



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

***Evaluación de la interacción entre un preE análogo de la familia de
miRNA let-7 con la proteína LIN28B***

Tesis que presenta:

Bioq. Darian Davel Borges Rodríguez

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en la Especialidad de

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de Tesis:

Dr. Luis Marat Alvarez Salas

Ciudad de México

Agosto, 2024

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 Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) con número de CVU 1227777.

DEDICATORIA

A mi familia; por su amor incondicional en cada etapa de mi vida

A mis hermanos Denis, Gabriel y Roger; por creer siempre en mis triunfos

A mi tutor el Dr. Luis Marat; por sus enseñanzas y confianza

A todo el laboratorio LTG; por cada éxito y fracaso

*A la comunidad de cubanos especialmente a Luis Janiel y Maikel, por apoyarme en los
buenos y malos momentos*

Al CINVESTAV y al CONAHCYT, por permitirme superarme cada día más

RESUMEN

Los microRNA let-7 son una familia de reguladores críticos del desarrollo animal, la diferenciación de células madre, el metabolismo de la glucosa y la tumorigénesis. Los genomas de mamíferos contienen 12 isoformas de let-7 que suprimen la expresión de un conjunto común de RNA mensajeros objetivo. Las proteínas LIN28 bloquean selectivamente la biogénesis de let-7 en células no diferenciadas y en cáncer. El modelo actual para la represión coordinada de let-7 implica que los dominios de choque frío (CSD) y dedos de zinc (ZKD) de LIN28 reconocen una región conservada estructuralmente denominada pre-elemento (preE). Aquí evaluamos la interacción *in vitro* de un preE-let-7 diseñado sintéticamente con LIN28B. Para ello sintetizamos el ssDNA preE y lo comparamos con la unión a LIN28B de pre-miR-98 (+) y pre-miR-18b (-). Observamos interacción de todos los análogos de DNA y RNA evaluados con LIN28B, aunque con diferente afinidad. Nuestro preE-let-7 presentó una afinidad con LIN28B menor que los RNA pre-miR-98 y pre-miR18b, pero mayor que el DNA pre-miR18b. Estos resultados contribuyen a la búsqueda de moléculas biológicas diseñadas contra el bloqueo de LIN28/let-7 y su repercusión en diversas enfermedades como el cáncer.

ABSTRACT

The let-7 microRNAs are a family of critical regulators of animal development, stem cell differentiation, glucose metabolism, and tumorigenesis. Mammalian genomes contain 12 isoforms of let-7 that suppress the expression of a common set of target messenger RNAs. LIN28 proteins selectively block the biogenesis of let-7 in undifferentiated cells and cancer. The current model for coordinated let-7 repression suggests that the cold shock (CSD) and zinc finger (ZKD) domains of LIN28 recognize a structurally conserved region called the pre-element (preE). Here, we evaluate the *in vitro* interaction of a synthetically designed preE-let-7 with LIN28B. To do this, we synthesized the preE ssDNA and compared its binding to LIN28B with pre-miR-98 (+) and pre-miR-18b (-). We observed interaction of all evaluated DNA and RNA analogs with LIN28B, although different affinities. Our preE-let-7 showed a lower affinity with LIN28B than the pre-miR-98 and pre-miR-18b RNAs, but higher than the pre-miR-18b DNA. These results contribute to the search for biologically designed molecules against the LIN28/let-7 blockade and its impact on various diseases such as cancer.

LISTA DE ABREVIATURAS

3' UTR	Región no traducida en el 3', del inglés <i>3' untranslated regions</i>
5'-FAM	Extremo 5' marcado con 6-carboxifluoresceína
BSA	Albúmina de suero bovino, del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i>
CSD	Dominio de choque frío, del inglés <i>Cold Shock Domain</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, del inglés <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dsDNA	DNA de cadena doble o bicatenario, del inglés <i>double-stranded DNA</i>
EMSA	Ensayo de retardamiento electroforético, del inglés <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
GST	Glutación-S-transferasa
IPTG	Isopropil-B-D-1-tiogalactopiranosido, del inglés <i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
K_d	Constante de disociación
LB	Medio Luria Bertani
let-7	Familia de miRNA let-7, del inglés <i>lethal-7</i>
microRNA/miRNA	RNA pequeño no codificante
NLS	Señal de localización nuclear, del inglés <i>Nuclear Localization Signal</i>
NoLS	Señal de localización nucleolar, del inglés <i>Nucleolar Localization Signal</i>
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pre-miRNA	miRNA precursor
pri-miRNA	miRNA primario
preE	Pre-elemento

RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA, del inglés <i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RNA	Ácido ribonucleico, del inglés <i>Ribonucleic Acid</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SHAPE	Acilación selectiva del 2'-hidroxilo analizada por extensión de cebador, del inglés <i>Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension</i>
SN	Sobrenadante
SOC	Medio Super Óptimo con represión por Catabolitos
ssDNA	DNA de cadena sencilla, del inglés <i>single-stranded DNA</i>
TIV	Transcripción <i>in vitro</i>
TUTasas	Uridil transferasas, del inglés <i>Terminal Uridylyl Transferases</i>
ZKD	Dominio dedos de zinc, del inglés <i>Zinc Knuckle Domain</i>

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Características generales de los miRNA	1
1.2 Familia de los miRNA let-7.....	2
1.3 Biogénesis de los miRNA let-7	3
1.4 LIN28 inhibe selectivamente la biogénesis de let-7.....	6
II. ANTECEDENTES.....	9
III. JUSTIFICACIÓN.....	14
IV. HIPÓTESIS.....	15
V. OBJETIVOS.....	16
5.1 Objetivo general.....	16
5.2 Objetivos específicos	16
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
6.1 Sondas de RNA	17
6.1.1 Generación de la doble cadena	17
6.1.2 Transcripción <i>In Vitro</i>	18
6.1.3 Purificación de la TIV	18
6.2 Sondas de DNA	19
6.2.1 Purificación de las sondas de ssDNA	19
6.3 Síntesis del ssDNA 5'-FAM pre-miR-98	19
6.3.1 Generación de dsDNA 5'-FAM pre-miR-98	20
6.3.2 Generación de DNA de cadena sencilla (ssDNA) 5'-FAM pre-miR-98.....	20
6.4 Producción de la proteína LIN28B recombinante.....	21
6.4.1 Plásmido pGST-LIN28B	21
6.4.2 Transformación de <i>Escherichia coli</i> Rosetta con el plásmido pGST-Lin28B	22
6.4.3 Expansión-Inducción de bacterias transformadas	22
6.4.4 Purificación de la proteína LIN28B recombinante.....	22
6.4.5 Electroforesis SDS-PAGE.....	23
6.4.6 Inmunotransferencia (<i>Western blot</i>).....	23
6.5 Ensayos de retardamiento electroforético (EMSA).....	24
6.6 Predicción de la estructura secundaria de los precursores	24
VII. Resultados	25

7.1 Síntesis <i>in vitro</i> de las sondas de RNA.....	25
7.1.1 Generación de los moldes de doble cadena.....	25
7.1.2 Generación de los transcritos fluorescentes.....	26
7.2 Síntesis <i>in vitro</i> de las sondas de DNA.....	29
7.3 Síntesis enzimática de la sonda 5'-FAM pre-miR-98.....	30
7.4 Producción de la proteína recombinante LIN28B.....	31
7.4.1 Ensayo de restricción del plásmido pGST-LIN28B.....	31
7.4.2 Generación de las colonias transformadas.....	32
7.4.3 Control de la purificación de LIN28B.....	33
7.5 Ensayos de interacción de las sondas con LIN28B.....	36
7.5.1 Optimización de la concentración de sondas y rango de LIN28B.....	36
7.5.2 Ensayos de retardamiento electroforético (EMSA).....	37
7.5.3 Control de especificidad.....	41
7.5.4 Ensayos de competición de los precursores con el DNA preE-let-7.....	42
7.6 Predicción estructural secundaria de los precursores.....	45
VIII. DISCUSIÓN.....	48
8.1 El DNA preE-let-7 interactúa con LIN28B a través de la formación de complejos.....	48
8.2 Las sondas fluorescentes son susceptibles a apagamiento.....	50
8.3 Los análogos de pre-miR-18 interactúan con LIN28B.....	52
IX. CONCLUSIONES.....	54
X. PERSPECTIVAS.....	55
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
XII. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA.....	63

