



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA POBLACIÓN DE
APTÁMEROS DE ssDNA CONTRA LIN28B POR EL MÉTODO
SELEX”**

TESIS

Que presenta:

Q.F.B. VÍCTOR MIGUEL GARCÍA VELÁSQUEZ

Para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

en la especialidad de
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de la tesis

Dr. en C. Luis Marat Alvarez Salas

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 768170.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Marat Alvarez Salas por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, otorgarme su confianza en este proyecto, por todo su apoyo y conocimientos brindados durante la realización del mismo.

A la Dra. Bermúdez y al Dr. Hernández, a quienes agradezco su tiempo y aportaciones al proyecto, como catedráticos y asesores pude aprender mucho de ustedes.

A la Dra. María de los Ángeles Romero Tlalolini, por ser mi ejemplo a seguir, a quien agradezco el permitirme iniciar en el mundo de la ciencia, sin su motivación y aportaciones a mi persona no me encontraría en este centro de investigación.

A todo el Laboratorio de Terapia Génica, gracias por todas las enseñanzas y aportaciones, me demostraron que en un grupo de trabajo también se puede encontrar a una familia con la que se pueden festejar los logros y conllevar las penas.

A todos esos compañeros y amigos con los que pude contar para aclarar dudas o relajarnos un rato.

A Mafer por todo el apoyo y la comprensión, gracias por ser mi cómplice y compañera, porque juntos haremos una revolución en diferentes idiomas.

A mis tíos y abuelos, que en todo momento fueron mi soporte.

A Yay y Yaya, porque soy un reflejo de ustedes y sin sus enseñanzas no habría podido alcanzar mis logros.

“Todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere debajo del sol tiene su hora.
Tiempo de nacer, y tiempo de morir; tiempo de plantar, y tiempo de arrancar
lo plantado; tiempo de matar, y tiempo de curar [...]
Tiempo para la guerra, y tiempo para la paz.
Al final, ¿Qué provecho saca uno de sus afanes?”

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 PROPIEDADES DE LOS MICRORNAs (MIRNAs).....	3
3.1 CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA DEL MIRNA LET-7.....	4
3.1 LA PROTEÍNA LIN28B.....	6
3.1.1 Regulación de let-7 por LIN28.....	8
3.1.2 Efectos de la expresión atípica de LIN28B.....	11
3.2 APTÁMEROS.....	14
3.2.1 Tipos de SELEX.....	15
4. ANTECEDENTES.....	19
5. JUSTIFICACIÓN.....	23
6. HIPÓTESIS.....	24
7. OBJETIVOS.....	25
7.1 OBJETIVO GENERAL.....	25
7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
8. METODOLOGÍA.....	26
8.1 DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	26
8.2 PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE LIN28B HUMANA.....	26
8.2.1 Inducción de LIN28B.....	26
8.2.2 Purificación de la proteína LIN28B recombinante.....	28
8.2.3 Electroinmunotransferencia.....	28
8.3 DISEÑO DE LAS POZAS ALEATORIZADAS.....	29

8.3.1 Obtención de las pozas de ssDNA	29
8.4 PRODUCCIÓN IN-VITRO DE DIFERENTES VARIANTES DE PRE-LET-7F-1	31
8.4.1 <i>pre-let-7f-1</i> (DNA)	31
8.4.2 <i>pre-let-7f-1</i> (RNA)	32
8.4.3 Marcaje terminal del extremo 5'	33
8.5 SELEX	33
8.5.1 Evaluación del método SELEX.....	35
9. RESULTADOS	37
9.1 PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA LIN28B RECOMBINANTE	37
9.2 SELEX Y NON SELEX.....	39
9.2.1 Evaluación en el progreso de la selección de aptámeros	41
9.3 EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LIN28B Y LA POBLACIÓN DE APTÁMEROS RECUPERADA	46
9.3.1 Evaluación de la unión del homólogo de <i>pre-let-7f-1</i> con naturaleza de DNA por LIN28B.....	46
9.3.2 Evaluación del enriquecimiento de aptámeros de alta afinidad por LIN28B.....	50
10. DISCUSIÓN	54
11. CONCLUSIONES	60
12. PERSPECTIVAS	61
13. BIBLIOGRAFÍA.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la biogénesis canónica de miRNAs	4
Figura 2. Niveles de let-7 a través de la diferenciación.....	5
Figura 3. Representación esquemática de LIN28A y LIN28B de humano.....	7
Figura 4. Detalle molecular de la interacción entre LIN28 y pre-let-7.....	9
Figura 5. Regulación de la biogénesis de let-7 por LIN28 y LIN28B.....	10
Figura 6. LIN28B y la adquisición de características propias del cáncer.....	12
Figura 7. let-7 y su amplia regulación.....	13
Figura 8. Metodología SELEX.....	14
Figura 9. Representación esquemática del proceso NON-SELEX de RNA...	18
Figura 10. Análisis de la convergencia en la selección de aptámeros mediante q-PCR.....	19
Figura 11. Representación esquemática de la unión del CSD de <i>Xenopus tropicalis</i> con un oligonucleótido de timina.....	20
Figura 12. EMSA de LIN28A con la estructura de tallo-burbuja de pre-let-7 de diferente naturaleza.....	21
Figura 13. Diagrama experimental.....	26
Figura 14. Mapa de la secuencia de p-GST-LIN28B.....	27
Figura 15. SDS-PAGE de la purificación de la proteína LIN28B recombinante	37
Figura 16. Electroinmunotransferencia contra LIN28B.....	38
Figura 17. Productos de emPCR y emAPCR de diferentes ciclos SELEX.....	40
Figura 18. Curvas de intensidad de la fluorescencia a través de los diferentes ciclos SELEX y NON SELEX.....	42
Figura 19. Curvas de análisis de melting a través de los diferentes ciclos SELEX y NON SELEX.....	44
Figura 20. Cuantificación de moléculas recuperadas a través de los ciclos SELEX y NON SELEX por qPCR.....	45

Figura 21. Ensayos de unión entre pre-let-7f-1 y LIN28B para la estimación de la Kd.....	47
Figura 22. Ensayos de unión entre LIN28B y L30.....	49
Figura 23. Ensayos de unión entre LIN28B y la poza de aptámeros recuperados después del 7o ciclo NON-SELEX.....	50
Figura 24. Evolución de los aptámeros contra LIN28B a través de diferentes ciclos NON-SELEX.....	52
Figura 25. Diferencia estructural entre pre-let-7f-1 de RNA y DNA.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de termociclado para la generación de L30 dsDNA o ssDNA	30
Tabla 2. Condiciones de termociclado para generar dsDNA de pre-let-7f-1 .	32
Tabla 3. Características de los ciclos SELEX y NON-SELEX realizados.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

3' UTR	Región no traducida en el 3'
aa	Aminoácidos
AFM-SELEX	SELEX por microscopia de fuerza atómica
BSA	Albúmina de suero bovino
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CE-SELEX	SELEX por electroforesis capilar
CIAP	Fosfatasa Alcalina Intestinal de becerro
cm ²	Centímetro cuadrado
CSD	Dominio de choque frío
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA-SELEX	SELEX de DNA
DRBP	Proteína de unión al RNA y DNA
DTT	Ditiotreitol
ECL	Substrato quimioluminiscente a base de luminol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Fuerzas g
GST	Glutiatión-S-transferasa
IPTG	Isopropil-B-D-1-tiogalactopiranósido
Kd	Constante de disociación
kDa	Kilo Dalton
L30	Poza inicial de oligonucleótidos aleatorizados
let-7	miRNA let-7
M	Molar
mg	Miligramo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
miRNA	Micro RNA
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero

MSI1	Proteína de Unión al RNA Mushashi 1
NaCl	Cloruro de sodio
NC	Nitrocelulosa
NCF-SELEX	SELEX por filtración a través de membrana de nitrocelulosa
ng	Nanogramos
NoLS	Señal de localización nucleolar
NON-SELEX	Metodología SELEX sin pasos de amplificación intermedios
NY	Nailon
°C	Grados Celsius
PAGE	Gel de electroforesis de poliacrilamida
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
pM	Picomolar
PNK	Polinucleótido quinasa
preE	Pre-elemento (estructura de tallo-burbuja conservada)
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
qPCR	PCR cuantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-SELEX	SELEX de RNA
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR con transcriptasa inversa
SDS	Dodecilsulfato sódico
SELEX	Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial
ssDNA	DNA de cadena sencilla
TGS	Buffer TRIS-Glicina-SDS
TNa	Buffer TRIS con Sal
TRBP	Proteína de unión a ARN en respuesta a transactivación
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
TUT4	Tutasa 4

UTR	Región no traducida
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ZKD	Dominio de dedos de zinc

1. RESUMEN

LIN28B es una proteína de unión a RNA ampliamente expresada en el desarrollo embrionario. Está involucrada en la supresión de la biogénesis de los miRNAs supresores de tumor let-7. Por esta capacidad, se le ha descrito como una proteína oncogénica que se expresa en varios tipos de cáncer.¹

La capacidad oncogénica de LIN28B ha llevado a la búsqueda de moléculas que puedan interferir con la unión de let-7 y así recuperar el control de procesos celulares fundamentales.² Dentro de las moléculas que pueden inhibir la interacción entre LIN28 y let-7 se pueden identificar pequeñas moléculas orgánicas, anticuerpos y aptámeros. Estos últimos son moléculas de RNA o DNA de cadena sencilla (ssDNA) que adquieren conformaciones tridimensionales que les otorgan una gran afinidad y especificidad a otras moléculas y son comparables con anticuerpos monoclonales. Debido a su fácil fabricación sintética, los aptámeros han sido usados como biosensores y agentes terapéuticos gracias a que pueden intervenir en interacciones entre proteínas, proteína-sustrato o proteína y ácido nucleico.³

A pesar de que ya se tiene conocimiento profundo de la interacción entre LIN28 y moléculas de RNA, aún no se tiene un registro de cómo el parólogo LIN28B en humanos pueda interactuar con moléculas de ssDNA. El objetivo del presente trabajo fue recuperar una población de moléculas de ssDNA afines a LIN28B mediante la metodología de Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX) para identificar la capacidad de LIN28B de unirse tanto a moléculas de ssDNA como de RNA.

Para ello se produjo a la proteína LIN28B recombinante la cual se utilizó como blanco para llevar a cabo procesos SELEX con una poza aleatorizada de ssDNA. La unión entre la proteína LIN28B recombinante y la poza de aptámeros seleccionada mostraron que la proteína LIN28B recombinante tiene la capacidad de unir moléculas de ssDNA. Este hecho sugiere que la naturaleza química de las moléculas de ácidos nucleicos tiene una influencia limitada en su capacidad de interactuar con LIN28B y, entonces, es la estructuración del ácido nucleico la que otorga esta facultad.

2. ABSTRACT

LIN28B is an RNA-binding protein expressed in embryonic development and is involved in the regulation of let-7 tumor suppressor miRNAs. Due to this capacity, it has been described as an oncogenic protein expressed in various types of cancer. The oncogenic capacity of LIN28B focused research on molecules that can interfere binding with let-7 and allow for the recovery of fundamental cellular processes. Some molecules that can inhibit the interaction between LIN28 and let-7 are small organic molecules, antibodies and aptamers. These last ones are RNA or single-stranded DNA (ssDNA) molecules that can acquire stable three-dimensional conformations to provide binding affinity and specificity by other molecules and comparable to those of monoclonal antibodies. Due to their easy and affordable synthetic production and their ability to interfere with interactions between proteins, protein-substrate or protein and nucleic acid, aptamers have been proposed as novel therapeutic agents for several diseases including cancer.

Despite the basic understanding about the interaction between LIN28 and let-7 miRNAs, the ability of LIN28 to interact with other single-stranded oligonucleotides remains unknown. The goal of this work was to recover a population of LIN28B-high affinity ssDNA molecules from Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) methodology to establish the capacity of LIN28B to bind both ssDNA and RNA molecules. Recombinant LIN28B protein was produced to carry out SELEX processes with a randomized library of ssDNA. The resulting selected pool of aptamers established the ability of LIN28B protein to bind ssDNA molecules. This result implies a limited influence of nucleic acid molecules chemical nature on their ability to interact with LIN28B, and suggests nucleic acid structuring as the feature most likely to provide the basic framework for specific binding.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Propiedades de los microRNAs (miRNAs)

Los micro-RNA (miRNA) son RNAs pequeños de alrededor de 20 a 25 nucleótidos que actúan postranscripcionalmente como represores de la expresión génica. Descritos por primera vez en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y posteriormente identificados como un mecanismo de silenciamiento conservado a través de diferentes especies. Los miRNA se han considerado como moderadores claves en diversos procesos celulares.^{4,5,6} Debido a su papel como reguladores, se les han atribuido funciones trascendentales en redes de regulación que rigen el control del desarrollo y la diferenciación. Su papel es tan importante que alteraciones en su biogénesis se han correlacionado con defectos en el desarrollo de organismos hasta la aparición de estados carcinogénicos.^{7,8}

Los miRNAs son codificados a lo largo del genoma como genes individuales o clústers y se pueden encontrar dentro de los genes, entre ellos o en regiones no traducidas. La biogénesis canónica de miRNAs (Figura 1), comienza con su transcripción como miRNAs primarios o pri-miRNAs por la RNA polimerasa II (RNA-pol II) con una caperuza de 7-metil-guanosina en su extremo 5' y una cola de poliadeninas en el 3' característicos de los transcritos primarios codificantes.⁷

Posteriormente, son procesados a miRNAs precursores (pre-miRNAs) gracias a la acción del complejo Microprocesador formado por la proteína *DiGeorge syndrome chromosomal region 8* (DGCR8) y la ribonucleasa tipo III Drosha. El pre-miRNA resultante con la estructura característica de tallo-burbuja y un extremo 3' donde sobresalen dos nucleótidos es exportado al citoplasma gracias a exportina 5 en un mecanismo dependiente de RanGTP.⁹

Ya en el citoplasma, la endonucleasa DICER se encarga de remover la burbuja terminal del precursor formando un RNA de cadena doble de 20 a 25 nucleótidos de longitud. Posteriormente, este dúplex de miRNA maduro es cargado en la proteína Argonauta y tras la liberación de una de las dos cadenas se forma el Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC) el

cual media el decaimiento de los RNA mensajeros con complementariedad a la región semilla del miRNA localizada en su extremo 5' (2 a 8 nucleótidos).¹⁰

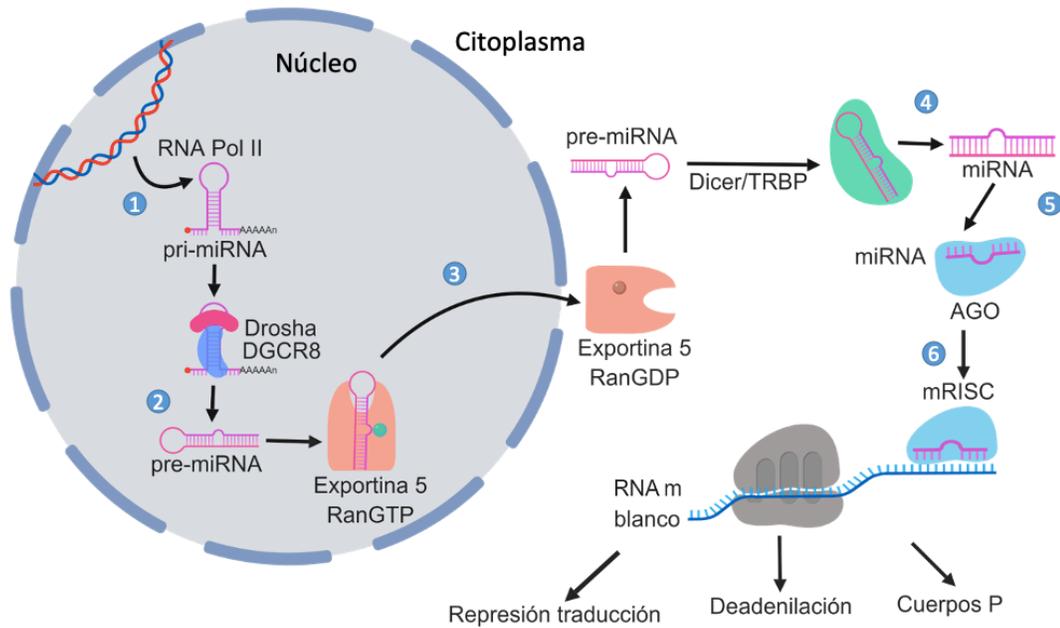


Figura 1. Representación esquemática de la biogénesis canónica de miRNAs. (Pérez y Pérez, figura no publicada) 1. Los miRNA son transcritos por la RNA-pol II en pri-miRNA. 2. Posteriormente, son reconocidos por el complejo Microprocesador (Drosha y DGCR8) que corta al pri-miRNA en pre-miRNA. 3. Luego, el pre-miRNA se exporta al citoplasma con la ayuda de Exportina 5 en complejo con RanGTP. 4. En el citoplasma Dicer en conjunto con TRBP reconoce y escinde el pre-miRNA para formar el dúplex maduro de miRNA. 5. El dúplex de miRNA resultante se carga en la proteína Argonauta que desenrolla el dúplex para producir la cadena guía y descartar la otra cadena para formar el complejo mRISC. 6. mRISC mediante el reconocimiento de su RNAm blanco puede llevar a reprimir la traducción y el decaimiento del RNAm.

3.1 Características de la familia del miRNA let-7

Desde su descubrimiento como un regulador clave para el desarrollo de *C.elegans* let-7 (*lethal 7*) ha traído una nueva visión al mundo de los RNAs no codificantes, las acciones que ellos realizan y ha servido como modelo para el estudio de la regulación de otros miRNAs.^{11,10} Se ha confirmado su presencia a través de especies adoptando un papel importante en el desarrollo y diferenciación de organismos.¹²

En el humano la familia de let-7 está compuesta por 12 miembros (let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i y miR-98), los cuales comparten su región semilla, sugiriendo que todos los

miembros tienen el mismo mecanismo de reconocimiento y blancos en común. Las diferencias en la secuencia de cada uno de los miembros se han correlacionado con cambios en su estructura que conllevan a diferencias en su regulación.^{13,14}

Let-7 se encuentra involucrado en diversos bucles regulatorios y vías de señalización. Sus niveles se han encontrado disminuidos durante el desarrollo, pero generalmente en células diferenciadas ejerce un papel como supresor tumoral (Figura 2). Dentro de la gran red donde let-7 se encuentra como actor principal entre complicadas vías de regulación, se ha identificado como uno de los miRNAs que tienen como blanco rutas de señalización que son cruciales para la aparición, mantenimiento y desarrollo de estados carcinogénicos.^{15,16,17}

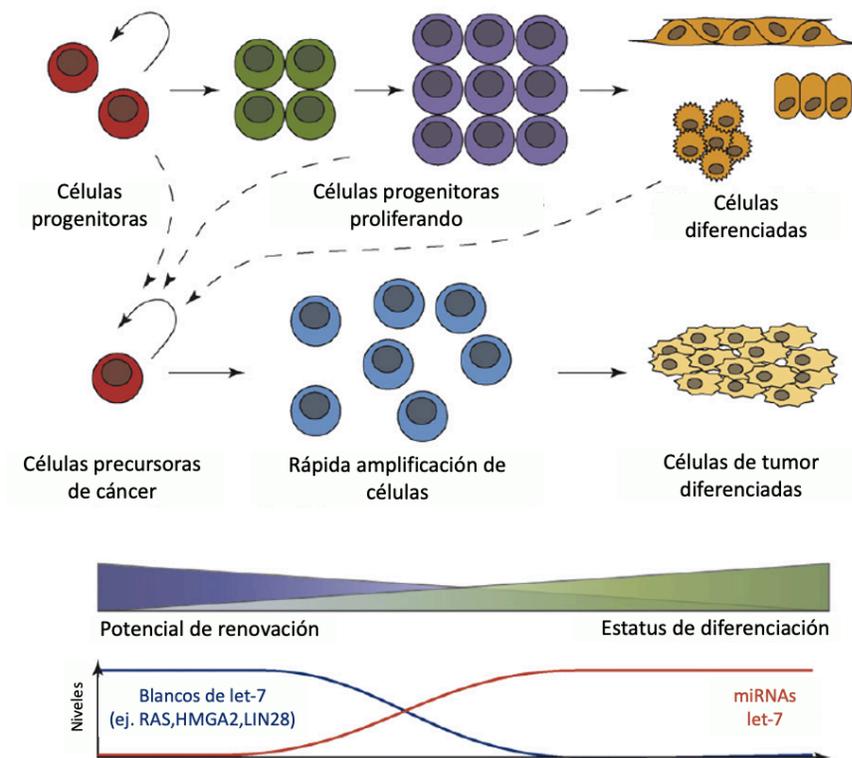


Figura 2. Niveles de let-7 a través de la diferenciación.¹⁷ Durante el desarrollo normal, las células progenitoras se vuelven más restringidas a linajes celulares específicos. Los niveles de expresión de los miembros de la familia let-7 (abajo) aumentan durante la diferenciación. De acuerdo con los niveles de let-7, sus genes blanco (por ejemplo, RAS, HMGA2 y LIN28) muestran un patrón de expresión inverso. En células precursoras de cáncer (CSC) let-7 no es detectable, mientras que RAS, HMGA2 y LIN28 están presentes en niveles altos. Las flechas sólidas representan al progreso en la diferenciación normal. Las flechas punteadas marcan vías alternas debido a la desregulación de los niveles de let-7.

