kim, V. N. (2009). TUT4 in Concert with Lin28 Suppresses MicroRNA Biogenesis through Pre-MicroRNA Uridylation. *Cell*, 138(4), 696–708. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.002>
32. Piskounova, E., Viswanathan, S. R., Janas, M., LaPierre, R. J., Daley, G. Q., Sliz, P., & Gregory, R. I. (2008). Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28. *Journal of Biological Chemistry*, 283(31), 21310–21314. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800108200>.
33. Loughlin, F. E., Gebert, L. F. R., Towbin, H., Brunschweiler, A., Hall, J., & Allain, F. H. T. (2012). Structural basis of pre-let-7 miRNA recognition by the zinc knuckles of pluripotency factor Lin28. *Nature Structural and Molecular Biology*, 19(1), 84–91. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2202>
34. Chang, T. C., Yu, D., Lee, Y. S., Wentzel, E. A., Arking, D. E., West, K. M., ... Mendell, J. T. (2008). Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nature Genetics*, 40(1), 43–50. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.30>
35. Nicastro, G., García-Mayoral, M. F., Hollingworth, D., Kelly, G., Martin, S. R., Briata, P., Ramos, A. (2012). Noncanonical G recognition mediates KSRP regulation of let-7 biogenesis. *Nature Structural and Molecular Biology*, 19(12), 1282–1286. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2427>
36. Michlewski, G., & Cáceres, J. F. (2010). Antagonistic role of hnRNP A1 and KSRP in the regulation of let-7a biogenesis. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(8), 1011–1018. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1874>.
37. Castilla-Llorente, V., Nicastro, G., & Ramos, A. (2013). Terminal loop-mediated regulation of miRNA biogenesis: selectivity and mechanisms. *Biochemical Society Transactions*, 41(4), 861–865. <https://doi.org/10.1042/BST20130058>.

38. Towbin, H., Wenter, P., Guennewig, B., Imig, J., Zagalak, J. A., Gerber, A. P., & Hall, J. (2013). Systematic screens of proteins binding to synthetic microRNA precursors. *Nucleic Acids Research*, 41(3). <https://doi.org/10.1093/nar/gks1197>.
39. Sakamoto, S., Aoki, K., Higuchi, T., Todaka, H., Morisawa, K., Tamaki, N., ... Agata, Y. (2009). The NF90-NF45 Complex Functions as a Negative Regulator in the MicroRNA Processing Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 29(13), 3754–3769. <https://doi.org/10.1128/MCB.01836-08>.
40. Tokumaru, S., Suzuki, M., Yamada, H., Nagino, M., & Takahashi, T. (2008). let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. *Carcinogenesis*, 29(11), 2073–2077. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn187>.
41. Diederichs, S., & Haber, D. A. (2007). Dual Role for Argonautes in MicroRNA Processing and Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Expression. *Cell*, 131(6), 1097–1108. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.032>.
42. Fernandez, N., Cordiner, R. A., Young, R. S., Hug, N., Maclas, S., & Cáceres, J. F. (2017). Genetic variation and RNA structure regulate microRNA biogenesis. *Nature Communications*, 8(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms15114>.