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Características generales de los miRNA

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNA reguladores no codificantes de cadena sencilla con aproximadamente 22 nucleótidos de longitud (miRNA maduro), que suprimen postranscripcionalmente RNA mensajeros (mRNAs) mediante una interacción directa. La especificidad y la afinidad de la unión se basan en una secuencia de 6-7 nucleótidos en el extremo 5' (secuencia semilla), que es el sitio de unión principal a las secuencias complementarias en el 3'-UTR del transcrito objetivo (Lewis et al., 2005).

Los miRNAs se pueden expresar como genes únicos (monocistrónicos) o como grupos (*clusters*) de miRNA dentro de un mismo locus (policistrónico), y los miRNAs estrechamente vinculados pueden ser de diferentes familias. Se han encontrado miRNAs en regiones intergénicas y dentro de intrones y exones de otros genes. Además, se pueden transcribir a partir de sus propios promotores, promotores de genes cercanos o promotores de genes "huésped" (Bartel, 2004). Aproximadamente, 30 % de los miRNAs se generan a partir de intrones, mientras que el resto son expresados a partir de loci únicos para miRNAs. La mayoría de los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II y, al igual que muchos genes que codifican proteínas, presentan una caperuza en el extremo 5' y una cola poliadenilada en el extremo 3' (Ha & Kim, 2014).

La genética de los miRNAs se ha caracterizado ampliamente del genoma de plantas y animales. Al menos un tercio de las familias de miRNAs están altamente conservadas en todas las especies (Zhang et al., 2018), y el 60 % de los loci están conservados desde el ratón hasta el ser humano (Griffiths-Jones et al., 2008). Los miRNAs están involucrados en diversas funciones biológicas incluido el crecimiento, desarrollo, homeostasis, la proliferación celular, la diferenciación, las vías de señalización, la apoptosis y el metabolismo (Saliminejad et al., 2019). Concomitante con sus múltiples funciones biológicas está su participación en muchas enfermedades, como infecciones virales, trastornos genéticos y diversos tipos de cáncer (Esquela-Kerscher & Slack, 2006; Kloosterman & Plasterk, 2006; Shi et al., 2008).

1.2 Familia de los miRNA let-7

El gen *lethal-7* (let-7) fue uno de los primeros miRNAs descubiertos. Se identificó como un regulador del desarrollo temporal de *Caenorhabditis elegans*, descrito como un gen heterocrónico (aquellos que gobiernan la progresión de los estadios de un organismo) (Reinhart et al., 2000). Actualmente se sabe que el let-7 maduro está muy conservado en todas las especies animales, lo cual permitió postularlo como un regulador génico ubicuo (Hertel et al., 2012; Pasquinelli et al., 2000).

La familia de miRNA let-7 a menudo está presente en múltiples copias en un genoma. Para distinguir entre sus isoformas se coloca progresivamente como sufijo una letra después del nombre let-7 para indicar una secuencia ligeramente diferente y un número al final indica que la misma secuencia está presente en múltiples ubicaciones en el genoma (Roush & Slack, 2008). En humanos, la familia de let-7 se compone de 12 miRNAs maduros que se encuentran en 8 cromosomas y 4 *clusters* distintos (Figura 1).