Por ello, se han observado niveles anormales de este miRNA en diversos tipos de cáncer. Una de sus vías de acción es la represión que ejerce a diversos oncogenes como Myc, RAS, E2F1, E2F5, LIN28, ARID3B, PBX3, HMGA2. Así la sobreexpresión de let-7 ha desencadenado la supresión de la capacidad de sufrir la transición epitelio-mesenquimal de células, la inducción de quimiosensibilidad, en retomar el control de las vías de señalización celular y disminuir la proliferación.^{18,19}

Los niveles de let-7 se correlacionan inversamente con la aparición de células precursoras de cáncer (CSC). Así mismo, se ha descrito una relación inversa con las proteínas LIN28 y LIN28B desde estadios tempranos del desarrollo hasta en ambientes oncogénicos, indicando cómo el equilibrio entre estas dos moléculas es uno de los factores que rigen el desarrollo, la diferenciación y el mantenimiento celular.^{20,21,22,23}

3.1 La proteína LIN28B

LIN28 (cell lineage abnormal 28) es considerada una proteína reguladora que se une a RNA. Por primera vez descrita en *C. elegans* como una proteína que dirige el desarrollo, LIN28 se encuentra conservada a través de la escala evolutiva. En el humano, hay dos parálogos de LIN28 conocidos como LIN28A y LIN28B cuyas proteínas se componen de 209 y 250 aminoácidos, respectivamente.^{24,1}

Estas dos proteínas comparten un 62% de identidad (EMBOSS Matcher), y poseen un dominio Cold Shock (CSD) más dos dominios del tipo dedos de zinc (ZKD) en tándem. Esta peculiar combinación de dominios le otorga la capacidad de interactuar con cadenas de RNA (figura 3).^{25,26}

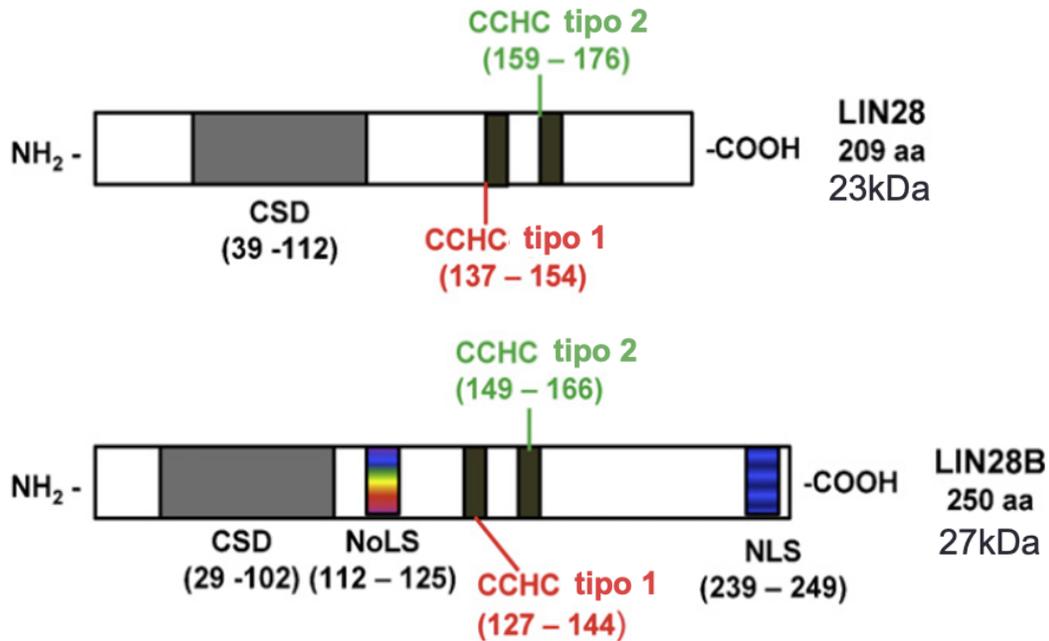


Figura 3. Representación esquemática de LIN28A y LIN28B de humano.²⁷ Arriba, LIN28A (209 aa) posee un dominio CSD en su extremo amino terminal y 2 dominios de tipo dedos de zinc (CCHC) en tándem en su extremo carboxilo. Abajo, LIN28B (250 aa) posee además un motivo de localización nucleolar (NoLS) en medio del CSD y los CCHC; así como un motivo de localización nuclear (NLS) en su extremo carboxilo.

Debido a la gran homología en secuencia de LIN28A y LIN28B, se les han atribuido a ambas las mismas funciones en el control del desarrollo temprano, su papel en cáncer y el control de la biogénesis de la familia de los miRNA let-7. Sin embargo, se ha observado que la expresión de estas dos proteínas es mutuamente excluyente.²⁷ Más aún, el mayor tamaño de LIN28B le otorga algunas diferencias en su expresión y función.²⁸

La presencia de los dominios de localización nuclear y nucleolar en LIN28B, han llevado a encontrarla tanto en el citoplasma como en el núcleo.²⁹ Se ha propuesto un recambio entre estos dos compartimentos, con una preferencial localización nucleolar, indicando la posible presencia de factores desconocidos en el nucléolo para regular a los pri-let-7 de una forma dependiente de LIN28B.²⁷

Debido a que las proteínas nucleolares son altamente dinámicas y se encuentran en constante recambio entre el nucléolo y nucleoplasma, la posible

capacidad otorgada a LIN28B de humano por la acción conjunta de estos motivos de localización y el CSD de interaccionar con moléculas de DNA y así añadir otro mecanismo de regulación a las acciones de esta proteína no se ha confirmado.^{30,31}

3.1.1 Regulación de let-7 por LIN28

Mediante ensayos de interacción y co-precipitación se han podido recuperar los complejos que los precursores de la familia let-7 forman con LIN28. Estos experimentos ayudaron a plantear los principios de la regulación negativa que LIN28 ejerce sobre la biogénesis de let-7; idea que surgió de la relación inversa observada que LIN28 y let-7 tienen en las células en donde niveles constantes de let-7 son encontrados durante la diferenciación y LIN28 solamente es detectable a altos niveles en células sin diferenciar.^{32,33}

Aunque ambas proteínas participan de manera conjunta en el desarrollo humano, LIN28A ha sido mayormente estudiada en cuanto a su estructuración. Debido principalmente a su menor tamaño (22 kDa), esta ha sido usada para establecer su estructura bipartita y la interacción que tiene con sus blancos principales.^{26,34,35}

La estructura cristalográfica mostrada por Nam en 2011 mostró cómo LIN28A actúa como un supresor de la biogénesis de pre-let-7f, mediante el reconocimiento mediado por los ZKD y el motivo de secuencia 5'-GGAG-3' en el loop terminal conservado en los pre-let-7.³⁴ Así también se identificó que el motivo CSD de esta proteína interactúa con el loop terminal de los pre-let-7 a través de un motivo menos específico (5'-(U)GAU-3'), pero que le confiere una mayor afinidad a la interacción y conlleva a una amplificación de los efectos regulatorios de LIN28 (figura 4).¹⁴

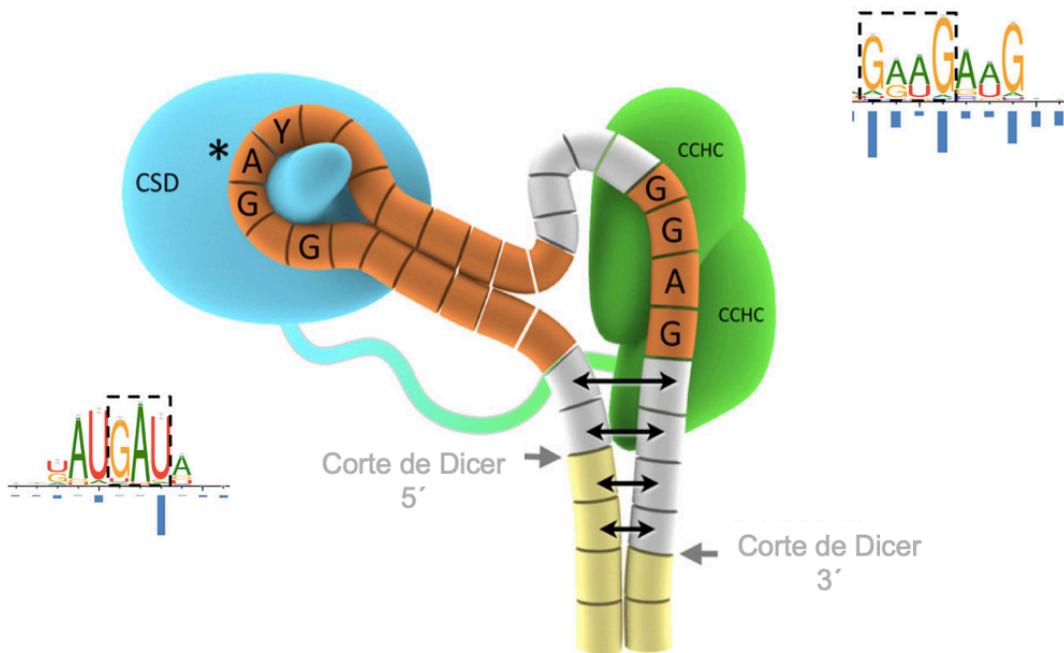


Figura 4. Detalle molecular de la interacción entre LIN28 y pre-let-7.^{14,34} LIN28 interactúa con el loop terminal de los precursores de let-7 a través de los dominios CSD (azul) y ZKD (verde) y motivos conservados en los pre-miRNAs (naranja). En gris se observa las partes del precursor no incluidas en la cristalografía, en amarillo se marcan las partes del miRNA maduro y con flechas grises los sitios de corte para Dicer. Se marca con flechas negras el posible desdoblamiento de bases mediado por LIN28. Al lado de cada interacción se observan los motivos en formato MEME identificados por Ustianenko y colaboradores en el 2018.

Los efectos de esta interacción dirigen el impedimento en la maduración de los let-7 a través de diferentes mecanismos, impidiendo el procesamiento de los pri-let-7 por *Drosha* en el núcleo, bloqueando el procesamiento de los pre-let-7 por *Dicer* o promoviendo la oligouridilación del extremo 3' de los pre-let-7 en el citoplasma mediante el reclutamiento de las TUTasas 4 y 7; hecho que sirve de señal para su degradación por la nucleasa DIS3L2.^{26,36,37}

A diferencia de LIN28A que se ubica exclusivamente en el citoplasma, LIN28B se encuentra en constante cambio entre el núcleo y el citoplasma debido a que LIN28B posee una señal de localización nuclear en el extremo carboxilo terminal y una señal de localización nucleolar entre el CSD y los ZKD.^{38,28}

Por su parte los mecanismos por los cuales LIN28B inhibe la expresión del miRNA let-7 permanecen controversiales y recaen en cuatro teorías principales. La primera postula que mediante un mecanismo independiente de

TUT4, el LIN28B nuclear se une a los pri-let-7 a través de sus dominios conservados impidiendo su procesamiento por el complejo microprocesador.²⁷ La segunda y tercera establecen que LIN28B puede unirse a los pre-let-7 en el citoplasma e inhibir su procesamiento por DICER²², así mismo, puede inducir la degradación de los pre-let-7 por reclutamiento de alguna TUTasa desconocida que promovería la activación de la exonucleasa DIS3L2.³⁹

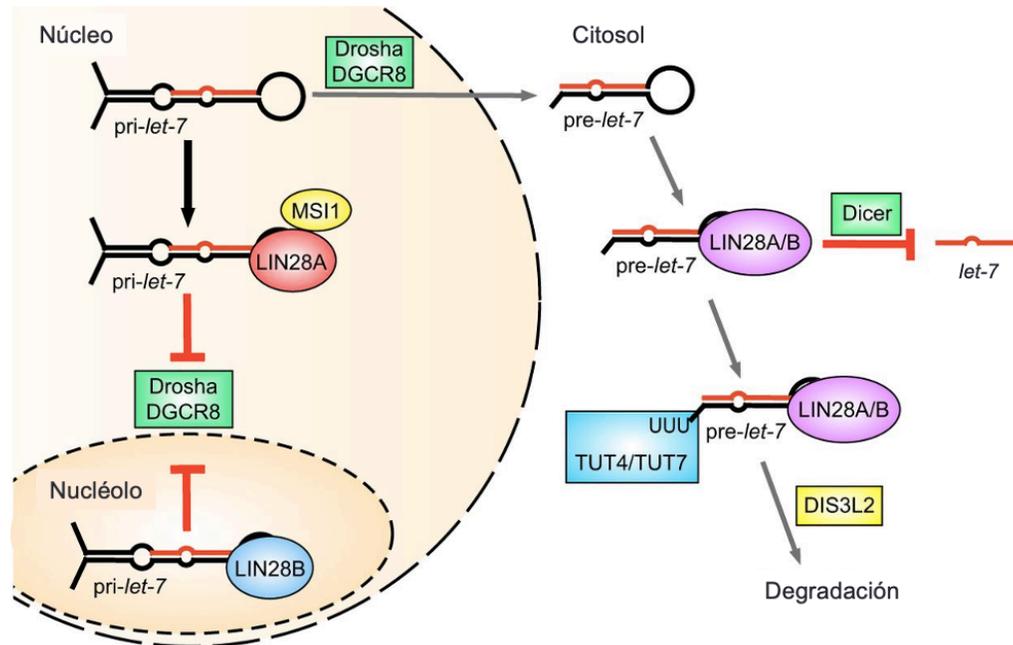


Figura 5. Regulación de la biogénesis de let-7 por LIN28 y LIN28B.²⁶ La biogénesis puede ser inhibida de manera dependiente o independiente de las TUTasas. LIN28B puede secuestrar al pri-let-7 en el nucléolo impidiendo su procesamiento por el complejo microprocesador (Droscha y DGCR8). LIN28A con ayuda de MS11 puede localizarse en el núcleo, impidiendo el corte de pri-let-7. En el citoplasma, ambos parálogos pueden unirse al pre-let-7 impidiendo su procesamiento por Dicer, y llevando al precursor a degradación gracias al reclutamiento de las TUTasas 4 y 7 que bajo estas condiciones poliuridilan el extremo 3' del precursor, lo que desencadena su decaimiento por medio de la exonucleasa DIS3L2.

La cuarta teoría recae en su NoLS, el cual le permite también secuestrar a los pri-let-7 en el nucléolo impidiendo su maduración (figura 5), lo que propone la presencia de factores nucleolares que dirijan la degradación o modificación de los pri-miRNA secuestrados por LIN28B.²⁷

3.1.2 Efectos de la expresión atípica de LIN28B

La represión en la expresión de let-7 es necesaria para el desarrollo normal y para conservar el estado pluripotente en las primeras etapas del desarrollo embrionario. Sin embargo, una vez que el desarrollo se ha completado, la gran mayoría de tejidos expresan a let-7, encontrando presencia de LIN28 solamente en algunas partes como en las células epiteliales del asa de Henle, los tubos colectores del riñón y en el músculo cardíaco.^{40,41}

Se ha identificado que en ratones la sobreexpresión de LIN28B es suficiente para el desarrollo de cáncer hepatocelular. Este hecho se relaciona con los reportes de que en varios tipos de cáncer (pulmón, mama, colón e hígado) LIN28 se encuentra sobreexpresada, e induce proliferación gracias a la activación de varios oncogenes a través de mecanismos dependientes e independientes de let-7 (figura 6).^{42,43}

LIN28 puede actuar de una forma independiente de su acción sobre let-7 para promover el estado oncogénico, mediante la unión directa a los transcritos de proteínas encargadas de activar la invasión y metástasis, promover la inestabilidad y la mutación genómica, así como adquirir una inmortalidad proliferativa.^{1,32,38,44}

Recientemente, también se identificó la co-expresión de ciertos precursores de let-7 con LIN28B en líneas celulares derivadas de cáncer cervical, lo que implicaría un mecanismo de escape de la regulación de LIN28B en este ambiente.⁴⁵

La presencia de LIN28B en tejidos carcinogénicos también permite la estabilización de transcritos facilitando la expresión por la unión directa a su región codificante o su 3' UTR.¹ Así, se ha identificado la regulación positiva en la expresión de genes involucrados en el ciclo celular, splicing y remodelamiento de la cromatina además de biomarcadores en varios tipos de tumores humanos como DLL3 en cáncer de pulmón de células pequeñas.^{46,47}

Desde que se identificó la interacción entre LIN28 y let-7, la relación entre estas dos moléculas llamó la atención sobre todo por la posible retroregulación que estas podrían tener.^{24,23}

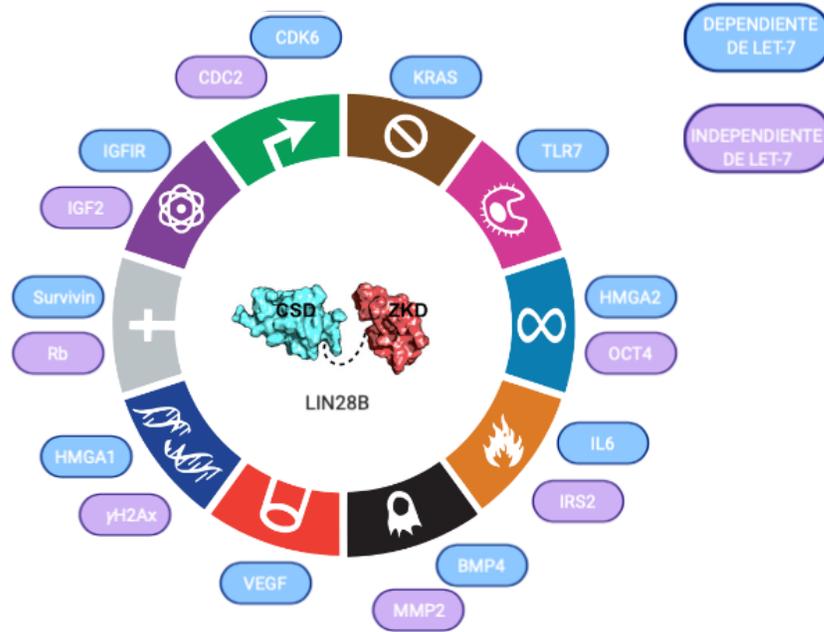


Figura 6. LIN28B y la adquisición de características propias del cáncer (modificado de Balzeau et al. (2017)).¹ La capacidad de unión al RNA de LIN28B además de regular genes blancos propios de let-7, le permite estabilizar mRNAs necesarios que promueven el desarrollo de cáncer. En azul se marcan los genes regulados por LIN28B a través del efecto sobre la biogénesis de let-7. En violeta se marcan los genes regulados directamente por su interacción con LIN28B. En el círculo se esquematizan las características otorgadas por LIN28B que promueven el desarrollo y progresión a cáncer. En sentido de las manecillas del reloj, a partir de las 12, representa: evadir los supresores del crecimiento, escapar de la respuesta inmune, adquirir una inmortalidad proliferativa, promover la inflamación, activar la invasión y metástasis; inducir la angiogénesis, promover la inestabilidad y mutación genómica, resistir la muerte celular, desregular el metabolismo celular y adquirir una señalización replicativa sostenida.

Debido a las diversas vías en las cuales participa, let-7 es considerado como un miRNA supresor de tumores con una gran cantidad de blancos, tal es el caso de transcritos asociados al control del ciclo celular, regulando procesos como el paso a través de los puntos de control del mismo, la replicación del DNA y la proliferación celular.^{37,48} Además, let-7 es capaz de inhibir la proliferación y resistencia tumoral por la regulación negativa que ejerce sobre

un gran número de oncogenes, afectando reguladores clave del ciclo celular, la diferenciación celular así como de la apoptosis.^{36,17}

A través de su interacción con let-7, LIN28 promueve múltiples procesos que pueden conllevar al desarrollo y la progresión a cáncer.¹ Se ha descrito que let-7 interactúa con sitios de unión en el 3' UTR del transcrito de LIN28 y LIN28B, mostrando una retroregulación para esta molécula en donde altos niveles del miRNA impedirían la formación de los parálogos de LIN28, promoviendo un mayor escape regulatorio y, en consecuencia, una mayor cantidad de let-7 maduro en estos estados (figura 7).^{49,50}

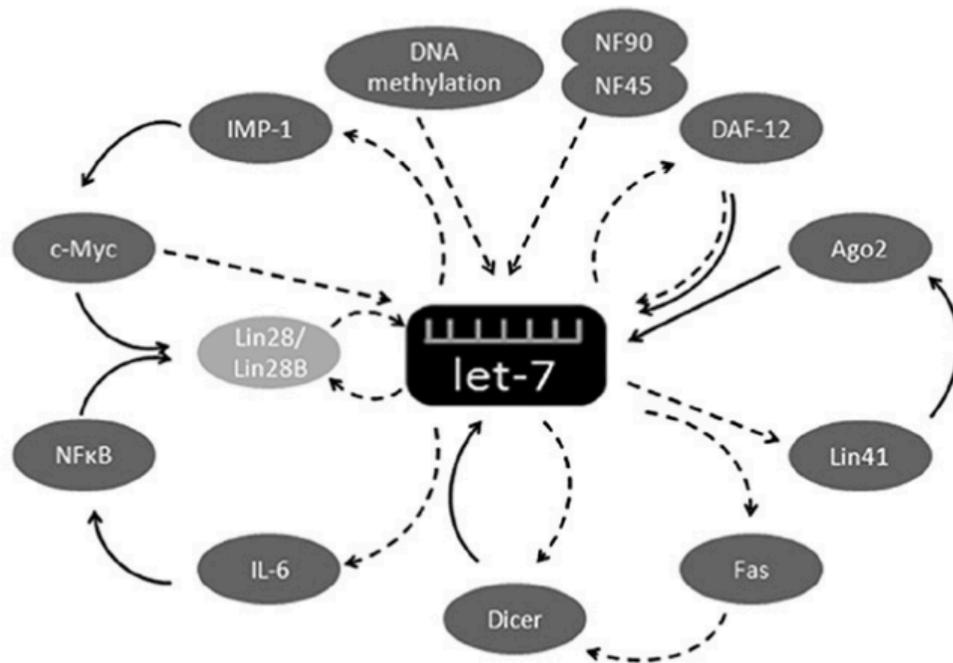


Figura 7. let-7 y su amplia regulación.⁵⁰ Se esquematiza la regulación de la expresión de let-7 en varias etapas, involucrando a varios factores y circuitos regulatorios, destaca la doble regulación negativa con LIN28B. Las flechas sólidas representan a modificaciones activadoras y las flechas punteadas a modificaciones inhibitorias.