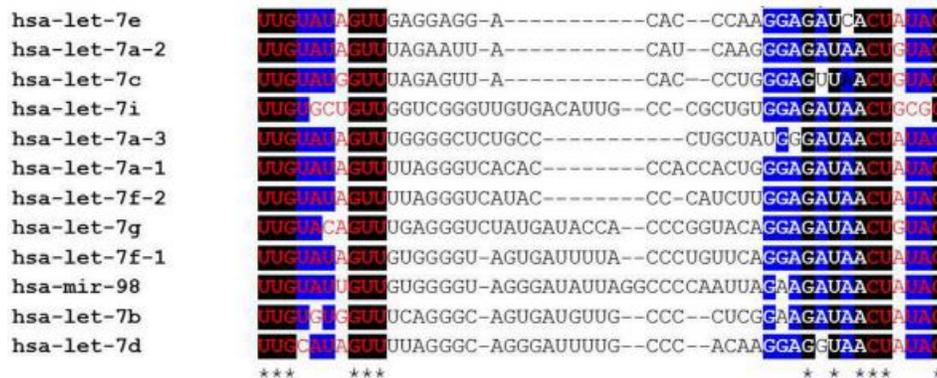


Figura 1. Alineamiento parcial de secuencias pre-let-7 humanas. Las bases que se muestran en letra roja son parte del dúplex de miRNA let-7-5'/let-7-3' que sigue a la escisión citoplasmática de *Dicer*. Los recuadros negros y los asteriscos indican bases perfectamente conservadas, mientras que los recuadros azules representan bases donde 10/12 son idénticas en todos los miembros de la familia let-7. Tomado de Balzeau et al., 2017

Debido a que la secuencia semilla de todos los let-7 es idéntica (5'-GAGGUAG-3') durante mucho tiempo se ha asumido que todos se dirigen a los mismos transcritos (Yang et al., 2012). Se han encontrado varios oncogenes y genes reguladores como objetivos para los let-7, incluidos *ras* (Johnson et al., 2005), *hmg2* (Yu et al., 2007), ciclina D1/2/3

y ciclina A (Schultz et al., 2008), *il6* (Iliopoulos et al., 2009), *c-myc* (Sampson et al., 2007), *dicer1* (Tokumaru et al., 2008) y *lin28 A/B* (Guo et al., 2006; Moss et al., 1997).

En condiciones normales la familia de let-7 está involucrada en la regulación de los procesos de adhesión celular, desarrollo, formación de músculo y regulación génica (Su et al., 2012). Una baja expresión de let-7 se ha descrito en varios tipos de cáncer y se ha asociado a una baja supervivencia de pacientes con esta enfermedad. Por lo tanto, los let-7 generalmente se consideran como supresores de tumor (Büssing et al., 2008). En contraste, una alta expresión de let-7 resulta en desorden metabólico a partir de la resistencia a la insulina y tolerancia a la glucosa deteriorada (Frost & Olson, 2011; Zhu et al., 2011).

1.3 Biogénesis de los miRNA let-7

La biogénesis de los miRNAs es el proceso por el cual se generan los miRNAs maduros en las células. En dependencia de la maduración del miRNA su biogénesis puede ser canónica o no canónica (Rani & Sengar, 2022).

La biogénesis canónica (Figura 2A), vía dominante, comienza en el núcleo con la transcripción por la RNA polimerasa II. Este transcrito denominado miRNA primario o pri-miRNA es típicamente mayor a 1kb y consiste en un tallo (*stem*) de 33-35 pares de bases, un lazo (*loop*) terminal y segmentos de RNA no complementario en el extremo 5' y 3' (Jin et al., 2020). El pri-miRNA es procesado en el núcleo por el complejo Microprocesador, compuesto por la ribonucleasa similar a la RNAasa III, *Drosha*, y la proteína de unión al RNA, DGCR8 (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Partin et al., 2020). *Drosha* escinde el dúplex pri-miRNA en la base de la estructura (Y. Lee et al., 2003), mientras que DGCR8 reconoce la secuencia GGAC N⁶-metiladenilado y otros motivos dentro del pri-miRNA (Alarcón et al., 2015). El corte de las hebras no apareadas 5' y 3' de los pri-miRNAs permite liberar un pequeño RNA con forma de horquilla (*hairpin*) de aproximadamente 65 nucleótidos de longitud denominado miRNA precursor o pre-miRNA (Liu et al., 2018). El pre-miRNA retiene la estructura de *stem-loop* estabilizada por el apareamiento intracatenario de bases y es exportado al citoplasma por el complejo Exportina5/Ran-GTP (Yi et al., 2003). Allí, una segunda ribonucleasa similar a la RNasa III, *Dicer*, corta el *hairpin* dejando una molécula de miRNA de doble cadena de 21 nucleótidos (Zhang H.

et al., 2002). El dúplex maduro de miRNA se ensambla con un complejo proteico formado por TRBP, *Dicer* y AGO2 en humanos (Chendrimada et al., 2005) constituyendo el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), donde una de las hebras se usa como secuencia guía para mediar el silenciamiento de los mRNA diana complementarios (Iwakawa & Tomari, 2022).

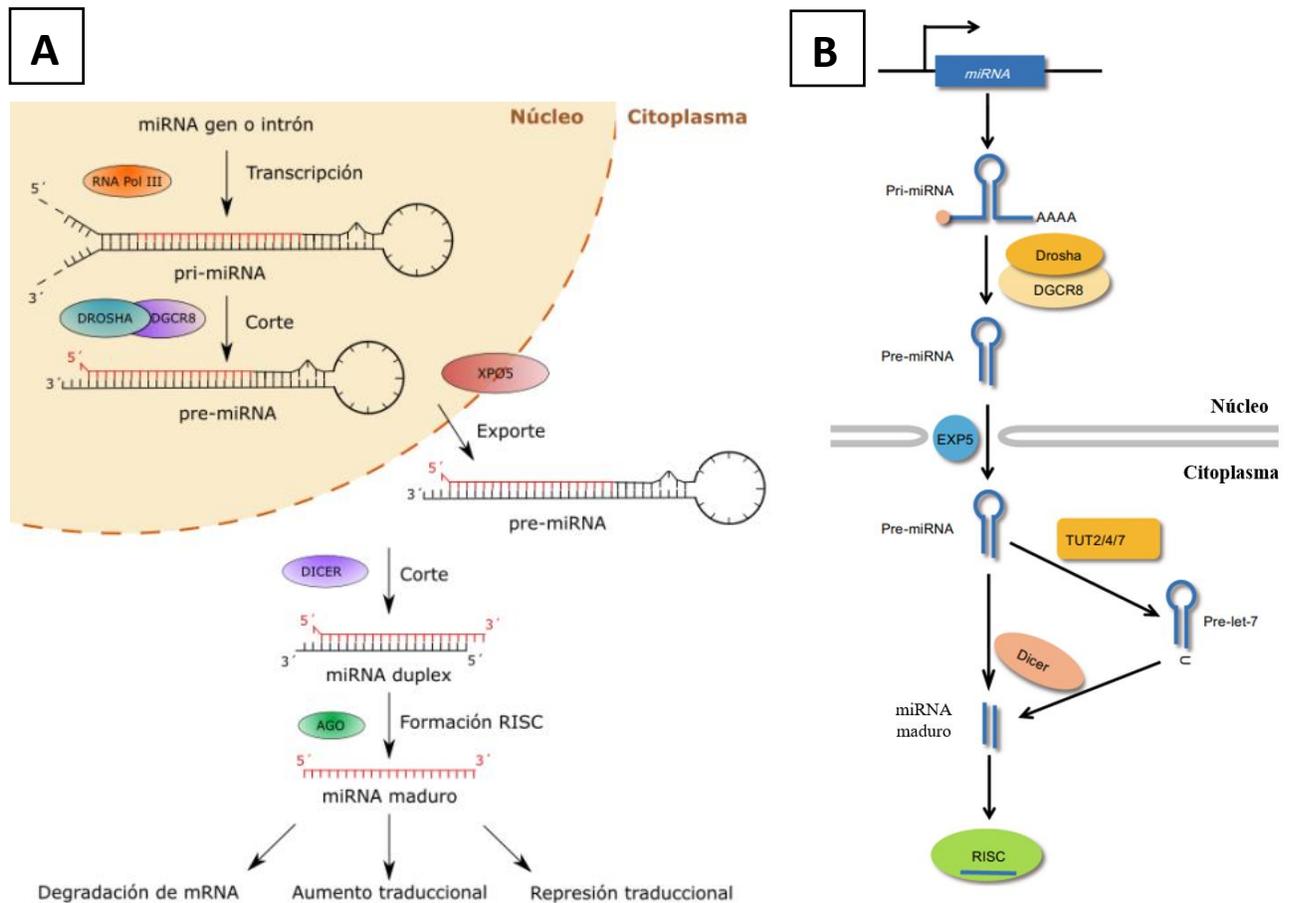


Figura 2. A) Biogénesis canónica de los miRNAs. La biogénesis de los miRNAs comienza cuando la RNA polimerasa II transcribe un RNA de aproximadamente 1 kb de longitud denominado pri-miRNA que será procesado por *Drosha* y su cofactor DGCR8 dando lugar al pre-miRNA. Este transcrito posteriormente es transportado desde el núcleo hasta el citoplasma por el complejo EXP5-RAN-GTP y procesado por *Dicer* y TRBP para generar un RNA de doble cadena (miRNA maduro) que será cargado al complejo efector denominado RISC para llevar a cabo diversas funciones. **B) Biogénesis de los miRNAs let-7.** Existen 2 vías de biogénesis de los

miRNAs let-7: biogénesis independientes de TUTasas o canónica (Grupo I) y biogénesis dependiente de TUTasas (Grupo II). Tomado de Bartel, 2004 y H. Lee et al., 2016

La maduración de let-7 (Figura 2B) generalmente sigue la vía canónica de biogénesis de miRNAs; sin embargo, algunos miembros requieren un paso regulatorio adicional (Figura 2B). Tanto el pri-let-7 como el pre-let-7 albergan una estructura de horquilla típica de miRNA con un tallo que contiene la secuencia 5' (5p) ampliamente emparejada con la secuencia 3' (3p) parcialmente complementaria conectada por una región de bucle terminal de variable longitud y estructura entre los diferentes