El entendimiento del funcionamiento de LIN28B podría revelar nuevos blancos terapéuticos potenciales para restaurar los niveles de let-7 en diversos tipos de cáncer con sobreexpresión de LIN28B.²⁷ Varios estudios se han centrado en inhibir esta interacción mediante pequeñas moléculas que desestabilizan el

complejo LIN28B/pre-let-7 dejando a let-7 libre para ejercer su función antioncogénica.^{51,52,53}

3.2 APTÁMEROS

Los aptámeros son moléculas de RNA o DNA de cadena sencilla (ssDNA) que pueden plegarse en conformaciones tridimensionales que les confieren la capacidad de reconocer una molécula blanco con gran afinidad y especificidad, siendo comparables con algunos anticuerpos monoclonales.⁵⁴ Desde que se describió el método de Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX) en 1990, se han podido seleccionar aptámeros que tienen afinidad por una gran variedad de blancos que van desde pequeñas partículas metálicas, hasta células completas.^{55,56,57}

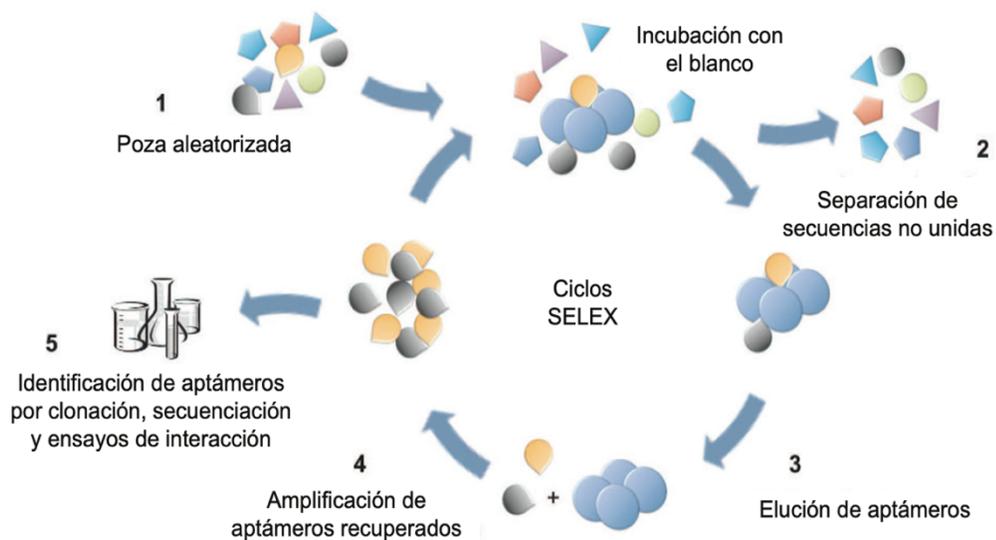


Figura 8. Metodología SELEX.⁵⁸ Se muestra un esquema del método SELEX como un proceso iterativo. 1. Una poza aleatorizada de oligonucleótidos se hace interaccionar con un blanco. 2. Mediante diversos métodos de particionamiento, las moléculas no unidas son separadas. 3. Posteriormente, los aptámeros con afinidad por el blanco son recuperados. 4. Los aptámeros recuperados son amplificados para poder entrar a otro ciclo de selección. 5. Después de varios ciclos, aptámeros con alta afinidad por el blanco son identificados a través de clonación, secuenciación y ensayos de interacción.

El método SELEX consiste en la partición de una poza aleatorizada de ácidos nucleicos de cadena sencilla mediante su interacción con el blanco de interés, para su posterior amplificación y de nuevo su interacción con el blanco para

completar un ciclo de selección. Después de varias rondas de selección, aptámeros con alta afinidad por el blanco son identificados a través de clonación, secuenciación y ensayos de interacción (figura 8).⁵⁸

Una vez obtenidos, los aptámeros pueden aplicarse como sensores moleculares y en algunos casos son capaces de interferir con las funciones biológicas de sus blancos, como son las interacciones proteína-sustrato, proteína-proteína y proteína-ácido nucleico; interacciones que LIN28B posee y son necesarias para su funcionalidad.⁵⁹

3.2.1 Tipos de SELEX

El método SELEX tiene diversas variantes, cada una de ellas tiene sus ventajas y desventajas, tales como: el tiempo que lleva realizar un ciclo de selección, el requerimiento técnico necesario para realizarlo, la cantidad de blanco utilizado, entre otros. Así también, la eficiencia en la recuperación de aptámeros de alta afinidad en cada método se ve afectada por el posible fondo que cada uno de ellos pueda tener, definido principalmente por el estado físico en el que se encuentre el blanco.

Una de las variables principales del método consiste en la naturaleza de la poza aleatorizada de ácidos nucleicos. En sus inicios, ésta era diseñada a partir de RNA dada su naturaleza de cadena sencilla directamente de un proceso de transcripción. Sin embargo, resultó más práctico y menos costoso el utilizar ssDNA directamente de la síntesis o por un proceso de amplificación.⁶⁰

Para realizar un RNA-SELEX, una poza aleatorizada de ssDNA sintético es transcrita para producir una poza de RNA. Así, el diseño de la poza debe incorporar un promotor (p.ej. el promotor del bacteriófago T7) y el protocolo SELEX debe incorporar una reacción de transcripción *in vitro* (TIV). La poza de RNA es incubada con el blanco de interés y las moléculas interactuantes se separan por diversos métodos (partición). En sus orígenes se empleaba la cromatografía por afinidad en columna para la partición, utilizando como fase móvil a la poza aleatorizada en un buffer con altas concentraciones de sal para

permitir la proximidad del RNA a blancos negativamente cargados unidos covalentemente a la fase estacionaria. Después de varios lavados con el mismo buffer, los aptámeros unidos específicamente al blanco eran eluidos con agua debido al cambio de fuerza iónica. Después de cada ronda de partición, los RNA obtenidos son sometidos a un proceso de reverso transcripción y amplificación por RT-PCR.^{55,56}

En contraparte, para la obtención de aptámeros de ssDNA mediante un DNA-SELEX, la amplificación después del primer ciclo de selección se realiza directamente, con la posibilidad de utilizar cebadores modificados para atribuirle a los aptámeros propiedades adicionales en la interacción. La generación de las moléculas de ssDNA se realiza con un método denominado PCR asimétrica, donde los cebadores se utilizan a diferentes concentraciones permitiendo una amplificación geométrica de cadenas sencillas^{61,62}

Dada la naturaleza de cada una de las diferentes variantes en el proceso de partición del método SELEX, se han descrito diversas modificaciones al mismo.⁶³ Por citar algunos, se han desarrollado métodos en los que se utiliza equipamiento especializado como en el SELEX por electroforesis capilar (CE-SELEX) en donde las moléculas unidas al blanco se separan de las no unidas en una solución, lo que elimina el posible fondo que métodos tradicionales pueden tener por el soporte en el que se realiza el procedimiento.^{63,64} Otro ejemplo es SELEX acoplado a microscopia de fuerza atómica (AFM-SELEX), donde se explota la alta resolución de esta técnica para medir la fuerza de interacción entre dos moléculas.⁶⁵

Pese a las ventajas que estas variantes en la partición otorgan, el equipamiento necesario para llevar a cabo estas metodologías es la principal limitante. Además del alto costo que conlleva su aplicación, se requiere de considerable experiencia técnica, lo cual ha producido una baja incidencia en el reporte de aptámeros utilizando estas variantes.^{57,54}

Por estas razones, el método SELEX tradicional que involucra una superficie de inmovilización es el que ha predominado. Se ha podido adoptar el método originalmente descrito a variantes como IP-SELEX donde se utiliza la

precipitación de los complejos blanco-aptámero utilizando anticuerpos o perlas magnéticas o NCF-SELEX en el que se utiliza la filtración a través de membranas de nitrocelulosa donde los complejos blanco-aptámero quedan retenidos.^{66, 67}

Sin embargo, en varios de estos métodos la eficiencia en la adquisición de aptámeros de alta afinidad se ve disminuida con abundante recuperación de moléculas con poca afinidad por el blanco en los primeros ciclos de selección. Por estas razones han surgido alternativas en las que se aumenta la astringencia y se ve disminuida la amplificación de moléculas poco afines. Tal es el caso del NON-SELEX, en el cual no se incluyen pasos de amplificación intermedios.^{68,69}

3.2.1.1 RAPID-SELEX (NON-SELEX)

El método SELEX es altamente probabilístico, lo que ha promovido el surgimiento de metodologías que faciliten la recuperación de aptámeros con alta eficacia y eficiencia. Sin embargo, la implementación de variaciones al SELEX usualmente requiere de equipo especializado que no se encuentra disponible en todos los laboratorios que tengan interés en aislar aptámeros.⁷⁰

Tomando protocolos SELEX combinados con electroforesis capilar, se ha desarrollado el método NON-SELEX el cual consiste en un proceso que no incluye pasos de amplificación intermedios. Omitiendo varios de estos pasos se excluyen los procesos relacionados a errores cuantitativos propios del proceso de amplificación exponencial otorgados por la PCR, tal es el caso de las diferencias en la eficiencia de amplificación que cada una de las secuencias dentro de la poza de oligonucleótidos pueda poseer.⁶⁹

También se ha tomado este racional para la recuperación de aptámeros de RNA en un proceso denominado RAPID-SELEX, con el objetivo de disminuir el tiempo en el aislamiento de aptámeros al reducir los pasos de retrotranscripción y transcripción necesarios para la recuperación exitosa de moléculas de alta afinidad.

Se ha reportado que este proceso maximiza el enriquecimiento de moléculas afines por el blanco en una menor cantidad de tiempo disminuyendo también el requerimiento de reactivos y, por ende, el costo económico para llevar a cabo un SELEX exitoso (figura 9).⁷¹

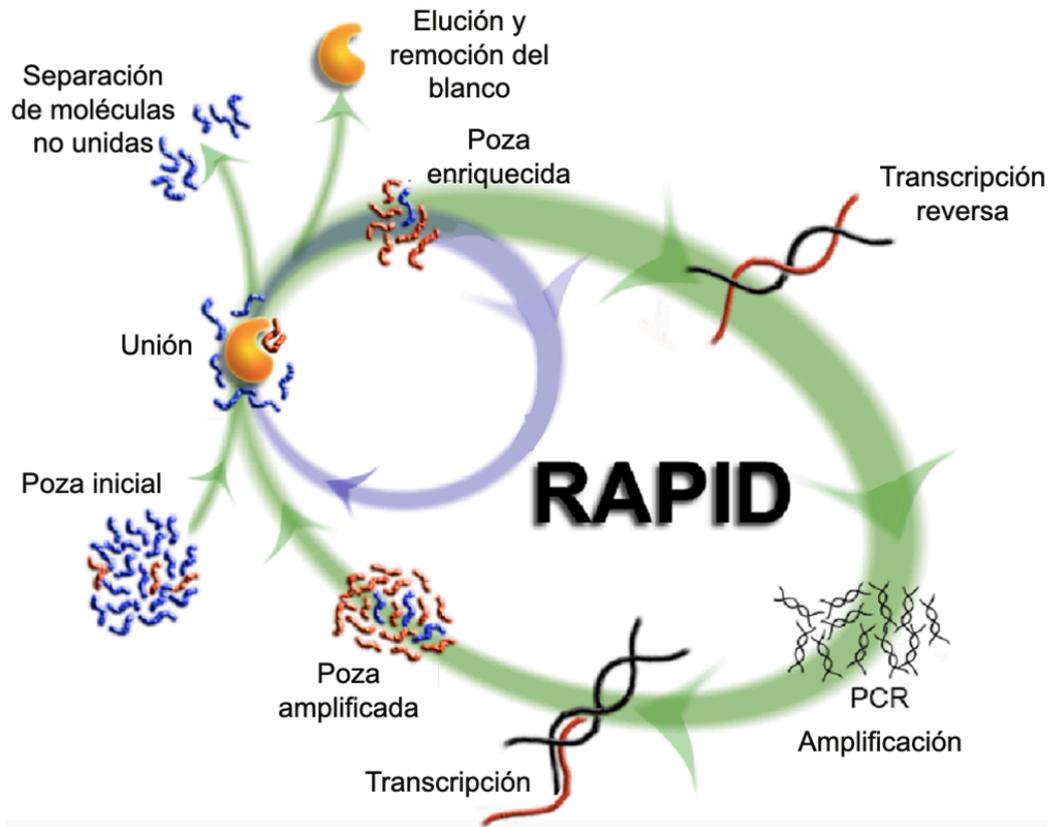


Figura 9. Representación esquemática del proceso NON-SELEX de RNA (RAPID).⁷¹ Un proceso de recuperación rápida de aptámeros de RNA puede obtenerse al omitir pasos de amplificación. El proceso comienza con la poza inicial de RNA, posterior a la primera partición de moléculas afines al blanco, la poza enriquecida entra directamente a otra interacción en un ciclo sin amplificación (lila). Posterior a uno o varios ciclos sin amplificación, la poza enriquecida pasa por una transcripción reversa y amplificación. Una vez amplificadas las secuencias, se vuelve a formar RNA para obtener una poza amplificada completando un ciclo con amplificación (verde).

4. ANTECEDENTES

Recientemente se ha identificado que el progreso en la selección de aptámeros puede ser monitoreado a través del análisis de la curva de intensidad de la fluorescencia y de fusión que resultan de cuantificar las moléculas recuperadas a través de los diferentes ciclos SELEX.⁷² De acuerdo con la Figura 10, esta estrategia podría ayudarnos a evaluar si el método NON-SELEX puede ser aplicado a la recuperación de aptámeros de ssDNA usando un método de partición basado en la filtración a través de membranas de nitrocelulosa.

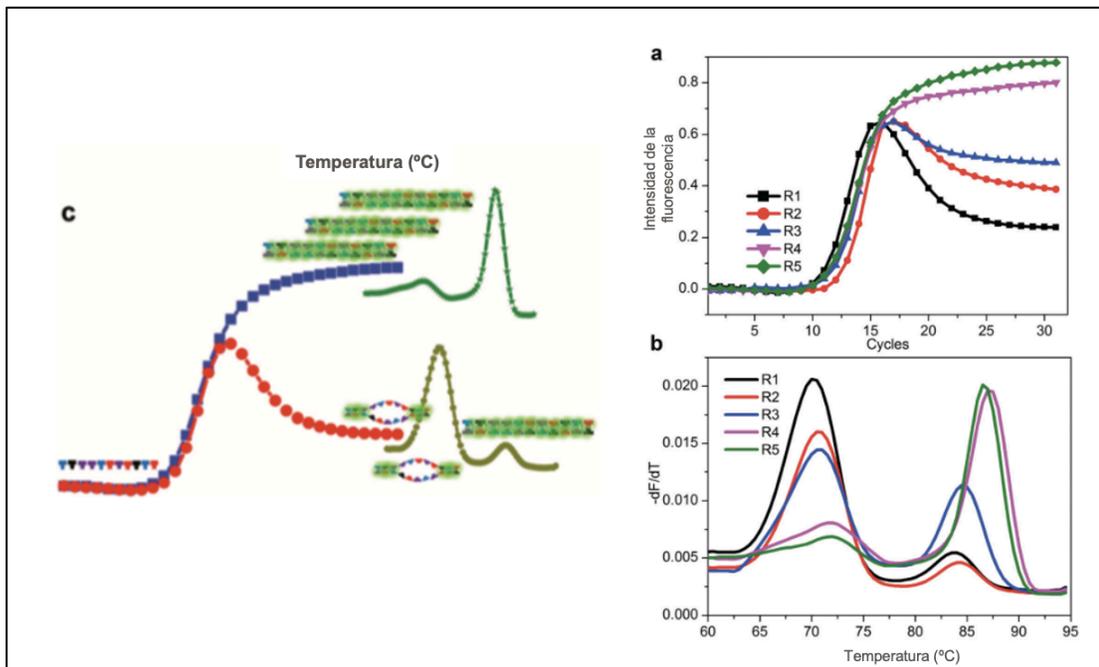


Figura 10. Análisis de la convergencia en la selección de aptámeros mediante qPCR.⁷² a) En la curva de intensidad de la fluorescencia, se observa su decaimiento al cuantificar las moléculas recuperadas en los primeros ciclos de selección. b) En la curva de fusión, tras analizar las secuencias amplificadas en los primeros ciclos de selección, se observa la presencia de dos picos, uno a menor temperatura que corresponde a heterodímeros y el segundo a mayor temperatura correspondiente a la formación de homodímeros. c) Conforme los ciclos SELEX avanzan, la cantidad de heterodímeros disminuye y la abundancia de homodímeros, resultante de una pérdida en la variabilidad de secuencias, recupera el comportamiento sigmoideo de la curva de intensidad de la fluorescencia.

Hasta el momento, se desconoce la capacidad de la proteína LIN28B humana de interactuar con moléculas de ssDNA, solamente se ha reportado la capacidad de sus homólogos en otras especies para mediar esta interacción. En 2011 Mayr y colaboradores demostraron que la unión al CSD de LIN28B a pre-let-7g conlleva una reestructuración en la molécula de RNA, dejando accesible el motivo conservado 5'-GGAG-3' necesario para la unión al ZKD. Antes de llegar a estas conclusiones, también demostraron que este dominio tiene la capacidad de unir hexámeros y heptámeros de timidilato principalmente por interacciones hidrofóbicas o por puentes de hidrógeno.⁷³

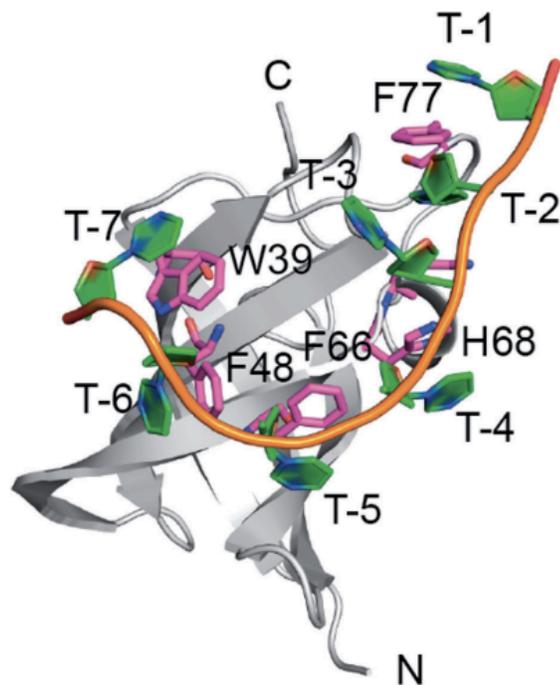


Figura 11. Representación esquemática de la unión del CSD de *Xenopus tropicalis* con un oligonucleótido de timina.⁷³ La relación se lleva a cabo principalmente por interacciones de apilamiento entre los residuos aromáticos de la proteína y el esqueleto de DNA. Se observa en gris la representación del CSD, en rosa se muestran los residuos de aminoácidos involucrados en la interacción. En naranja se muestra el esqueleto del heptámero de timinas y en verde las bases nitrogenadas.

Ambos dominios tienen preferencia a la unión a estructuras G4s compuestas por cuatro guaninas interconectadas a través de uniones tipo Hoogsteen presentes en los mRNA. Se ha propuesto que esta interacción con mRNAs, estimula la traducción, proponiendo un mecanismo de remodelamiento de

estos RNAs posterior a la unión, ya que estas estructuras inusuales pueden intervenir en la acción del ribosoma. Así también demostraron que al impedir el reconocimiento de esta estructura mediante una molécula fluorescente, la unión entre LIN28B y los pre-let-7 no se llevaba a cabo.⁷⁴

En vista de que los dominios CSD en otras moléculas han mostrado interacción con moléculas de DNA, en 2016 Zeng y colaboradores demostraron la unión de LIN28A de células madre embrionarias de ratón con secuencias consenso de DNA. Ellos postularon en su trabajo que LIN28A reconoce las burbujas de transcripción y entonces recluta a la demetilasa de DNA Tet1 para llevar a cabo la demetilación en el cuerpo de los genes reconocidos por LIN28A gracias a secuencias muy parecidas a las requeridas para la unión de los ZKD a los pre-let7.^{75,76}

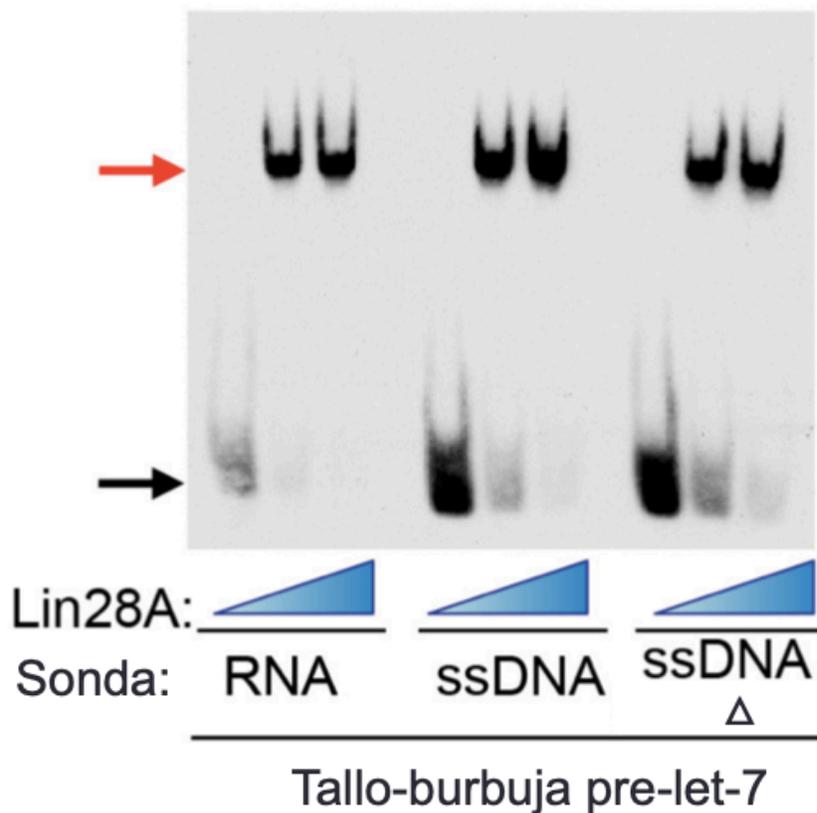


Figura 12. EMSA de LIN28A con la estructura de tallo-burbuja de pre-let-7 de diferente naturaleza.⁷⁶ LIN28A de ratón tiene la capacidad de unirse a la estructura de tallo-burbuja de pre-let-7 de RNA y de ssDNA. La flecha en rojo indica el retardamiento electroforético del complejo proteína-sonda, mientras que la flecha negra señala a la sonda libre. Δ Indica una desnaturalización previa.

Estas observaciones podrían marcar un indicio de la mutua capacidad de la proteína LIN28B de unirse tanto a RNA como a ssDNA. Esta nueva visión de LIN28B como una proteína de unión a RNA y DNA (DRBP), además de las grandes implicaciones en diversos procesos biológicos,⁷⁵ podría facilitar la recuperación de aptámeros de ssDNA contra diversas partes de la proteína LIN28B.

5. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que muchos estudios se han enfocado en entender el papel que LIN28A tiene en diversos procesos biológicos, es preciso entender los mecanismos moleculares por los cuales LIN28B ejerce su papel de una forma más versátil gracias a su intercambio entre núcleo y citoplasma. Actualmente, en el ser humano solo se conoce la interacción de LIN28B con los precursores de let-7 y mRNA, por lo que el análisis de la posible interacción entre LIN28B y moléculas de ssDNA nos ayudaría a obtener información estructural relevante para entender la función biológica de LIN28B.

Obtener una población de aptámeros de ssDNA con afinidad específica contra LIN28B implicaría la recuperación de estructuras capaces de interaccionar con diferentes regiones de LIN28B. Además, estos aptámeros podrían inhibir la interacción con sus moléculas blanco, evitando así su papel oncogénico.

El análisis molecular de la interacción entre LIN28B y una población de aptámeros afines a ella podrá indicarnos si la naturaleza química propia de las moléculas influye en su capacidad de interaccionar con LIN28B, o es una estructuración definida la que rige esta capacidad.

6. HIPÓTESIS

El reconocimiento de los precursores de los miRNA let-7 por las proteínas LIN28 se ha asociado al reconocimiento de las secuencias específicas 5'-(U)GAU-3' y 5'-GGAG-3' en el preE por los dominios CSD y ZKD, respectivamente. Sin embargo, se ha demostrado que existe un reconocimiento diferencial de las LIN28 por las diferentes variantes de let-7 aún en presencia de las secuencias específicas, sugiriendo que existen otros elementos que determinan la especificidad y estabilidad en la interacción pre-let-7:LIN28. Si el reconocimiento de LIN28 por RNA recae en el reconocimiento estructural y no en la naturaleza química de let-7, entonces la estructuración tridimensional de ssDNA en un proceso SELEX permitirá la recuperación de aptámeros de DNA contra LIN28B.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener una población de aptámeros de ssDNA contra LIN28B por el método SELEX.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Producir y purificar la proteína LIN28B recombinante.
2. Recuperar una población de aptámeros por el método SELEX.
3. Identificar el enriquecimiento de moléculas afines por LIN28B en la poza de aptámeros recuperados.

8. METODOLOGÍA

8.1 Diagrama experimental

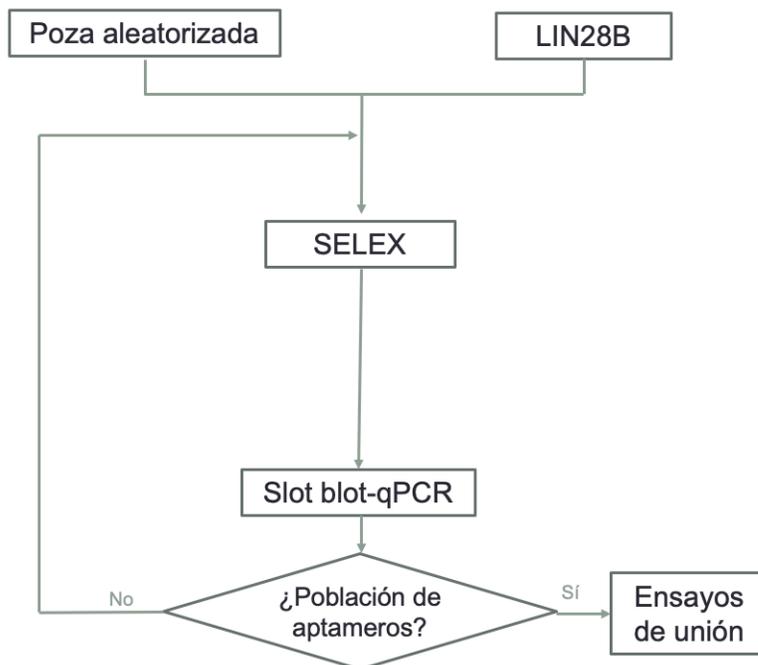


Figura 103. Diagrama experimental. La estrategia experimental consistió en hacer interaccionar la proteína LIN28B recombinante con la poza inicial aleatorizada de ssDNA, de esta mezcla de interacción se llevaron a cabo dos metodologías de selección. Después de cada ciclo de selección las moléculas recuperadas fueron evaluadas por qPCR para determinar si se obtuvo una convergencia en la selección de aptámeros, de no ser así, las moléculas recuperadas entraron a otro ciclo de selección. Una vez recuperada una población de aptámeros, el enriquecimiento de moléculas con afinidad específica contra LIN28B se evaluó mediante ensayos de unión en sándwich.

8.2 Producción de la proteína recombinante LIN28B humana

8.2.1 Inducción de LIN28B

Se transformaron 50 μL de *Escherichia coli* Rosetta (F⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1), químicamente competentes con aproximadamente 500 ng del plásmido p-GST-LIN28B (Figura 14) (construcción realizada en el Laboratorio de Terapia Génica por el M. en C. Franco-Urquijo en su trabajo de maestría en el 2018).⁷⁷ Se incubaron por una hora a 37 °C y 200 rpm con 1 mL de medio SOC (extracto de levadura 0.5% (p/v), triptona 2% (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgSO₄ 20 mM, glucosa 20 mM).

Pasado el tiempo de incubación se plaquearon en agar LB (triptona 1% (p/v), extracto de levadura 1% (p/v) , NaCl 0.5% (p/v), agar 0.5 % p/v) con ampicilina y cloranfenicol (200 mg/μL y 35 mg/μL respectivamente). Se incubaron a 37 °C durante 16 horas. Posteriormente, se picaron colonias aisladas y se dejaron crecer en 100 mL de medio LB (triptona 1% (p/v), extracto de levadura 1% (p/v), NaCl 0.5% (p/v)) con ampicilina y cloranfenicol (100 mg/μL y 35 mg/μL respectivamente) durante 16 horas a 200 rpm.

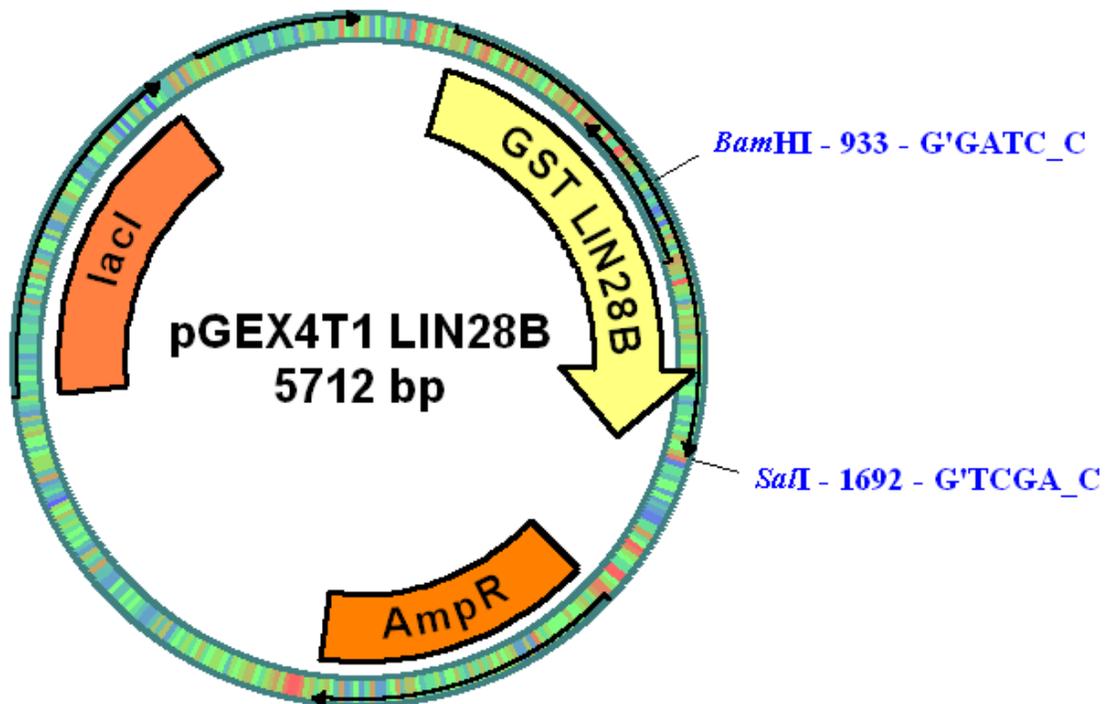


Figura 114. Mapa de la secuencia de p-GST-LIN28B.⁵⁶ El plásmido utilizado contiene a la secuencia de la proteína LIN28B humana unida a GST, así como el promotor lac y un gen de resistencia a ampicilina. Tomado de la tesis de maestría de Franco-Urquijo del 2018.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó una dilución 1:10 con el medio descrito anteriormente y se dejaron crecer 3:30 horas a 37 °C y 200 rpm. Posteriormente, en cada 100 mL de medio se llevó a cabo la inducción con 300 μL de IPTG 0.1 M durante 1:30 horas.

8.2.2 Purificación de la proteína LIN28B recombinante

Los cultivos previamente inducidos se centrifugaron 8 min a 12,000 g y se desechó el sobrenadante. Se añadió 1.5 mL de buffer de lisis de bacterias (NaCl 100mM, Tris 20 mM, EDTA 1 mM, IGEPAL 0.5 %, AEBSF 0.5 mM, 1 tableta de cOmplete (Roche) por cada 200 mL) y se sonicaron (10 pulsos de 10 segundos y 30 segundos de descanso). Posteriormente, se centrifugaron por 3 min a 13,500 rpm y se obtuvo la fase soluble. Por cada 1.5 mL de la fase soluble obtenida se añadieron 150 μ L de perlas de glutatión-agarosa y se incubaron por 1:30 horas a 4 °C en agitación constante. Una vez terminado el tiempo de incubación, se centrifugó por 3 min a 13,500 rpm a 4 °C.

Se retiró el sobrenadante y se agregó 1 mL de PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4) filtrado para lavar las perlas. Se repitió este último paso 10 veces, posteriormente se realizaron 3 lavados más con 1 mL de TNa (Tris-HCl 50 mM, NaCl 120mM, pH 7.4) y se resuspendieron al final las perlas en 100 μ L de TNa. Se añadieron 3 unidades de trombina y se dejaron incubando 12 horas a temperatura ambiente. Se centrifugó por 5 min a 13,500 rpm y se tomó el sobrenadante (sobrenadante 1); tras añadir a las perlas 50 μ l más de TNa se repitió este paso 2 veces más para obtener los sobrenadantes 2 y 3. De estos sobrenadantes, la proteína fue cuantificada utilizando el kit Pierce® BCA Protein Assay (23225, Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

8.2.3 Electroinmunotransferencia

A 1 μ g de muestra se le añadió buffer Laemmli 2X (Tris-HCl 65.8 mM pH 6.8, glicerol 26.3%, SDS 2.1%, β -mercaptoetanol 5%, Azul de Bromofenol 0.01% (p/v)) y se llevó a ebullición durante 5 minutos. Las muestras se cargaron en geles de acrilamida-bisacrilamida 29:1 al 8 % y la electroforesis se llevó a cabo utilizando un gel concentrador al 4% (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 0.4% (p/v)) y un gel separador al 8% (Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 0.4% (p/v)) en buffer TGS (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% (p/v), pH 8.3) durante 1:45 horas a 100 V. El gel se transfirió a una membrana de PVDF (Millipore Corporation,

Bedford MA) empleando buffer Towbin (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, Metanol 20% (v/v), pH 8.3) y un ciclo de turbo blot para mini geles en un Transblot® (Trans-Blot®TurboTMTransfer System Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con leche descremada en polvo al 10% en PBS-Tween (PBS con Tween 0.1% v/v) durante una hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, se incubó con el anticuerpo anti-LIN28B (sc-130802, Lot # K2114, 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 (1:2000 en PBS-Tween 0.1% (v/v)) durante 2 horas. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces con 20 mL de PBS-Tween 0.1% (v/v) y se revelaron con sustrato quimioluminiscente mejorado a base de luminol para la detección de peroxidasa de rábano (Luminata™ Classico EMD Millipore, Billerica MA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y usando un C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR Biosciences Inc., Lincoln NE) con el protocolo estándar (6 minutos de adquisición de imagen).

8.3 Diseño de las pozas aleatorizadas

8.3.1 Obtención de las pozas de ssDNA

El molde de oligonucleótidos fue sintetizado (T4 oligo®) como un 70-mero con la siguiente secuencia: 5' - AGT CCG AGT GAC TCA GTG GC - N30 - GCC TGA CAC AGT CGC TGA GT - 3', donde los 30 nucleótidos centrales presentan posiciones aleatorizadas basadas en la incorporación equimolar de Adenina, Timina, Guanina y Citosina en cada posición.

El producto de esta síntesis fue corrido en un gel de poliacrilamida desnaturizante al 18 % y el producto mayoritario fue extraído cortando la banda correspondiente a la ssDNA de 70 nucleótidos de longitud; la banda fue recortada, extruida y eluida con buffer de elución de ácidos nucleicos (NH₄OOCCH₃ 0.5M, EDTA 1mM, SDS 0.1% (p/v)) para finalmente recuperarla mediante una extracción fenol-cloroformo.

La doble cadena de DNA fue obtenida por amplificación con PCR usando los cebadores sentido (Pfw) 5' - AGT CCG AGT GAC TCA GTG GC - 3' y antisentido (Prv) 5' - ACT CAG CGA CTG TGT CAG GC - 3' con las mismas concentraciones (0.3 μ M).

Para ambos casos, la generación de cadena doble y cadena sencilla, se realizó una emulsión de agua en aceite donde la fase acuosa fue la mezcla de PCR de 200 μ L por cada reacción y estuvo compuesta de la siguiente manera: Taq buffer 1X (Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, Nonidet P40 0.08% (v/v), pH 8.8), MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0.2 mM, para generar ssDNA, cebador Pfw 0.4 μ M y cebador Prv 0.03 μ M, Taq Polimerasa 0.125 U/ μ L y DNA templado 10 ng. Esta fase se preparó en un microtubo y una vez realizada fue mezclada con 500 μ L de una fase oleosa compuesta de 4.5% de Span 80, 0.4% de Tween 80 y 0.05% de Triton X-100 en aceite mineral siguiendo las especificaciones antes reportadas.^{78,79} Esta mezcla fue distribuida en 6 tubos de PCR y para evitar la ruptura de la emulsión así como la contaminación del termociclador, se añadieron 30 μ L de aceite mineral arriba de la emulsión. Finalmente, fueron colocados en un termociclador (2720 Applied Biosystems) para seguir 30 ciclos y generar la cadena doble y 50 ciclos para la cadena sencilla con las siguientes condiciones:

Tabla 1. Condiciones de termociclado para la generación de L30 dsDNA o ssDNA

Termociclado			
Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos	
Desnaturalización	94 °C	30 segundos	30 o 50 ciclos
Alineamiento	58 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C	30 segundos	
Extensión final	72 °C	10 minutos	

Una vez terminado el termociclado la emulsión agua en aceite fue centrifugada a 12,000 g por 5 minutos para remover la fase oléica y de la emulsión concentrada se extrajo la fase acuosa añadiendo 500 µL de diclorometano saturado en agua. Se agitó la mezcla mediante vortex y se centrifugó a 13,500 g por 5 minutos. El dsDNA se precipitó de la fase acuosa con 1/10 parte de acetato de sodio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto por 2 horas a -20 °C para su posterior lavado con etanol al 75%; la dsDNA se resuspendió en agua libre de nucleasas para posteriormente producir ssDNA para un siguiente ciclo de selección.

El ssDNA fue separado del dsDNA corriendo la fase acuosa recuperada en un gel nativo de poliacrilamida al 10% por 3:30 horas a 150 V. Posteriormente, la banda correspondiente al ssDNA fue recortada, extruida y eluida con buffer de elución de ácidos nucleicos (NH₄OOCH₃ 0.5M, EDTA 1mM, SDS 0.1% (p/v)) para finalmente recuperarla mediante una extracción fenol-cloroformo. Tanto el dsDNA como ssDNA fueron cuantificadas en un NanoDrop 2000 y los productos fueron visualizados en un gel nativo de poliacrilamida 19:1 al 6% después de cada purificación.

8.4 Producción *in-vitro* de diferentes variantes de pre-let-7f-1

8.4.1 pre-let-7f-1 (DNA)

El ssDNA homólogo a *pre-let-7f-1* fue sintetizado (T4 oligo[®]) con la siguiente secuencia: 5´ - TCA GAG TGA GGT AGT AGA TTG TAT AGT TGT GGG GTA GTG ATT TTA CCC TGT TCA GGA GAT AAC TAT ACA ATC TAT TGC CTT CCC TGA - 3´. El producto de esta síntesis fue purificado corriéndolo en un gel desnaturizante de poliacrilamida (acrilamida-bis acrilamida 19:1 18% urea 7 M). La banda correspondiente al producto se cortó y colocó en buffer de elución de ácidos nucleicos (NH₄OOCH₃ 0.5 M, EDTA 1 mM, SDS 0.1% (p/v)) incubándolo a 37 °C durante 24 horas. El ssDNA eluido se purificó mediante una extracción fenol/cloroformo seguido de su precipitación con acetato de sodio 3 M en etanol absoluto y dos enjuagues con etanol al 75%.

8.4.2 pre-let-7f-1 (RNA)

Se generó dsDNA del precursor de let-7f-1 con la secuencia del promotor del fago T7 en el extremo 5' mediante una PCR utilizando el cebador sentido con la secuencia: 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT CAG AGT G -3' (Fw-let-7f-1) y cebador antisentido con la secuencia: 5'- TCA GGG AAG GCA ATA GAT TGT ATA G -3' (Rv-let-7f-1). Para ello, se realizó la siguiente mezcla de reacción: dNTPs 2 mM, MgCl₂ 3 mM, Taq buffer 1X (Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, Nonidet P40 0.08% (v/v), pH 8.8), cebador sentido 1.25 mM, cebador antisentido 1.25 mM, 2.5 unidades/μL de Taq polimerasa, 5 nM de oligonucleótido sintético en un volumen de 20 μL con el termociclado descrito en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de termociclado para generar dsDNA de pre-let-7f-1

Termociclado			
Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos	35 ciclos
Desnaturalización	95 °C	15 segundos	
Alineamiento	56 °C	30 segundos	
Extensión	72 °C	30 segundos	
Extensión final	72 °C	5 minutos	

Se cargaron 2 μL de cada producto de PCR en un gel nativo de poliacrilamida 19:1 8% y se corrió durante 1:10 horas a 110 V para visualizar el producto.

A partir del producto de PCR, la transcripción in vitro del precursor se llevó a cabo empleando la siguiente mezcla de reacción: DTT 5 mM, Buffer de transcripción 1X (EP0111, Thermo Scientific), rNTPs 0.42 mM, 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. El producto de la transcripción fue corrido en un gel de poliacrilamida

desnaturalizante al 18 % y el producto mayoritario fue extraído como se menciona anteriormente.

8.4.3 Marcaje terminal del extremo 5'

Para el pre-let-7f-1 (RNA) se procedió inicialmente con la defosforilación de su extremo 5' mediante una reacción que contuvo 1 U de Fosfatasa Alcalina Intestinal de becerro (CIAP- INVITROGEN), Buffer de defosforilación 1X (Tris-HCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8.5), y 1500 ng del RNA en un volumen final de 60 μ L. La reacción se llevó a cabo por 2 horas a 37°C. Posteriormente, se removieron los restos de CIAP mediante una extracción fenol/cloroformo. Finalmente, se precipitó con acetato de sodio 3 M, etanol absoluto y lavados con etanol al 75 %. El RNA defosforilado, se resuspendió en agua libre de nucleasas.

El marcaje del 5' terminal se realizó con 500 ng de RNA defosforilado o 400 ng de ssDNA (según el caso), 25 pmol de [γ -³²P] ATP (3000 Ci/mmol), 2 μ L 10X Kinase Buffer (Tris 500 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 50 mM, pH 7.5) y 1 μ L T4 Polynucleotide Kinase (Thermo scientific) (10 U/ μ l); en un volumen final de 20 μ L. Esta reacción se incubó a 37°C por 12 horas.

Posteriormente, se purificaron las moléculas de ácido nucleico marcadas mediante una extracción fenol/cloroformo, se precipitaron con acetato de amonio 7.5 M y etanol absoluto para su posterior lavado con etanol al 75 % y se resuspendieron en agua libre de nucleasas. Las moléculas marcadas se cuantificaron en un contador de centello líquido LS6500® (Beckman Coulter) y se calculó la molaridad de estos para los ensayos posteriores.

8.5 SELEX

Se llevó a cabo un ciclo de selección positiva incubando por 2 horas a temperatura ambiente un promedio de 10^{14} moléculas de la poza aleatorizada (cálculo realizado utilizando la fórmula: número de moléculas = número de moles * número de Avogadro), considerando el peso molecular de la poza aleatorizada 21606.5 g/mol, de acuerdo a los datos otorgados por el

fabricante) con 250 nM de LIN28B en un volumen final de 50 μ L de buffer de interacción (Tris-HCl 50 mM, NaCl 120 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 5 mM, pH 7.4). Después de la incubación las moléculas no unidas fueron removidas mediante ultrafiltración utilizando *Slot-blot* con una membrana de nitrocelulosa (NC) (GE Healthcare Biosciences) de 0.45 μ m previamente tratada con KOH 0.4 M.⁸⁰

Se hicieron fluir las mezclas de interacción, posteriormente se realizaron 3 lavados con buffer de interacción. La membrana de NC retuvo los complejos DNA-proteína y se recuperaron las secuencias unidas a LIN28B por calentamiento a 90°C por 10 minutos. Después de cada ciclo de selección, los aptámeros recuperados fueron amplificados por PCR y a partir del amplicón se generó ssDNA para una nueva poza de aptámeros de ssDNA y así iniciar un nuevo ciclo de selección.

Después del segundo ciclo de selección positiva de la poza de moléculas recuperadas, se llevó a cabo una selección negativa para eliminar las secuencias que se unen a los componentes del sistema de selección. Se incubó la poza de moléculas con la membrana de nitrocelulosa (0.5 cm²). Después de 20 minutos la membrana fue removida y las moléculas no unidas en el sobrenadante fueron utilizadas para realizar otro ciclo de selección.

Siguiendo este racional se llevaron a cabo diversos ciclos SELEX o NON-SELEX omitiendo pasos de amplificación después de la recuperación de moléculas tal y como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de los ciclos SELEX y NON-SELEX realizados

CICLOS SELEX					
Ciclo	Tipo de selección	Concentración LIN28B	Tiempo de interacción	Secuencias recuperadas	Amplificación
1	Positiva	250 nM	2 horas	Unidas	Sí
2	Positiva	200 nM	1 hora	Unidas	Sí
-	Negativa	0	20 min	No unidas	Sí
3	Positiva	100 nM	1 hora	Unidas	Sí

CICLOS NON-SELEX					
Ciclo	Tipo de selección	Concentración LIN28	Tiempo de interacción	Secuencias recuperadas	Amplificación
1	Positiva	250	2 horas	Unidas	No
2	Positiva	200	1 hora	Unidas	Sí
-	Negativa	N/A	20 min	No unidas	No
3	Positiva	150	1 hora	Unidas	Sí
4	Positiva	150	1 hora	Unidas	No
5	Positiva	100	1 hora	Unidas	Sí
6	Positiva	100	1 hora	Unidas	No
7	Positiva	50	1 hora	Unidas	Sí

8.5.1 Evaluación del método SELEX

8.5.1.1 Slot-blot del ssDNA de las rondas de selección con LIN28B

Después de realizar las mezclas de interacción de la poza inicial y el ssDNA de todas las rondas de selección y recuperar las moléculas afines a LIN28B, las moléculas recuperadas se concentraron a un volumen final de aproximadamente 50 μ L. Una alícuota de 3 μ L fue usada para determinar la cantidad de secuencias retenidas en la membrana de NC mediante qPCR.

8.5.1.2 PCR en tiempo real (qPCR) de las secuencias recuperadas

La mezcla de reacción para la qPCR se preparó añadiendo 0.3 mmol/L de los cebadores Pfw y Prv, 6.25 μ L de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), 1.25 μ L de las secuencias recuperadas y se ajustó el volumen con H₂O libre de nucleasas a 12.5 μ L. Se llevó a cabo el protocolo de termociclado descrito anteriormente para la L30 en un termociclador Rotor Gene RG-3000 (Corbet Research). Se realizó una curva estándar con una secuencia conocida desde 10² hasta 10¹⁴ moléculas previamente validada con NEBNext® Library Quant Kit for Illumina® para que, por interpolación, determinar la cantidad de secuencias recuperadas en cada mezcla de interacción.

8.5.1.3 Evaluación de la convergencia en la selección de aptámeros

Posterior al primer ciclo para el proceso SELEX y el segundo ciclo para el proceso NON-SELEX, las moléculas recuperadas fueron cuantificadas por qPCR. Utilizando la curva de intensidad de la fluorescencia y de fusión a través de los diferentes ciclos de selección, se determinó la convergencia en la obtención de aptámeros en el proceso SELEX y NON-SELEX de acuerdo al método propuesto por Luo y colaboradores en el 2017.⁷²

8.5.1.4 Ensayos de unión

Se marcaron radiactivamente las pozas de ssDNA y la poza inicial usando Thermo Scientific™ T4 PNK (Thermo Fisher) y γ -[³²P]-ATP (Perkin Elmer, Inc., Waltham, MA), siguiendo las instrucciones de fábrica. Posteriormente 50 μ L de mezcla de interacción conteniendo 15 pM de las pozas de ssDNA y diferentes concentraciones de la proteína LIN28B fueron incubadas por una hora a temperatura ambiente en buffer de interacción.

La mezcla de interacción se fluyó a través de un ensayo de Slot blot en sándwich con una membrana de nitrocelulosa (NC) (GE Healthcare Biosciences), donde los complejos aptámero-proteína quedaron retenidos, sobre una membrana de nylon (NY) (GE Healthcare Biosciences) en donde las moléculas de ssDNA sin unir quedaron atrapadas.

La radiactividad residual en las membranas fue cuantificada usando un Typhoon Mode Imager (GE Healthcare Biosciences) obteniendo imágenes que fueron analizadas con el software Image Studio. De acuerdo con estos datos se calcularon los porcentajes de unión que cada poza de ssDNA tuvo por la proteína usando la fórmula: $(\text{Sonda unida} * 100) / (\text{sonda unida} + \text{sonda libre})$.

8.5.1.5 Análisis de datos

El análisis de los datos se llevó a cabo usando el software Prism 8 con modelos de regresión no lineal para un solo sitio de unión específico utilizando la siguiente ecuación: $Y = B_{\text{max}} * X / (K_d + X)$ y el gráfico de Hill para estimar las K_d .⁸¹ Así también se realizó una prueba t de Student para datos relacionados

para determinar si hubo un incremento en la capacidad de unión en la población de aptámeros recuperada.

9. RESULTADOS

9.1 Producción de la proteína LIN28B recombinante

Con la finalidad de optimizar la producción de la proteína LIN28B recombinante, la cepa *humanizada* de *E. coli* Rosetta se transformó con el plásmido pGST-LIN28B.

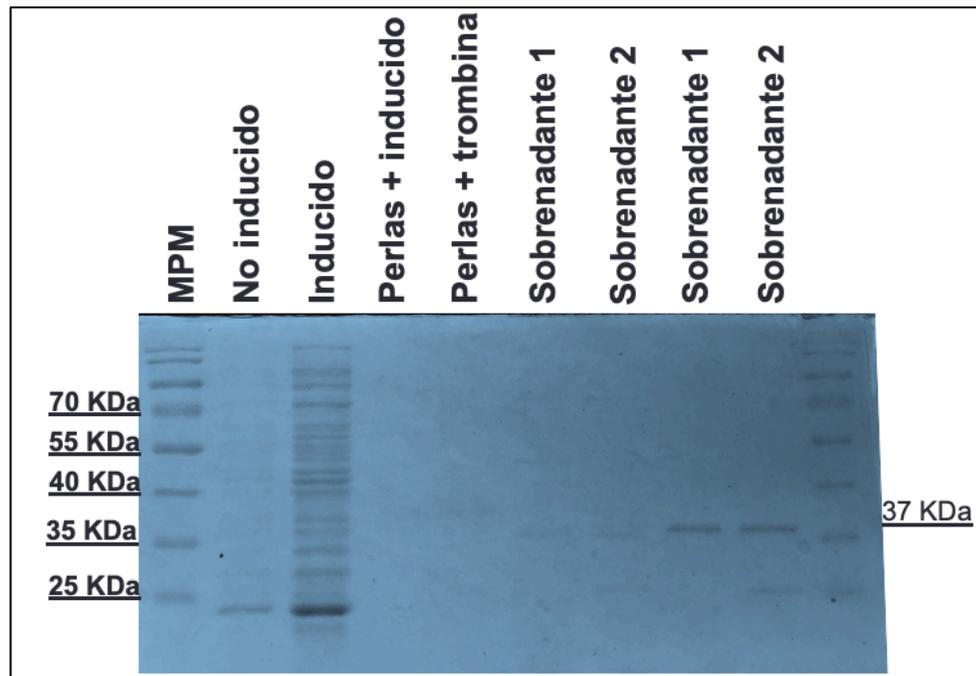


Figura 125. Purificación de la proteína LIN28B recombinante. SDS-PAGE acrilamida-bisacrilamida 29:1 al 10% teñido con azul de Coomassie. En él se observan los extractos proteicos obtenidos del lisado de las bacterias transformadas antes y posterior a la inducción proteica. Seguido, se presenta un carril con una mínima cantidad de perlas glutatión-agarosa antes y posterior a la digestión con trombina. Finalmente, se muestran dos carriles con la proteína purificada usando dos diferentes lotes de trombina. Primer y último carril corresponden al marcador de peso molecular (MPM).

La proteína LIN28B presentó el corrimiento electroforético esperado. Sin embargo, se observó que con un lote de trombina se obtiene una cantidad notoria de un subproducto incompleto de alrededor de 25 KDa, por ello el uso de este lote de trombina fue descartado (Figura 15).

Se pudo concluir que al usar este sistema de expresión es posible recuperar a la proteína LIN28B en un orden de microgramos de proteína en cada extracción. Una vez determinadas las condiciones de recuperación de la proteína LIN28B, se corroboró su purificación mediante electroinmunotransferencia.

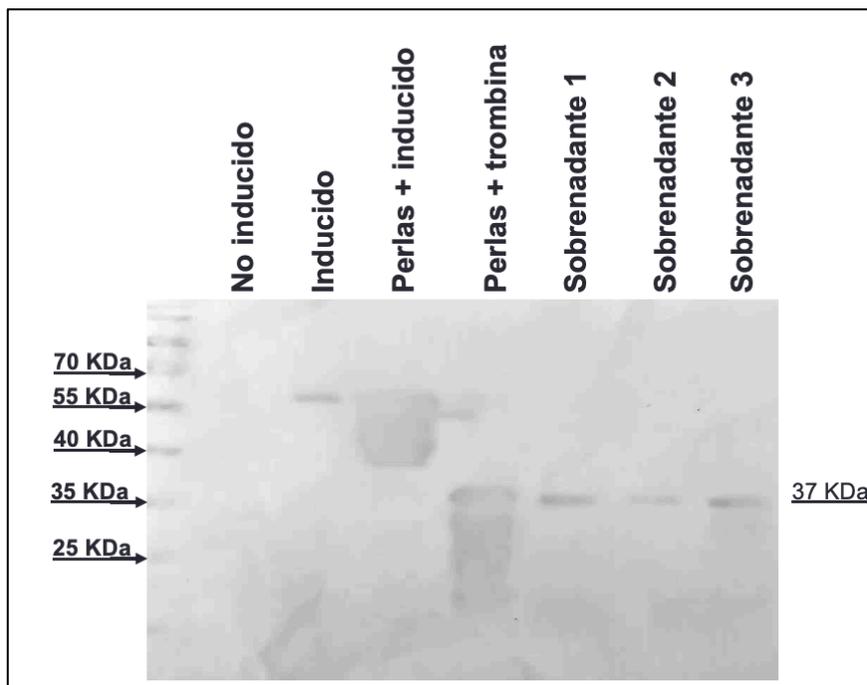


Figura 16. Electroinmunotransferencia contra LIN28B. En esta figura, se observa una banda que corresponde al peso del híbrido GST-LIN28B en el extracto proteico inducido y en las perlas de glutatión-agarosa. Además, se distingue que al añadir trombina se libera a la proteína LIN28B observándose una banda que migra de acuerdo a su patrón esperado y algunos subproductos en las perlas glutatión-agarosa. Finalmente se muestra una banda correspondiente a LIN28B en todos los sobrenadantes obtenidos después de la purificación. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular (MPM). Se señala el corrimiento electroforético esperado a los 37 KDa.

Con el propósito de verificar la identidad de la proteína LIN28B, la proteína purificada y los controles de la inducción proteica fueron transferidos a una membrana de PVDF para su posterior identificación mediante el uso de un anticuerpo policlonal contra LIN28B. En la Figura 16 puede observarse la presencia de la banda del híbrido GST-LIN28B a los 55 KDa una vez que se llevó a cabo la inducción.

Se verificó, además, la unión de la proteína a las perlas glutatión agarosa y la liberación de la proteína de la bandera GST al llevar a cabo la digestión con trombina. En concordancia con los resultados anteriores, se pudo observar en todos los sobrenadantes recuperados después de la digestión con trombina el corrimiento electroforético esperado para la proteína LIN28B purificada.

Es importante destacar que se hicieron varias extracciones proteicas durante el transcurso de este trabajo debido a que se observó que la proteína LIN28B iba perdiendo su capacidad de unir al precursor de let-7f-1 mientras el tiempo iba avanzando (datos no mostrados). Se determinó usar un lote de proteína fresco una vez que el lote anterior hubiese tenido una vida de un mes y medio ya que aproximadamente a partir de este tiempo la proteína perdía la capacidad de unir a su miRNA blanco.

Así, se pudieron determinar las condiciones óptimas para la purificación de la proteína LIN28B recombinante de acuerdo a su identificación con el anticuerpo utilizado y su corrimiento electroforético. Utilizando este sistema de expresión y una vez verificada la identidad y calidad de la proteína LIN28B recombinante, varias purificaciones de la proteína LIN28B fueron necesarias para usarla como blanco en los diversos ciclos SELEX.

9.2 SELEX y NON SELEX

Simultáneamente se iniciaron dos diferentes métodos SELEX para determinar la capacidad de adaptar el método NON-SELEX reportado por Berezovski en el 2006 a la selección de aptámeros de ssDNA por ultrafiltración.⁶⁹

Con el objetivo de verificar la correcta amplificación de las moléculas recuperadas a través de los diferentes procesos de selección, en la Figura 17 se observa el corrimiento del producto de la emPCR y emAPCR, en geles nativos de poliacrilamida identificando el tamaño esperado.

Las moléculas recuperadas a través de los diferentes ciclos de selección fueron amplificadas por emPCR. El peso del producto de esta amplificación concordó con el control de 70 pb de la doble cadena para la poza inicial y no se observó la presencia de subproductos ni la manifestación de productos de contaminación utilizando esta técnica de amplificación.

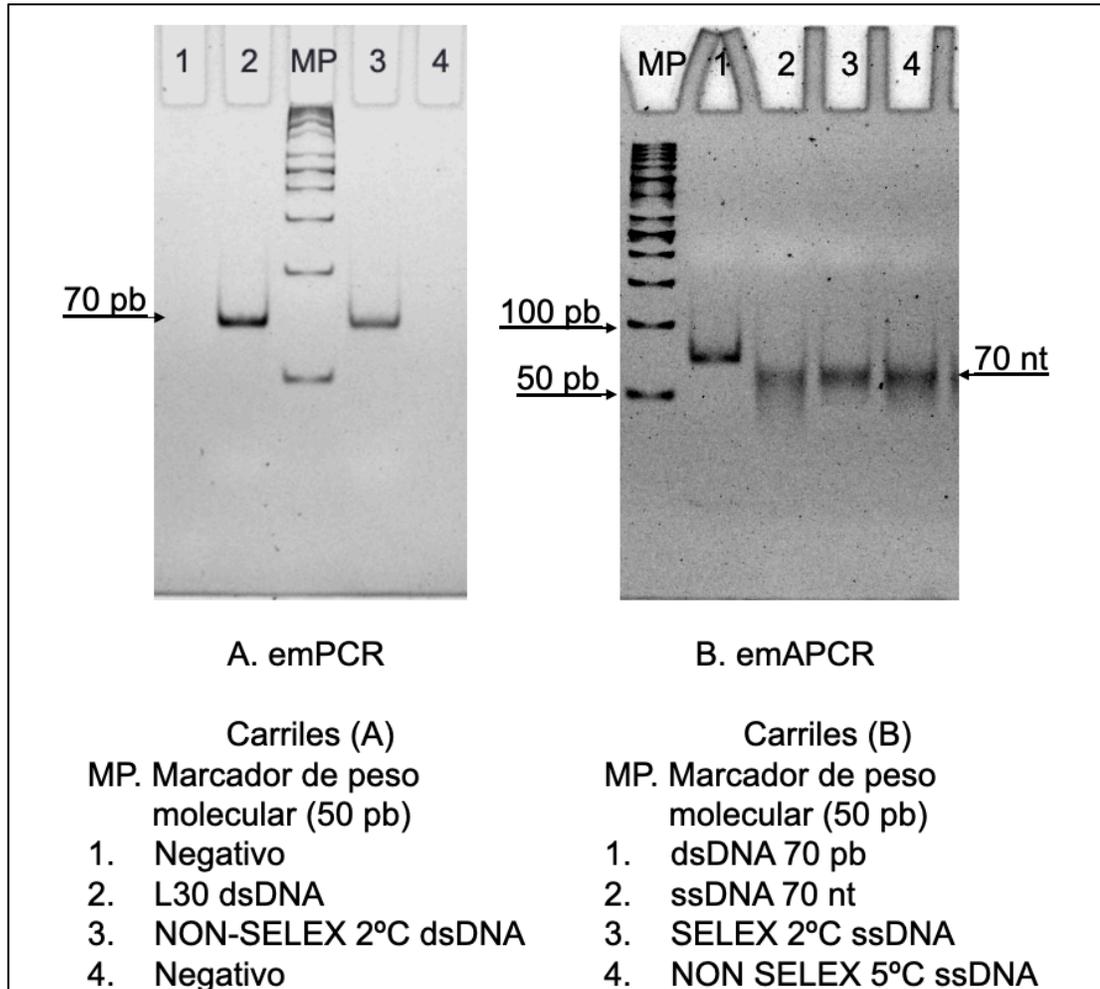


Figura 17. Productos de emPCR y emAPCR de diferentes ciclos SELEX. A. Productos de dsDNA generados por PCR en emulsión después del 2º ciclo de NON-SELEX. B. Productos de ssDNA generados por PCR en emulsión asimétrica del 2º ciclo SELEX y 5º ciclo NON-SELEX. PAGE nativo 19:1 al 8%. Se señalan con flechas los corrimientos electroforéticos de interés. Abajo, se muestra el código correspondiente a los carriles del gel.

10 ng del producto de doble cadena fueron usados para llevar a cabo la generación de ssDNA mediante emAPCR. Se pudo observar la correcta

generación y purificación de ssDNA a través de los diferentes ciclos de selección al correr los productos en geles nativos de poliacrilamida.

Se distinguió el corrimiento a los 70 nt esperado que concordó con el corrimiento de la poza inicial de cadena sencilla. A través de los diferentes ciclos pudimos observar el corrimiento electroforético, tras la generación de ssDNA de las moléculas recuperadas, por debajo del control del producto de doble cadena de 70 pb.

De esta forma se determinó que, usando estas metodologías de amplificación, se obtuvo la generación de ssDNA en concentraciones óptimas para llevar a cabo los diferentes ciclos de selección.

9.2.1 Evaluación en el progreso de la selección de aptámeros

Con el objetivo de monitorear el progreso en la selección de aptámeros, así como para cuantificar las moléculas recuperadas después de cada ciclo de selección, 1.25 μ L de las moléculas recuperadas después de la partición fueron usadas para llevar a cabo la cuantificación absoluta de las secuencias recuperadas. Para ello, se usó una curva estándar de secuencia conocida y con base en ella se determinó la cantidad de moléculas recuperadas.

Se observó una progresión en la recuperación de la fluorescencia conforme los ciclos SELEX y NON-SELEX iban desarrollándose. Se pudo confirmar el comportamiento de decaimiento en la fluorescencia característico de las moléculas recuperadas hasta el 3^{er} ciclo SELEX y 5^o ciclo NON-SELEX si se compara con la fluorescencia que otorgaban los puntos de la curva estándar (Figura 18).

Se pudo apreciar también la menor cantidad de moléculas recuperadas con la metodología NON-SELEX considerando que la fluorescencia empieza en ciclos PCR más tardíos que con los ciclos del método SELEX tradicional. Se mostró así una mejora en la eficiencia de partición con la metodología NON-SELEX que se correlaciona con la mejor capacidad de este método de recuperar solamente moléculas con afinidad específica hacia nuestro blanco.

Se pudo determinar además que la selección negativa es un proceso necesario cuando se utilizan métodos de particionamiento con mucho fondo. Se observó una gran recuperación de moléculas al cuantificar las secuencias unidas a la membrana de NC al llevar a cabo la selección negativa, se identificó la fluorescencia de estas moléculas tras pocos ciclos de amplificación (Figura 18B).

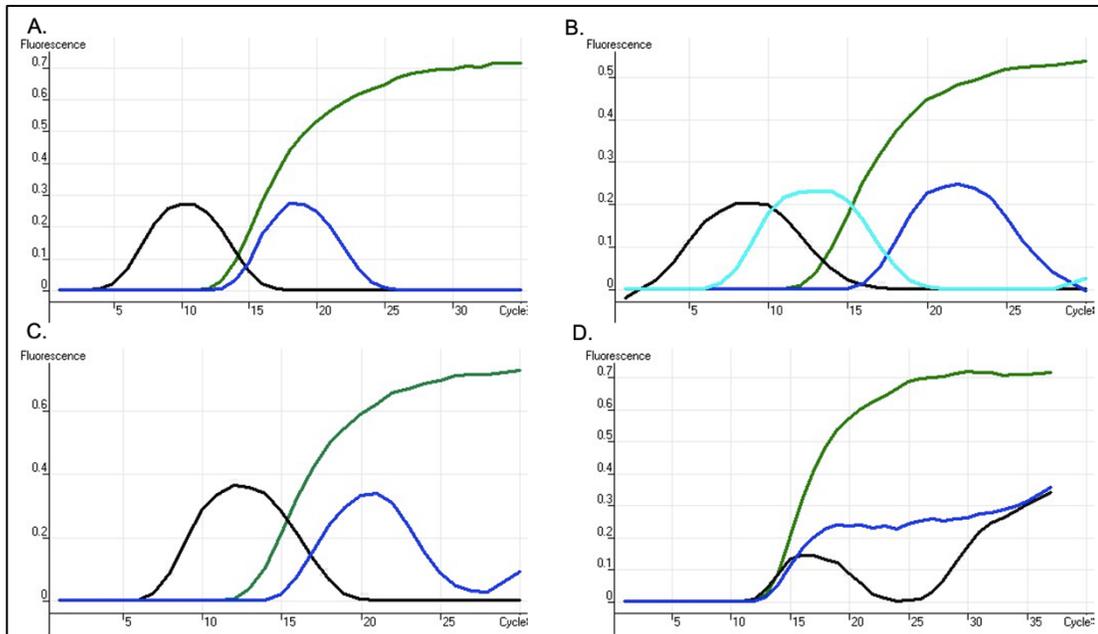


Figura 18. Curvas de intensidad de la fluorescencia a través de los diferentes ciclos SELEX y NON-SELEX. Se observa el comportamiento en la intensidad de la fluorescencia a lo largo de los ciclos de selección con ambas metodologías. A) Decaimiento de la intensidad de la fluorescencia de las moléculas recuperadas después del 1^{er} ciclo SELEX (negro) y 2^o ciclo NON-SELEX (azul). B) Decaimiento en la fluorescencia de las moléculas recuperadas después del 1^{er} ciclo SELEX (negro), selección negativa (cyan) y 3^{er} ciclo NON-SELEX (azul). C) Se conservó el decaimiento de la intensidad de la fluorescencia de las moléculas recuperadas después del 2^o ciclo SELEX (negro) y 5^o ciclo NON-SELEX (azul). D) El decaimiento en la intensidad de la fluorescencia se mantuvo en las moléculas recuperadas después del 3er ciclo SELEX (negro), la intensidad de la fluorescencia se mantuvo después de su incremento para el caso de las moléculas recuperadas después del 7^o ciclo NON SELEX (azul). En todas las gráficas se muestra un punto de la curva estándar como referencia (verde). Eje y, intensidad de la fluorescencia. Eje x, número de ciclos.

Finalmente, se tuvo un primer indicio de convergencia en la selección de aptámeros al observar que tras siete ciclos con la metodología NON-SELEX

la curva de la intensidad de la fluorescencia mostró un aumento llegando a una altura media si se compara con la curva de referencia y que ésta no decaía. Así se determinó una estabilización en el comportamiento de la curva de la intensidad de la fluorescencia para la metodología NON-SELEX sugiriendo una convergencia en la selección de aptámeros de una forma más eficiente que con el método SELEX tradicional.

Estos resultados se correlacionaron con los datos obtenidos del análisis del gráfico de fusión. Con el objetivo de evaluar el progreso en la disminución de la variabilidad de las secuencias se llevó a cabo el análisis de fusión de las moléculas recuperadas después de cada ciclo de selección. Se tomó como comportamiento ideal al gráfico otorgado por un punto en la curva estándar para determinar la presencia del pico de los homodúplex alrededor de los 80°C dentro de la reacción de amplificación.

Se observó que las moléculas recuperadas después del primer ciclo con la metodología SELEX tradicional, presentan una gran diversidad de secuencias. Se determinó la presencia de solamente un pico alrededor de los 70 °C que corresponde a la presencia de los heterodúplex dentro de la reacción (Figura 19A-negro).

Se pudo observar también que las moléculas con afinidad hacia la membrana de NC se dividieron en dos grupos, uno donde hay una gran variabilidad de secuencias y otro, donde debido a que estas moléculas ya pasaron por un proceso de amplificación, empiezan a aparecer moléculas con homología. Se pudo apreciar en el trazo de la gráfica de las moléculas de selección negativa un pico mayoritario correspondiente a los heterodúplex y que el pico correspondiente a los homodúplex empieza a sobresalir (Figura 19A-cyan).

Después del tercer ciclo con la metodología NON-SELEX pudimos observar la presencia de ambos picos, siendo el correspondiente a los heterodúplex, ubicado alrededor de los 70 °C, el más prominente.

En la figura 19B pudimos observar que tras dos ciclos con el método SELEX tradicional no se observó una mejora en cuanto a la reducción de la variabilidad de las secuencias. Se continuó observando la presencia de un solo pico alrededor de los 70 °C. Por su parte, tras cinco ciclos con el método NON-SELEX pudimos vislumbrar una reducción en la cantidad de los heterodúplex, observando un pico a menor altura a los 70 °C y que el pico correspondiente a los homodúplex se mantenía.

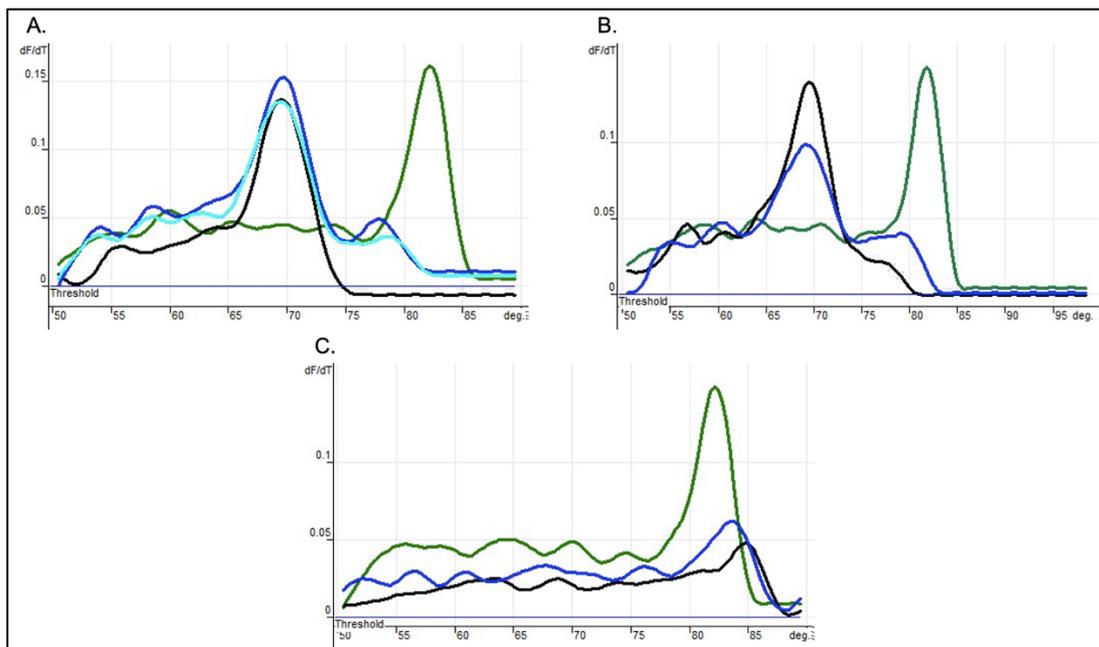


Figura 19. Curvas de análisis de fusión a través de los diferentes ciclos SELEX y NON-SELEX. A) Se observan el gráfico resultante del análisis de fusión de las moléculas recuperadas después del 1^{er} ciclo SELEX (negro), las moléculas recuperadas en la selección negativa (cyan) y de las moléculas recuperadas después del 3^{er} ciclo NON-SELEX (azul). B) Gráfica resultante del análisis de fusión de las moléculas recuperadas después del 2^o ciclo SELEX (negro) y de las moléculas recuperadas después del 5^o ciclo NON-SELEX (azul). C) Gráfica resultante del análisis de fusión de las moléculas recuperadas después del 3^{er} ciclo SELEX (negro) y de las moléculas recuperadas después del 7^o ciclo NON-SELEX (azul). En todas las gráficas se muestra un punto de la curva estándar como referencia (verde).

Sorpresivamente, después del 3er ciclo SELEX, se observó la presencia de solamente un pequeño pico alrededor de los 85 °C. Esto podría enfatizar la presencia de únicamente homodúplex dentro de la reacción de amplificación. Sin embargo, no puede llegarse a esta conclusión debido a que su respectiva

gráfica de intensidad de la fluorescencia sigue presentando el comportamiento característico de decaimiento.

Por su parte la mejora en la curva de fusión para el proceso NON-SELEX es contundente. Después de siete ciclos se observa en la Figura 19C solamente un pico correspondiente a los homodúplex de una altura media si se le compara con la curva de fluorescencia.

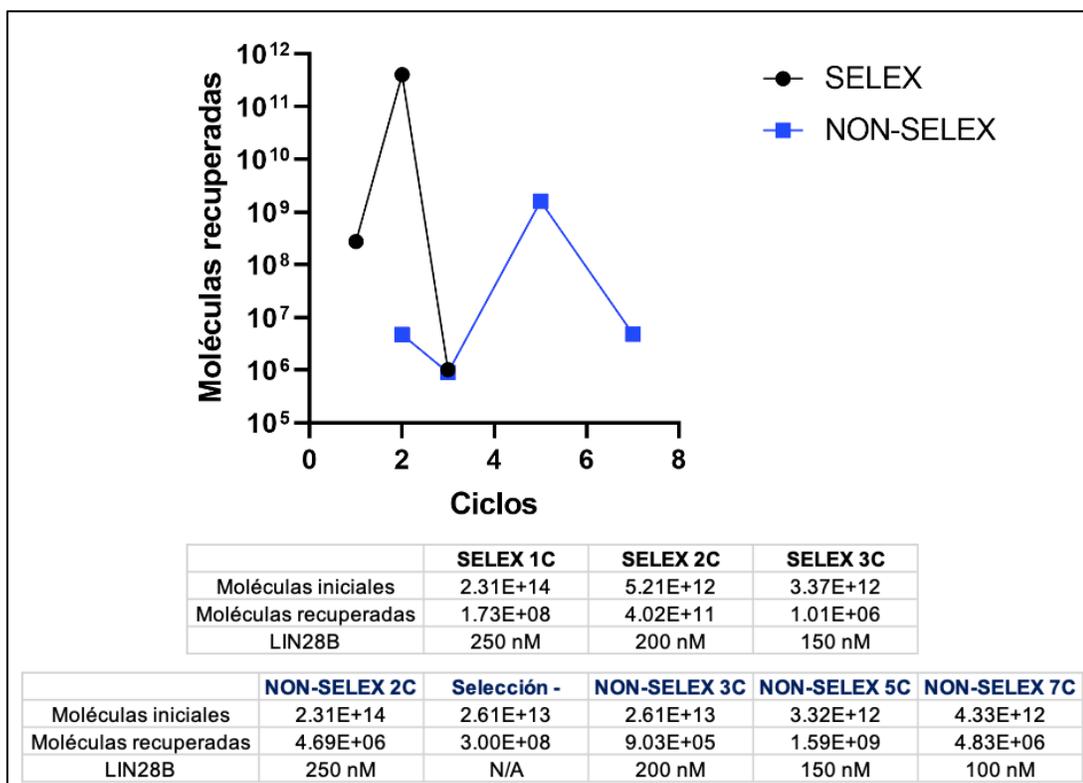


Figura 20. Cuantificación de moléculas recuperadas a través de los ciclos SELEX y NON-SELEX por qPCR. Se observa la cuantificación de moléculas a través de los ciclos SELEX (negro) y NON-SELEX (azul). Abajo, se observan las tablas donde se determina la cantidad de moléculas usadas y recuperadas en cada ciclo de selección, así como la cantidad de proteína usada dentro de la mezcla de interacción en cada ciclo con ambas metodologías. La cuantificación absoluta se determinó al interpolar el valor de Ct resultante de las moléculas recuperadas en la curva estándar.

Así al realizar el análisis de ambas curvas en conjunto, se puede afirmar que después de 7 ciclos NON-SELEX, tanto la curva de amplificación y de fusión para NON-SELEX adquirieron un estado estable. Debido a la clara evolución en la presencia de ambos picos y la concordancia con la curva de amplificación, se indica un cambio en la diversidad de secuencias de ssDNA

recuperadas por el proceso NON-SELEX señalando una posible convergencia de las secuencias de aptámeros recuperados.

Para mejor visualización de los resultados obtenidos de las cuantificaciones realizadas a través de los diferentes ciclos de selección, los resultados de la qPCR se resumieron en un gráfico (Figura 20).

En general, pudo observarse que con el método NON-SELEX se recuperó una menor cantidad de moléculas a través de los diferentes ciclos de selección mostrando así la mayor astringencia en la recuperación de moléculas por este. Se pudo observar además la recuperación de moléculas unidas solamente a la NC por la selección negativa a altos órdenes de magnitud, reforzando su utilidad en estas metodologías.

Así pues, tomando en cuenta el análisis de la cuantificación de moléculas a través de los diferentes ciclos de selección con ambas metodologías, pudo determinarse que con el método NON-SELEX se pudo recuperar una población de aptámeros de ssDNA contra LIN28B en tan solo siete ciclos de selección y que esta recuperación de aptámeros se llevó a cabo de una forma más eficiente que utilizando el método SELEX tradicional.

9.3 Evaluación de la interacción entre LIN28B y la población de aptámeros recuperada

9.3.1 Evaluación de la unión del homólogo de pre-let-7f-1 con naturaleza de DNA por LIN28B

Para tener un primer indicio de la capacidad de LIN28B de unir moléculas de ssDNA, se evaluó la capacidad del homólogo de pre-let-7f-1 de DNA de interaccionar con la proteína LIN28B. De igual, forma para determinar el plegamiento correcto de la proteína se evaluó su capacidad para interaccionar con el pre-let-7f-1, una de las moléculas que se ha reportado como blanco de LIN28B.

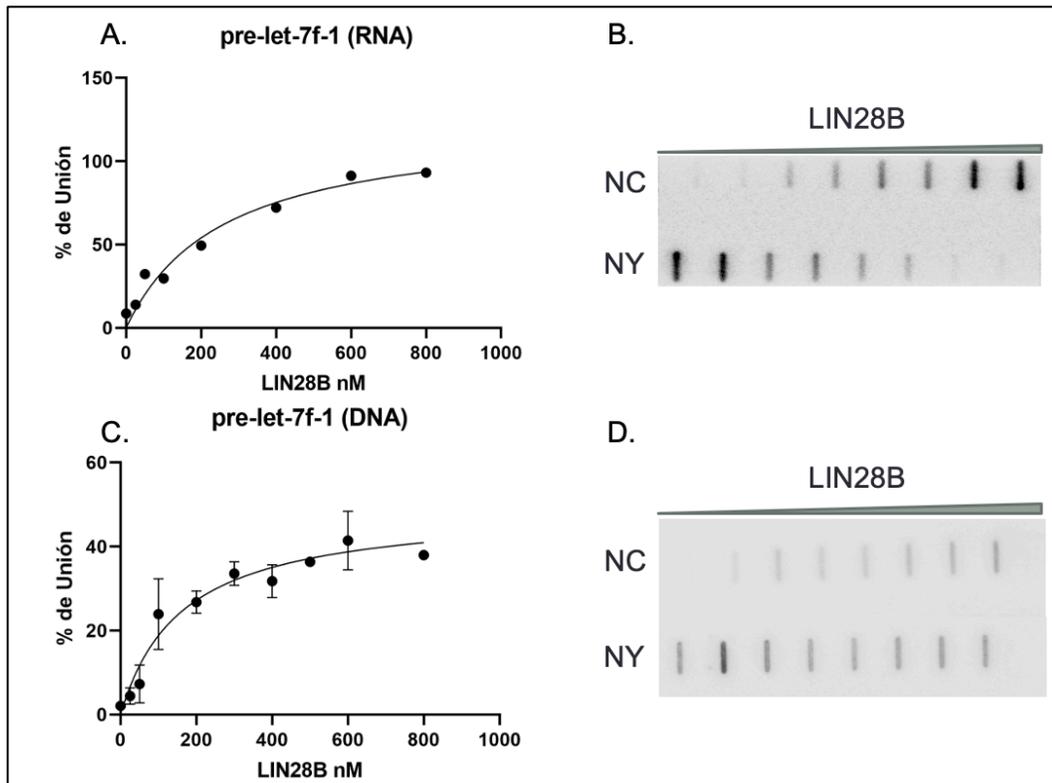


Figura 21. Ensayos de unión entre pre-let-7f-1 y LIN28B para la estimación de la Kd. A. Porcentaje de unión de pre-let-7f-1 en función de la concentración de la proteína LIN28B (Kd estimada= 259.6 nM, $R^2= 0.96$ y $n=1$). B. Ensayos de unión en sándwich entre pre-let-7f-1 y LIN28B empleando 15 pM de pre-let-7f-1 marcado con γ - ^{32}P -ATP y concentraciones crecientes de LIN28B (0 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 600 nM, 800 nM). C. Porcentaje de unión de pre-let-7f-1 (DNA) en función de la concentración de la proteína (Kd estimada= 172.3 nM, $R^2= 0.88$ y $n=3$). D. Ensayos de unión en sándwich entre pre-let-7f-1 (DNA) y LIN28B empleando 15 pM de pre-let-7f-1 (DNA) marcado con γ - ^{32}P -ATP y concentraciones crecientes de LIN28B. Las Kd se estimaron usando un modelo de regresión no lineal para un solo sitio de unión específico utilizando la siguiente ecuación: $Y = B_{\text{max}} * X / (Kd + X)$.

La capacidad de unión se determinó mediante ensayos de unión de doble filtro observándose los complejos retenidos en una membrana de nitrocelulosa y la sonda libre en una membrana de nylon. Calculando el porcentaje de unión para cada punto evaluado: $((\text{Sonda unida} * 100) / (\text{sonda unida} + \text{sonda libre}))$ (Figura 21).

Se pudo determinar el plegamiento correcto de la proteína LIN28B recombinante debido a que presentó la capacidad de unirse al pre-let-7f-1. Se pudo observar cómo se incrementa la cantidad de complejo formado retenido

en la membrana de NC de acuerdo con el incremento de la concentración de la proteína, así también se disminuye la cantidad de sonda libre para ambos tipos de pre-let-7f-1. Para el caso de pre-let-7f-1 de RNA se obtuvo una Kd de 259.6 nM usando un modelo de regresión no lineal para un solo sitio de unión específico (Figura 21 A y B). Este resultado concuerda con datos no publicados utilizando este mismo sistema de ensayos de unión en nuestro laboratorio para la interacción entre estas dos moléculas.

Tomando como referencia esta Kd, pudo determinarse que el homólogo de pre-let-7f-1 de DNA presenta afinidad hacia LIN28B. Se estimó como resultado de los ensayos de unión que esta molécula con naturaleza de DNA presenta una Kd de 172.3 nM usando el mismo modelo de regresión no lineal (Figura 21 C y D).

Así se pudo determinar que LIN28B presenta cierta capacidad de unir moléculas de ssDNA al observar unión del precursor de let-7f-1 de DNA, su unión se presentó en una menor intensidad de acuerdo con su porcentaje máximo de unión si se le compara con el pre-let-7f-1 de RNA. Este resultado, al ser el primer reporte acerca de la capacidad de LIN28B de humano de unir moléculas de ssDNA, no llevó a seguir utilizando esta molécula como control de unión para los posteriores ensayos.

De igual forma, para determinar la posible afinidad intrínseca que la proteína LIN28B podría tener hacia la poza inicial, se determinó mediante ensayos de unión en sándwich, el comportamiento que LIN28B presenta para unir a la poza inicial (Figura 22).

Se pudo observar que la poza inicial no presenta una afinidad específica por LIN28B. Además de tener una mínima señal en la formación de complejo formado en la membrana de nitrocelulosa, a altas concentraciones de la proteína la unión a esta es solo del 20% como máximo.

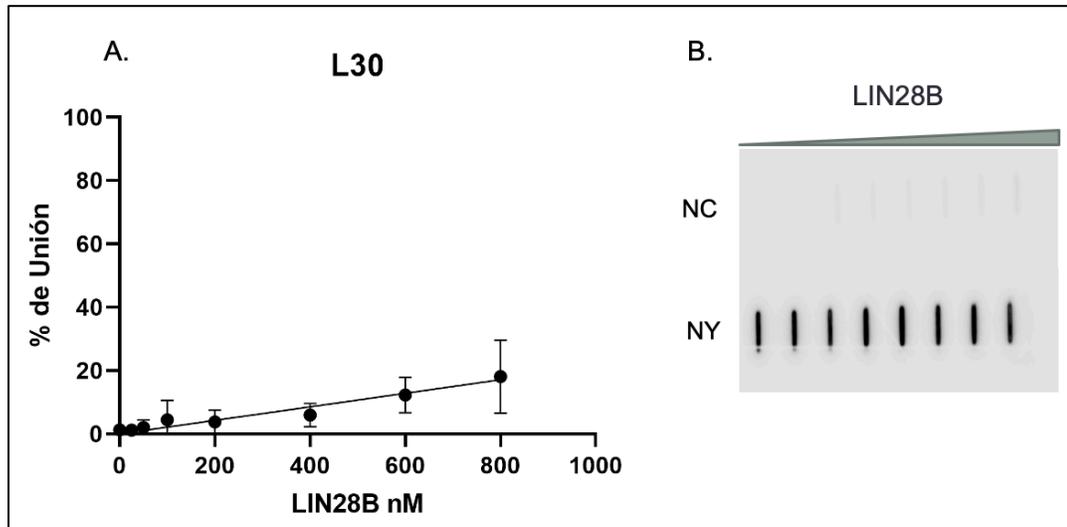


Figura 22. Ensayos de unión entre LIN28B y L30. Se observa el comportamiento de unión entre la poza inicial y la proteína LIN28B. A. Porcentaje de unión de la poza inicial en función de la concentración de la proteína LIN28B (n=3). B. Ensayos de unión en sándwich entre la poza inicial y LIN28B empleando 15 pM de L30 marcado con γ -[32 P]-ATP y concentraciones crecientes de LIN28B (0 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 600nM, 800 nM).

Se mostró también un comportamiento de unión inespecífica de acuerdo con el trazo de su gráfica de unión el cual hace referencia a la gran variabilidad de secuencias presentes en la poza inicial, en donde la mayoría de ellas no tiene la capacidad de unirse específicamente a la proteína LIN28B.

Así, se pudo determinar que la poza inicial usada fue óptima para buscar aptámeros con afinidad específica hacia la proteína LIN28B debido a que se presenta una mínima población de moléculas que pueden unirse a LIN28B, las cuales pueden ser enriquecidas gracias a las metodologías SELEX usadas en esta investigación.

Tomando como referencia estos valores se prosiguió a evaluar el posible enriquecimiento de moléculas con alta afinidad por LIN28B en la poza de aptámeros recuperados después del séptimo ciclo NON-SELEX.

9.3.2 Evaluación del enriquecimiento de aptámeros de alta afinidad por LIN28B

Para tener un análisis previo del posible enriquecimiento de moléculas con alta afinidad por LIN28B en la poza de aptámeros recuperados después del séptimo ciclo NON-SELEX, se evaluó mediante ensayos de unión en sándwich la afinidad que esta poza de aptámeros tiene por LIN28B. Se realizaron ensayos de unión con una cantidad fija de 300 nM de LIN28B y la poza de aptámeros iniciales, así como con la poza de aptámeros recuperada después del séptimo ciclo NON-SELEX.

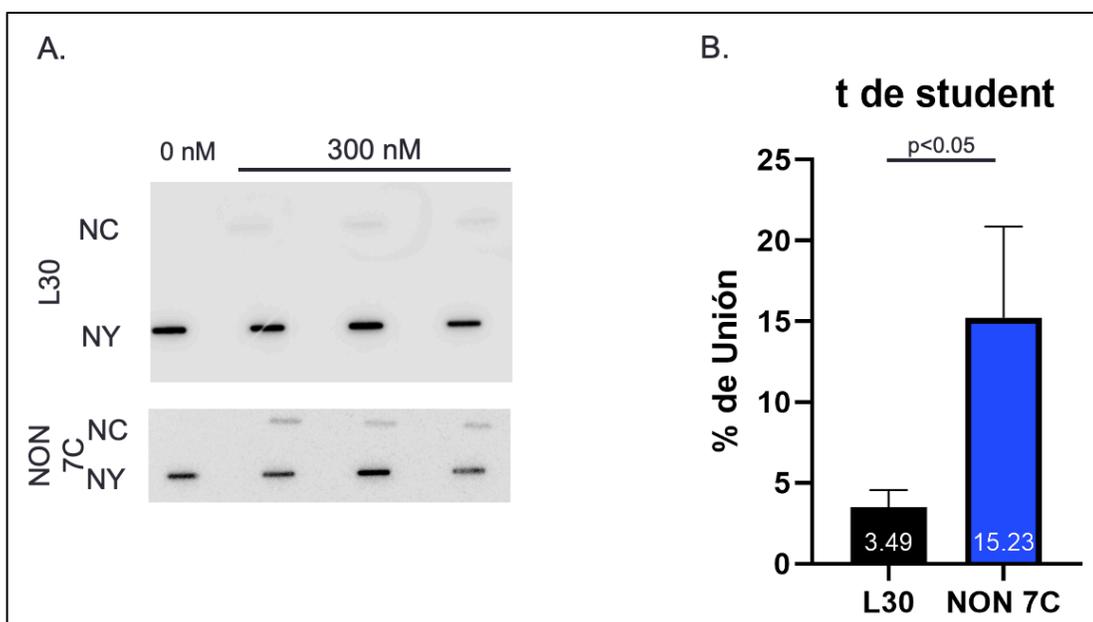


Figura 23. Ensayos de unión entre LIN28B y la poza de aptámeros recuperados después del 7º ciclo NON-SELEX. A. Ensayos de unión en sándwich entre L30 o la poza de aptámeros recuperados después del 7º ciclo NON-SELEX y LIN28B empleando 15 pM de las moléculas marcadas con γ - 32 P]-ATP y 300 nM de LIN28B. B. Prueba t de Student para datos relacionados utilizando los resultados obtenidos en A. El valor dentro de las barras corresponde al promedio de las mediciones. n=3

Puede observarse en la figura 23A un aumento en la capacidad de unirse a la proteína LIN28B en la poza de aptámeros recuperada después del séptimo ciclo NON-SELEX si se le compara con la capacidad que la poza inicial presentó para su interacción con LIN28B. Este incremento de la afinidad se

encontró como estadísticamente significativo utilizando una prueba t de Student para datos relacionados y se pudo observar una unión de cuatro veces más si se le compara con la afinidad que presenta la poza inicial a estas concentraciones de la proteína.

Con estos resultados se refleja el enriquecimiento de moléculas con afinidad específica hacia la proteína LIN28B y se puede predecir que a partir de esta población de moléculas podrían recuperarse aptámeros con gran afinidad hacia LIN28B.

Para corroborar el enriquecimiento de moléculas con afinidad específica hacia la proteína LIN28B en la población de aptámeros recuperada después del séptimo ciclo NON-SELEX se evaluó su capacidad de unión hacia concentraciones crecientes de la proteína LIN28B y se comparó su progreso con respecto a la unión que presentó la poza de aptámeros recuperados después del segundo ciclo NON-SELEX, la poza inicial y el homólogo de pre-let-7f-1 de DNA como control de unión.

Se pudo observar en la Figura 24 que a concentraciones micromolares de la proteína, la poza inicial tiene la capacidad de unirse en su totalidad a LIN28B. Sin embargo, el comportamiento que ofreció su gráfico de unión hace referencia a una unión inespecífica que se correlaciona con los datos obtenidos anteriormente y con la nula capacidad de poder estimar una K_d con el modelo utilizado.

Por su parte la poza de aptámeros recuperada después del segundo ciclo NON-SELEX empezó a adquirir un comportamiento hiperbólico característico de la unión específica, sin embargo, debido a los pocos ciclos de selección que presenta esta poza de aptámeros, su capacidad de unión a la proteína LIN28B aún es muy reducida, observando que no llega a unirse a más del 20%.

Finalmente, en la poza de aptámeros recuperada después del séptimo ciclo NON-SELEX se pudo observar un incremento en su máxima capacidad de unión a la proteína LIN28B llegando a ser del 60%, este incremento se correlaciona con el enriquecimiento de moléculas afines hacia la proteína LIN28B a lo largo de los ciclos NON-SELEX. Además, se observa un cambio en el comportamiento de su gráfico de unión que pasa de ser hiperbólico para el caso de la molécula control de unión (pre-let-7f-1 de DNA) a adoptar una forma sigmoidea que podría hablar de una posible cooperatividad entre las moléculas recuperadas en este pool para unirse con la proteína LIN28B.

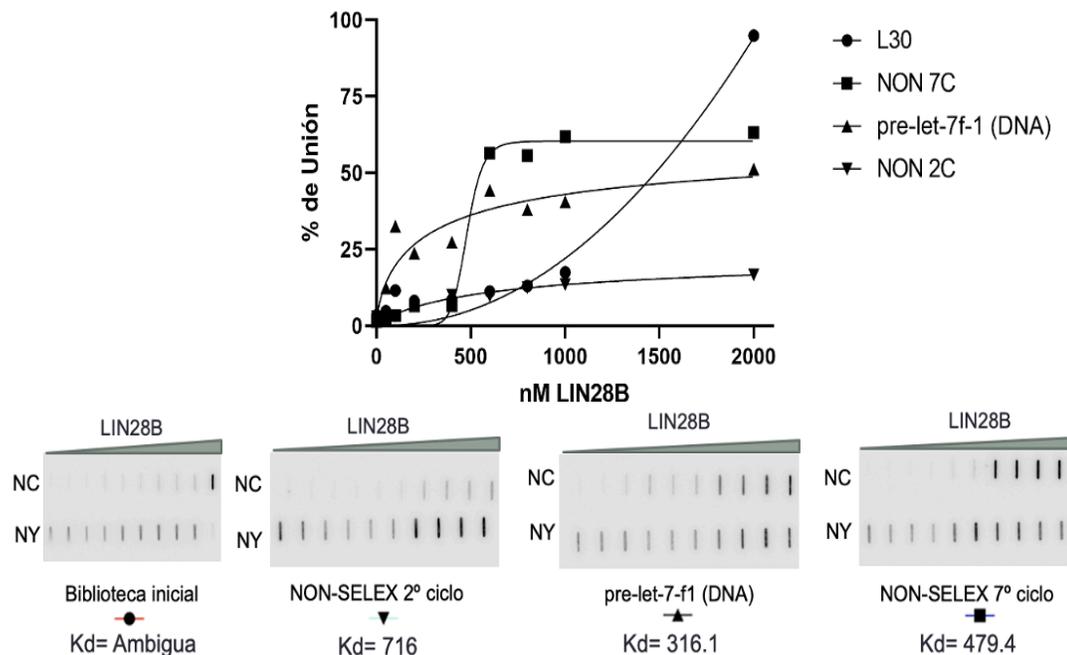


Figura 24. Evolución de los aptámeros contra LIN28B a través de diferentes ciclos NON-SELEX. Se observan las curvas resultantes de los ensayos de unión en sándwich entre la poza inicial (círculo), la poza de aptámeros recuperados después del segundo ciclo NON-SELEX (triángulo invertido), el pre-let-7f-1 de DNA (triángulo) y población de aptámeros recuperados después del séptimo ciclo NON-SELEX (cuadrado) contra concentraciones crecientes de la proteína LIN28B (0 nM, 25nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 600 nM, 800 nM, 1000nM, 2000 nM) empleando 15 pM de sonda marcada con γ -[32 P]-ATP. Abajo, se muestran los ensayos de unión en sándwich. La estimación de las Kd se realizó usando un modelo de regresión no lineal para un solo sitio de unión específico utilizando la siguiente ecuación: $Y = B_{max} * X / (Kd + X)$ y el gráfico de Hill. $n=1$.

Se pudo observar además que la K_d estimada mejoró del segundo ciclo al séptimo ciclo con la metodología NON-SELEX y que esta se acercó a la K_d estimada para el homólogo del pre-let-7f-1 de DNA.

Se pudo concluir así, que con la metodología NON-SELEX, se obtuvo un enriquecimiento de moléculas con afinidad específica para la proteína LIN28B conforme los ciclos de selección iban progresando, determinando que, de esta población, es posible que se recuperen aptámeros con alta afinidad por la proteína LIN28B.

10. DISCUSIÓN

LIN28B es una proteína oncogénica que regula primariamente a los precursores de los miRNA de la familia let-7 y puede promover la traducción de ciertos mRNA.³⁸ Se ha identificado que el impedimento de la unión de sus dominios CSD y ZKD con sus moléculas blanco disminuyen su capacidad oncogénica.⁵³

A pesar de la vasta información que se tiene acerca de la función que su parólogo LIN28A tiene en diversos procesos biológicos, hace falta entender los mecanismos moleculares por los cuales LIN28B ejerce su papel de una forma más versátil gracias a su intercambio entre núcleo y citoplasma.^{27,82} Actualmente, en el humano sólo se conoce la interacción de LIN28B con los precursores de let-7 y algunos mRNA y su capacidad de unir moléculas de DNA queda desconocida.^{32,83,84}

Además de la unión por complementariedad de bases, moléculas de ácido nucleico en cadena sencilla pueden formar múltiples estructuras secundarias, como estructuras de tallo y burbuja, pseudonudos, uniones tipo Holliday, entre otras. Esta dinámica en su estructura le confiere la capacidad de adoptar formas tridimensionales complejas y únicas.^{85,86}

Como se ha descrito, para la interacción entre LIN28 y los precursores de la familia del miRNA let-7, la presencia de una estructura tridimensional esencial de tallo-burbuja conservada en el loop terminal del precursor podría ser más importante para el reconocimiento que la conservación de la secuencia entre los miembros de la familia de los precursores.⁸⁷

Tomando en cuenta que moléculas de ssDNA también tienen la capacidad de formar este tipo de estructuras y las ventajas que presenta la recuperación de aptámeros de naturaleza de ssDNA.^{3,88} Se consideró como probable la recuperación de estructuras de ssDNA complejas capaces de interactuar con diversas regiones de la proteína LIN28B. Por ello, en el presente trabajo se realizó un análisis de la posible interacción entre LIN28B y moléculas de ssDNA mediante la implementación del método SELEX y ensayos de unión.

Además, debido a que la predicción in-silico del homólogo de ssDNA del pre-let-7f-1 otorgaba una forma similar, con la adquisición de una estructura de tallo burbuja característica para los pre-miRNA que interaccionan con LIN28B. Para tener un primer indicio de la capacidad que LIN28B pudiera tener de unir moléculas de ssDNA se sintetizó al pre-let-7f-1 de esta naturaleza.

Se pudo observar que el pre-let-7f-1 de naturaleza de DNA tiene la capacidad de unirse específicamente a la proteína LIN28B recombinante de acuerdo al comportamiento que la curva de unión presentó en estos experimentos.

Sin embargo, pudo apreciarse que esta molécula no llega a unirse a un 100% aún en concentraciones micromolares. Este hecho puede deberse al cambio

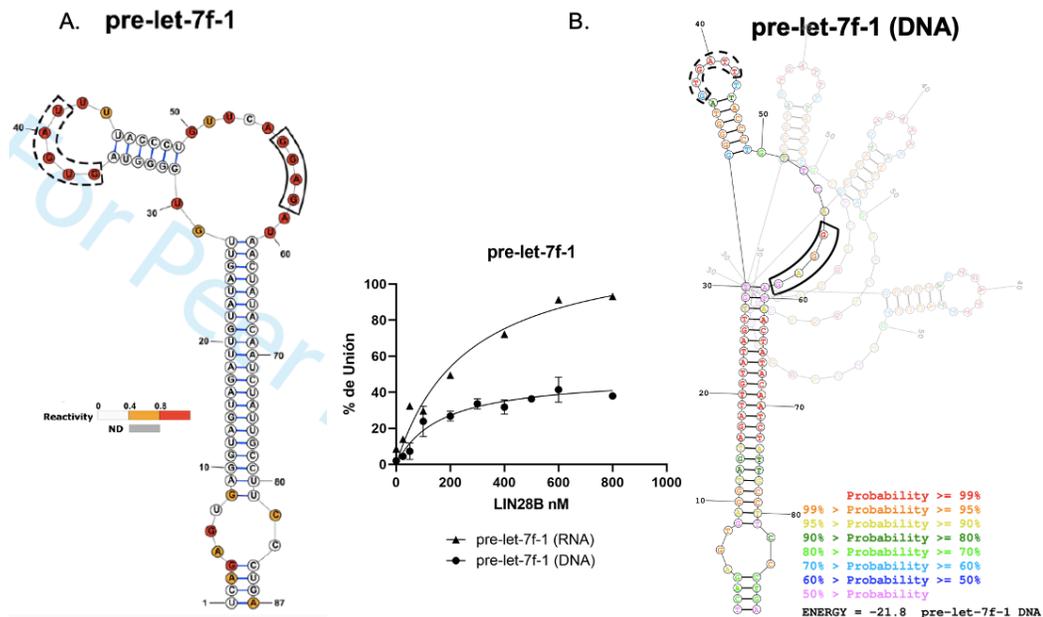


Figura 25. Diferencia estructural entre pre-let-7f-1 de RNA y DNA. A. Modelo de la estructura secundaria del pre-let-7f-1 obtenido por SHAPE (Rangel-Guerrero y colaboradores, 2020).⁶³ B. Predicción estructural mediante el software RNA-Structure (Matews Lab) del pre-let-7f-1 de DNA. La marca de agua muestra la posible indisposición de los motivos conservados. Se muestra el código de reactividad o probabilidad según sea el caso, los motivos de unión al CSD y ZKD se muestran dentro de cajas con líneas punteadas o completas, respectivamente.

en la estructura ideal del pre-let-7f-1 para su interacción con LIN28B que provoca el cambio de bases de RNA a DNA (Figura 25).

Este cambio de Timina en vez de Uracilo pudo afectar en primera instancia al motivo conservado 5'-UGAU-3' de unión al CSD de LIN28B. Este suceso

podría desencadenar una disminución en la afinidad de este homólogo con respecto al pre-let-7f-1 de naturaleza de RNA que como reportaron Ustianenko y colaboradores en el 2018, indicaría una disminución en la capacidad de LIN28B de unirse a precursores de esta familia que a pesar de tener el motivo de unión a los ZKD, la ausencia de este dominio desencadena una menor capacidad de unirse a LIN28 comparándola con aquellos precursores que mantienen el motivo 5'-UGAU-3' disponible.¹⁴

Además, de acuerdo a resultados no publicados de Rangel-Guerrero y colaboradores, donde se determinó la estructura del pre-let-7f-1 mediante SHAPE (Acilación Selectiva del 2'-Hidroxil analizada por Primer Extension), los uracilos presentes y cerca de los motivos conservados ejercen un papel importante en la estructura que este precursor presenta.⁸⁹

Tomando en cuenta lo anterior, es posible que el cambio de estos Uracilos debido a la naturaleza vibrante de las moléculas en ciertos momentos indisponga a ambos motivos de unión a LIN28B. De esta forma se presentarían dos momentos al equilibrio: uno en donde el motivo de unión al ZKD se encuentra disponible en el pre-let-7f-1 de DNA y otro en el que no. Por ello, aunque se tengan concentraciones saturantes de LIN28B solo se obtuvo un máximo de 50 % de unión.

A pesar de este resultado, este es el primer reporte que se tiene sobre moléculas de ssDNA que pueden interaccionar de alguna forma con LIN28B de humano. Estas observaciones podrían marcar un indicio de la mutua capacidad de la proteína LIN28B de humano de unirse tanto a RNA o DNA, desencadenando una nueva visión de la facultad de LIN28B de modular la expresión de genes, tal y como ya se ha propuesto para LIN28A de ratón.⁷⁶

Rescatando la posibilidad de una estructuración cercana a la ideal por parte del homólogo de pre-let-7f-1 de DNA para interaccionar con LIN28B, se determinó, que una buena referencia para este proyecto sería encontrar aptámeros que se unan con mayor afinidad que este homólogo.

En este trabajo se estableció una variante del método SELEX tradicional denominado NON-SELEX. Este método otorgó las ventajas de una

recuperación en tan solo siete ciclos de selección, debido a la disminución en los pasos de amplificación requeridos para llevar a cabo todos los ciclos, lo cual redujo el sesgo que la PCR le atribuye al método SELEX tradicional.⁹⁰

El tiempo que tomó recuperar una población de aptámeros con enriquecimiento de secuencias afines usando esta metodología, es considerablemente bajo, se ha reportado la necesidad de hasta 20 ciclos con el método SELEX tradicional para obtener un proceso SELEX exitoso.⁹¹ Por ello se estableció una mejor eficiencia de este sobre el método SELEX tradicional usando el método de partición con el que contábamos en el laboratorio.

Estos resultados favorecen la decisión de empezar a usar el método NON-SELEX utilizando métodos de partición de fácil acceso que implican la inmovilización del blanco, como el utilizado en este trabajo. Hasta el momento, el método NON-SELEX solo se había descrito para la recuperación de aptámeros de RNA y para el caso de aptámeros de DNA se requería el uso de electroforesis capilar.^{71,69} Así esta metodología podrá utilizarse para el aislamiento de aptámeros contra otros blancos de interés de una forma sencilla en nuestro laboratorio.

La eficiencia de este método se confirmó al observar un incremento en las secuencias capaces de interactuar con la proteína LIN28B. El enriquecimiento de las moléculas con afinidad específica hacia la proteína LIN28B con la metodología NON-SELEX se corroboró identificando un aumento en la máxima capacidad de unión a LIN28B por la población de aptámeros recuperada después del séptimo ciclo NON-SELEX si se le compara con la poza de moléculas iniciales.

Además, se verificó que el monitoreo de la convergencia en la selección de aptámeros usando el análisis de la curva de fluorescencia y de fusión, tal y como se había reportado antes, esta estrategia es una buena herramienta para el método SELEX e indicó la pérdida de variabilidad de secuencias con un incremento en la unión específica de la poza de aptámeros recuperados. Tal

y como se ha reportado, incrementos parecidos en el porcentaje de retención de moléculas han conllevado a la recuperación exitosa de aptámeros.⁹²

Por estas razones, se podría concluir que se recuperaron aptámeros con afinidad específica por la proteína LIN28B. El enriquecimiento de estas moléculas tendrá que verificarse mediante secuenciación de próxima generación, la cual nos permitirá secuenciar cada una de las moléculas de ssDNA contenidas en las pozas recuperadas a través de los diferentes ciclos de selección. Este proceso nos permitirá agruparlas con base en la homología de sus secuencias mediante el uso algoritmos bioinformáticos para determinar el enriquecimiento de grupos de moléculas con secuencias y motivos estructurales similares.^{93,94}

Una vez verificado el enriquecimiento y evaluada la especificidad de los aptámeros seleccionados, sucesos planteados como perspectivas de este proyecto, se podrá concluir que el método NON-SELEX empleado para la recuperación de aptámeros de ssDNA contra LIN28B fue exitoso.

Por el momento, el aumento en la capacidad de unirse de la población de aptámeros recuperados después del séptimo ciclo NON-SELEX nos sugiere la confirmación de la hipótesis de que la estructuración tridimensional de las moléculas de ssDNA permite la interacción con diversas regiones de la proteína LIN28B.

El enriquecimiento de moléculas con afinidad hacia la proteína podría sugerirnos la recuperación de estructuras tridimensionales óptimas que permitan la interacción con los dominios conservados de la proteína. El aumento en la máxima capacidad de unión de la poza de aptámeros recuperados después del séptimo ciclo NON-SELEX en comparación con la máxima capacidad de unión del homólogo de ssDNA de pre-let-7f-1, refiere un refinamiento en la estructuración tridimensional de las moléculas de ssDNA para poder interaccionar con la proteína LIN28B.

Finalmente, estos resultados amplían la visión de la capacidad de LIN28B de modular la expresión de genes por unión directa al DNA si es que en las burbujas de transcripción se pueden identificar además de las secuencias

consenso, como ya se había reportado, también a estructuras tridimensionales que permitan esta interacción.⁷⁶ Debido a los objetivos de este proyecto, esta última sugerencia puede plantearse como perspectivas a evaluar en un proyecto alternativo.

11. CONCLUSIONES

- La proteína LIN28B tiene la capacidad de unir moléculas de ssDNA basado en los resultados obtenidos con el homólogo del pre-let-7f-1 de DNA.
- La recuperación de una población de aptámeros contra LIN28B puede llevarse en una menor cantidad de tiempo utilizando el proceso NON-SELEX en vez del método SELEX tradicional.
- Se sugiere la obtención de una población de aptámeros con afinidad específica por diferentes partes de la proteína LIN28B después del séptimo ciclo NON-SELEX confirmando la hipótesis de que la estructuración tridimensional de las moléculas de ssDNA permite la interacción con diversas regiones de la proteína LIN28B.
- Se sugiere la identificación de los aptámeros con mayor afinidad recuperados en este pool mediante secuenciación de próxima generación y ensayos de unión de varias candidatas para posteriormente identificar si alguno de los aptámeros recuperados puede inhibir la interacción entre LIN28B y su blanco natural.

12. PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos y con el objetivo de sustentar aún más las observaciones realizadas, así como dar continuidad, resulta importante contemplar las siguientes perspectivas:

- Verificar mediante ensayos de competencia la diferencia de afinidad entre los precursores de diferente naturaleza.
- Identificar mediante ensayos de footprinting los sitios de unión del pre-let-7f-1 de DNA hacia la proteína LIN28B.
- Verificar por triplicado los resultados de la gráfica “Evolución de aptámeros a través de los ciclos NON-SELEX”.
- Identificar los aptámeros con mayor afinidad recuperados en este pool mediante secuenciación de próxima generación y ensayos de unión.
- Identificar si alguno de los aptámeros recuperados puede inhibir la interacción entre LIN28B y los precursores de let-7 en un ambiente oncogénico.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Balzeau J, Menezes MR, Cao S, Hagan JP. The LIN28/let-7 Pathway in Cancer. *Front Genet.* 2017;8:31. doi:10.3389/fgene.2017.00031
2. Roos M, Pradère U, Ngondo RP, et al. A Small-Molecule Inhibitor of Lin28. *ACS Chem Biol.* 2016;11(10):2773-2781. doi:10.1021/acscchembio.6b00232
3. Wang T, Chen C, Larcher LM, Barrero RA, Veedu RN. Three decades of nucleic acid aptamer technologies: Lessons learned, progress and opportunities on aptamer development. *Biotechnol Adv.* 2019;37(1):28-50. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.001
4. Britton C, Laing R, Devaney E. Small RNAs in parasitic nematodes-forms and functions. *Parasitology.* 2019. doi:10.1017/S0031182019001689
5. Armakola M, Ruvkun G. Regulation of *Caenorhabditis elegans* neuronal polarity by heterochronic genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(25):12327-12336. doi:10.1073/pnas.1820928116
6. Jiang S. A Regulator of Metabolic Reprogramming: MicroRNA Let-7. *Transl Oncol.* 2019;12(7):1005-1013. doi:10.1016/j.tranon.2019.04.013
7. Khan S, Ayub H, Khan T, Wahid F. MicroRNA biogenesis, gene silencing mechanisms and role in breast, ovarian and prostate cancer. *Biochimie.* 2019;167:12-24. doi:10.1016/j.biochi.2019.09.001
8. Dexheimer PJ, Cochella L. MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8(June):1-18. doi:10.3389/fcell.2020.00409
9. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:402. doi:10.3389/fendo.2018.00402
10. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(1):5-20. doi:10.1038/s41580-018-0059-1
11. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000;403(6772):901-906. doi:10.1038/35002607

12. Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol.* 2008;18(10):505-516. doi:10.1016/j.tcb.2008.07.007
13. Ali A, Bouma GJ, Anthony R V., Winger QA. The Role of LIN28-let-7-ARID3B Pathway in Placental Development. *Int J Mol Sci.* 2020;21(10):3637. doi:10.3390/ijms21103637
14. Ustianenko D, Chiu H-S, Treiber T, et al. LIN28 Selectively Modulates a Subclass of Let-7 MicroRNAs. *Mol Cell.* 2018;71(2):271-283.e5. doi:10.1016/J.MOLCEL.2018.06.029
15. Sun X, Liu J, Xu C, Tang SC, Ren H. The insights of Let-7 miRNAs in oncogenesis and stem cell potency. *J Cell Mol Med.* 2016;20(9):1779-1788. doi:10.1111/jcmm.12861
16. Thammaiah CK, Jayaram S. Role of let-7 family microRNA in breast cancer. *Non-coding RNA Res.* 2016;1(1):77-82. doi:10.1016/j.ncrna.2016.10.003
17. Büssing I, Slack FJ, Großhans H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends Mol Med.* 2008;14(9):400-409. doi:10.1016/J.MOLMED.2008.07.001
18. Mizuno R, Kawada K, Sakai Y. The Molecular Basis and Therapeutic Potential of Let-7 MicroRNAs against Colorectal Cancer. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/5769591
19. Chirshhev E, Oberg KC, Ioffe YJ, Unternaehrer JJ. Let - 7 as biomarker, prognostic indicator, and therapy for precision medicine in cancer . *Clin Transl Med.* 2019;8(1):24. doi:10.1186/s40169-019-0240-y
20. Nguyen LH, Robinton DA, Seligson MT, et al. Lin28b is sufficient to drive liver cancer and necessary for its maintenance in murine models. *Cancer Cell.* 2014. doi:10.1016/j.ccr.2014.06.018
21. Tan FE, Sathe S, Wheeler EC, Nussbacher JK, Peter S, Yeo GW. A Transcriptome-wide Translational Program Defined by LIN28B Expression Level. *Mol Cell.* 2019. doi:10.1016/j.molcel.2018.10.041
22. Rybak A, Fuchs H, Smirnova L, et al. A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell

- commitment. *Nat Cell Biol.* 2008;10(8):987-993. doi:10.1038/ncb1759
23. Shi F, Yu W, Wang X, Shi F, Yu W, Wang X. Bistable Switch in let-7 miRNA Biogenesis Pathway Involving Lin28. *Int J Mol Sci.* 2014;15(10):19119-19133. doi:10.3390/ijms151019119
 24. Moss EG, Tang L. Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its developmental expression and microRNA complementary sites. *Dev Biol.* 2003;258(2):432-442.
 25. Madeira F, Park YM, Lee J, et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* April 2019. doi:10.1093/nar/gkz268
 26. Tzialikas J, Romer-Seibert J. LIN28: roles and regulation in development and beyond. *Development.* 2015;142(14):2397-2404. doi:10.1242/dev.117580
 27. Piskounova E, Polyarchou C, Thornton JE, et al. Lin28A and Lin28B Inhibit let-7 MicroRNA Biogenesis by Distinct Mechanisms. *Cell.* 2011;147(5):1066-1079.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286741101289X?via%3Dihub>. Accessed June 27, 2019.
 28. Wang T, He Y, Zhu Y, et al. Comparison of the expression and function of Lin28A and Lin28B in colon cancer. *Oncotarget.* 2016;7(48):79605-79616. doi:10.18632/oncotarget.12869
 29. Molenaar JJ, Domingo-Fernández R, Ebus ME, et al. LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression. *Nat Genet.* 2012;44(11):1199-1206. doi:10.1038/ng.2436
 30. McStay B. Nucleolar organizer regions: genomic 'dark matter' requiring illumination. *GENES Dev.* 2016;30:45-53. doi:10.1101/gad.283838.116.1598
 31. Budkina KS, Zlobin NE, Kononova S V, Ovchinnikov LP, Babakov A V. Cold Shock Domain Proteins: Structure and Interaction with Nucleic Acids. *Biochem.* 2020;85(1):1-19. doi:10.1134/S0006297920140011
 32. Mayr F, Heinemann U, Mayr F, Heinemann U. Mechanisms of Lin28-

- Mediated miRNA and mRNA Regulation—A Structural and Functional Perspective. *Int J Mol Sci.* 2013;14(8):16532-16553. doi:10.3390/ijms140816532
33. Treiber T, Treiber N, Plessmann U, et al. A Compendium of RNA-Binding Proteins that Regulate MicroRNA Biogenesis. *Mol Cell.* 2017;66(2):270-284.e13. doi:10.1016/j.molcel.2017.03.014
 34. Nam Y, Chen C, Gregory RI, Chou JJ, Sliz P. Molecular Basis for Interaction of let-7 MicroRNAs with Lin28. *Cell.* 2011;147(5):1080-1091. doi:10.1016/J.CELL.2011.10.020
 35. Wang L, Nam Y, Lee AK, et al. LIN28 Zinc Knuckle Domain Is Required and Sufficient to Induce let-7 Oligouridylation. *Cell Rep.* 2017;18(11):2664-2675. doi:10.1016/J.CELREP.2017.02.044
 36. Thornton JE, Gregory RI. How does Lin28 let-7 control development and disease? *Trends Cell Biol.* 2012;22(9):474-482. doi:10.1016/J.TCB.2012.06.001
 37. Lee H, Han S, Kwon CS, Lee D. Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein Cell.* 2016;7(2):100-113. doi:10.1007/s13238-015-0212-y
 38. Zhou J, Ng S-B, Chng W-J. LIN28/LIN28B: An emerging oncogenic driver in cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(5):973-978. doi:10.1016/J.BIOCEL.2013.02.006
 39. Heo I, Joo C, Cho J, Ha M, Han J, Kim VN. Lin28 Mediates the Terminal Uridylation of let-7 Precursor MicroRNA. *Mol Cell.* 2008;32(2):276-284. doi:10.1016/j.molcel.2008.09.014
 40. Lozoya T, Domínguez F, Romero-Ruiz A, et al. The Lin28/Let-7 System in Early Human Embryonic Tissue and Ectopic Pregnancy. Oudejans C, ed. *PLoS One.* 2014;9(1):e87698. doi:10.1371/journal.pone.0087698
 41. Yang D-H, Moss EG. Temporally regulated expression of Lin-28 in diverse tissues of the developing mouse. *Gene Expr Patterns.* 2003;3(6):719-726. doi:10.1016/S1567-133X(03)00140-6
 42. Nguyen LH, Robinton DA, Seligson MT, et al. Lin28b Is Sufficient to Drive

- Liver Cancer and Necessary for Its Maintenance in Murine Models. *Cancer Cell*. 2014;26(2):248-261. doi:10.1016/J.CCR.2014.06.018
43. Takashima Y, Terada M, Udono M, Miura S, Yamamoto J, Suzuki A. Suppression of lethal-7b and miR-125a/b Maturation by Lin28b Enables Maintenance of Stem Cell Properties in Hepatoblasts. *Hepatology*. 2016;64(1):245-260. doi:10.1002/hep.28548
 44. Huang Y. A mirror of two faces: Lin28 as a master regulator of both miRNA and mRNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012;3(4):483-494. doi:10.1002/wrna.1112
 45. Zamora-Contreras AM, Alvarez-Salas LM. Let-7 miRNA Precursors Co-express with LIN28B in Cervical Cells. *MicroRNA*. 2018;7(1):62-71. doi:10.2174/2211536607666180115143014
 46. Hafner M, Max KEA, Bandaru P, et al. Identification of mRNAs bound and regulated by human LIN28 proteins and molecular requirements for RNA recognition. *RNA*. 2013;19(5):613-626. doi:10.1261/rna.036491.112
 47. Huang J, Cao D, Sha J, Zhu X, Han S. DLL3 is regulated by LIN28B and miR-518d-5p and regulates cell proliferation, migration and chemotherapy response in advanced small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;514(3):853-860. doi:10.1016/j.bbrc.2019.04.130
 48. Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, et al. The let-7 MicroRNA Represses Cell Proliferation Pathways in Human Cells. *Cancer Res*. 2007;67(16):7713-7722. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1083
 49. Rahkonen N, Stubb A, Malonzo M, et al. Mature Let-7 miRNAs fine tune expression of LIN28B in pluripotent human embryonic stem cells. 2016;17:498-503. doi:10.1016/j.scr.2016.09.025
 50. Wang X, Cao L, Wang Y, Wang X, Liu N, You Y. Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review). *Oncol Lett*. 2012;3(5):955-960. doi:10.3892/ol.2012.609
 51. Lightfoot HL, Miska EA, Balasubramanian S. Identification of small

- molecule inhibitors of the Lin28-mediated blockage of pre-let-7g processing. *Org Biomol Chem.* 2016;14(43):10208-10216. doi:10.1039/C6OB01945E
52. Lim D, Byun WG, Koo JY, Park H, Park SB. Discovery of a Small-Molecule Inhibitor of Protein–MicroRNA Interaction Using Binding Assay with a Site-Specifically Labeled Lin28. *J Am Chem Soc.* 2016;138(41):13630-13638. doi:10.1021/jacs.6b06965
 53. Wang L, Rowe RG, Jaimes A, et al. Small-Molecule Inhibitors Disrupt let-7 Oligouridylation and Release the Selective Blockade of let-7 Processing by LIN28. *Cell Rep.* 2018;23(10):3091-3101. doi:10.1016/J.CELREP.2018.04.116
 54. Zhuo Z, Yu Y, Wang M, et al. Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10):2142. doi:10.3390/ijms18102142
 55. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 1990;249(4968):505-510. doi:10.1126/science.2200121
 56. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* 1990;346(6287):818-822. doi:10.1038/346818a0
 57. Zhang Y, Lai BS, Juhas M. Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. *Molecules.* 2019;24(5). doi:10.3390/molecules24050941
 58. Blind M, Blank M. Aptamer Selection Technology and Recent Advances. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2015;4(1):e223. doi:10.1038/mtna.2014.74
 59. Borghouts C, Kunz C, Groner B. Peptide aptamers: recent developments for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2005;5(6):783-797. doi:10.1517/14712598.5.6.783
 60. Vorobyeva M, Davydova A, Vorobjev P, et al. Key Aspects of Nucleic Acid Library Design for in Vitro Selection. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):470. doi:10.3390/ijms19020470
 61. Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX—A (r)evolutionary

- method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng.* 2007;24(4):381-403. doi:10.1016/J.BIOENG.2007.06.001
62. Heiat M, Ranjbar R, Latifi AM, Rasaei MJ, Farnoosh G. Essential strategies to optimize asymmetric PCR conditions as a reliable method to generate large amount of ssDNA aptamers. *Biotechnol Appl Biochem.* 2017;64(4):541-548. doi:10.1002/bab.1507
 63. Ruscito A, DeRosa MC. Small-Molecule Binding Aptamers: Selection Strategies, Characterization, and Applications. *Front Chem.* 2016;4:14. doi:10.3389/fchem.2016.00014
 64. Dong L, Zhou H, Zhao M, et al. Phosphorothioate-Modified AP613-1 Specifically Targets GPC3 when Used for Hepatocellular Carcinoma Cell Imaging. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2018;13:376-386. doi:10.1016/J.OMTN.2018.09.013
 65. Miyachi Y, Shimizu N, Ogino C, Kondo A. Selection of DNA aptamers using atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(4):e21-e21. doi:10.1093/nar/gkp1101
 66. Gopinath SCB. Methods developed for SELEX. *Anal Bioanal Chem.* 2006;387(1):171-182. doi:10.1007/s00216-006-0826-2
 67. Sypabekova M, Bekmurzayeva A, Wang R, Li Y, Nogues C, Kanayeva D. Selection, characterization, and application of DNA aptamers for detection of Mycobacterium tuberculosis secreted protein MPT64. *Tuberculosis.* 2017;104:70-78. doi:10.1016/J.TUBE.2017.03.004
 68. Wang J, Rudzinski JF, Gong Q, Soh HT, Atzberger PJ. Influence of Target Concentration and Background Binding on In Vitro Selection of Affinity Reagents. Chatterji D, ed. *PLoS One.* 2012;7(8):e43940. doi:10.1371/journal.pone.0043940
 69. Berezovski M V, Musheev MU, Drabovich AP, Jitkova J V, Krylov SN. Non-SELEX: selection of aptamers without intermediate amplification of candidate oligonucleotides. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1359-1369. doi:10.1038/nprot.2006.200
 70. Le ATH, Krylova SM, Kanoatov M, Desai S, Krylov SN. Ideal-Filter

- Capillary Electrophoresis (IFCE) Facilitates the One-Step Selection of Aptamers. *Angew Chemie Int Ed.* 2019;58(9):2739-2743. doi:10.1002/anie.201812974
71. Szeto K, Latulippe DR, Ozer A, et al. RAPID-SELEX for RNA aptamers. *PLoS One.* 2013;8(12). doi:10.1371/journal.pone.0082667
 72. Luo Z, He L, Wang J, Fang X, Zhang L. Developing a combined strategy for monitoring the progress of aptamer selection. *Analyst.* 2017;142(17):3136-3139. doi:10.1039/C7AN01131H
 73. Mayr F, Schütz A, Döge N, Heinemann U. The Lin28 cold-shock domain remodels pre-let-7 microRNA. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(15):7492-7506. doi:10.1093/nar/gks355
 74. O'Day E, Le MTN, Imai S, et al. An RNA-binding Protein, Lin28, Recognizes and Remodels G-quartets in the MicroRNAs (miRNAs) and mRNAs It Regulates. *J Biol Chem.* 2015;290(29):17909-17922. doi:10.1074/jbc.M115.665521
 75. Hudson WH, Ortlund EA. The structure, function and evolution of proteins that bind DNA and RNA. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(11):749-760. doi:10.1038/nrm3884
 76. Zeng Y, Yao B, Shin J, et al. Lin28A Binds Active Promoters and Recruits Tet1 to Regulate Gene Expression. *Mol Cell.* 2016;61(1):153-160. doi:10.1016/j.molcel.2015.11.020
 77. Pablo, Franco-Alberto. "Evaluación de la interacción de la proteína LIN28B con los miRNAs de la familia de let-7 " TESIS. 2018.
 78. Shao K, Ding W, Wang F, Li H, Ma D, Wang H. Emulsion PCR: A High Efficient Way of PCR Amplification of Random DNA Libraries in Aptamer Selection. Veitia RA, ed. *PLoS One.* 2011;6(9):e24910. doi:10.1371/journal.pone.0024910
 79. Schütze T, Glökler J. Idiot-proof emulsion PCR. *LabTimes.* 2010;(May):50.
 80. Wong I, Lohman TM. A double-filter method for nitrocellulose-filter binding: Application to protein-nucleic acid interactions. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A*. 1993;90(12):5428-5432. doi:10.1073/pnas.90.12.5428
81. Motulsky HJ. Receptor binding - Saturation binding. GraphPad Curve Fitting Guide. https://www.graphpad.com/guides/prism/8/curve-fitting/reg_specific_hill.htm. Consultado en 2020.
 82. Ma L, Zhao Q, Chen W, Zhang Y. Oncogene lin28B increases chemosensitivity of colon cancer cells in a let-7-independent manner. *Oncol Lett*. 2018;15(5):6975-6981. doi:10.3892/ol.2018.8250
 83. McWhorter ES, West RC, Russ JE, Ali A, Winger QA, Bouma GJ. LIN28B regulates androgen receptor in human trophoblast cells through Let-7c. *Mol Reprod Dev*. June 2019. doi:10.1002/mrd.23226
 84. Tang M, Zhou J, You L, Cui Z, Zhang H. LIN28B/IRS1 axis is targeted by miR-30a-5p and promotes tumor growth in colorectal cancer. *J Cell Biochem*. 2019. doi:10.1002/jcb.29529
 85. Ganser LN. The roles of structural dynamics in the cellular functions of RNAs. doi:10.1038/s41580-019-0136-0
 86. Ghoshdastidar D, Bansal M. Dynamics of physiologically relevant noncanonical DNA structures: an overview from experimental and theoretical studies. *Brief Funct Genomics*. 2018;18(3):192-204. doi:10.1093/bfgp/ely026
 87. Sharma C, Mohanty D. Molecular Dynamics Simulations for Deciphering the Structural Basis of Recognition of Pre-let-7 miRNAs by LIN28. *Biochemistry*. 2017;56(5):723-735. doi:10.1021/acs.biochem.6b00837
 88. Sullivan R, Adams MC, Naik RR, Milam VT. Analyzing secondary structure patterns in DNA aptamers identified via compels. *Molecules*. 2019;24(8). doi:10.3390/molecules24081572
 89. Rangel-Guerrero SI, Franco-Urquijo PA, Martínez-Salas E, Alvarez-Salas LM. Structural insights of the pre-let-7 interaction with LIN28B. *Non Publ results*. 2020.
 90. Wang T, Chen C, Larcher LM, Barrero RA, Veedu RN. Three decades of nucleic acid aptamer technologies: Lessons learned, progress and opportunities on aptamer development. *Biotechnol Adv*. 2019;37(1):28-

50. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.001
91. Odeh F, Nsairat H, Alshaer W, et al. Aptamers chemistry: Chemical modifications and conjugation strategies. *Molecules*. 2020;25(1). doi:10.3390/molecules25010003
92. Liu X, Lu Q, Chen S, et al. Selection and Identification of Novel Aptamers Specific for Clenbuterol Based on ssDNA Library Immobilized SELEX and Gold Nanoparticles Biosensor. *Molecules*. 2018;23(9):2337. doi:10.3390/molecules23092337
93. Caroli J, Forcato M, Bicciato S. APTANI2: update of aptamer selection through sequence-structure analysis. *Bioinformatics*. November 2019. doi:10.1093/bioinformatics/btz897
94. Alam KK, Chang JL, Burke DH. FASTAptamer: A bioinformatic toolkit for high-throughput sequence analysis of combinatorial selections. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2015;4(3):e230. doi:10.1038/mtna.2015.4