miRNAs let-7 (H. Lee et al., 2016). Una región específica de los miRNA pri/pre-let-7, denominada pre-elemento (preE), sirve como base para reclutar proteínas de unión a RNA, incluidas LIN28A/LIN28B (Newman et al., 2008), KHSRP (también conocida como KSRP) (Michlewski & Cáceres, 2010), hnRNPA1 (Treiber et al., 2017) y TRIM25 (Choudhury et al., 2014).

Normalmente *Drosha* inicia la maduración por el corte del pri-let-7 y libera un pre-let-7 con 2 nucleótidos sobresalientes en el extremo 3' que *Dicer* reconoce para procesar selectivamente (Hutvagner G et al., 2001). En los pre-let-7a-2, -7c y -7e se presentan los 2 nucleótidos sobresalientes típicos en el extremo 3' (grupo I) lo que supone una regulación canónica, es decir, procesados directamente por el complejo *Dicer* en el citoplasma. No obstante, el resto de los pre-let-7 (grupo II) presentan una adenosina o uridina sobresaliente cerca del sitio de procesamiento por *Drosha*, lo que impide el reconocimiento de la base terminal. Por esta razón, los let-7 grupo II requieren una monouridilación en el extremo 3' para el procesamiento de *Dicer* (Heo et al., 2012; Yashiro & Tomita, 2018). Las uridiltransferasas terminales (TUTasas) actúan específicamente sobre RNA de doble cadena (dsRNA) con un 3' sobresaliente de un nucleótido para generar los dos nucleótidos requeridos. Por esta razón la biogénesis de los let-7 grupo II requiere un paso adicional que asegure la actividad de *Dicer*. Las enzimas TUTasas TUT2/PAPD4/GLD2, TUT4/ZCCHC11 y TUT7/ZCCH6 mono-uridilan el 3' de los pre-let-7 grupo II, dejando los dos nucleótidos sobresalientes en 3' requeridos por *Dicer* (Chung et al., 2016; Faehnle et al., 2017; Kim et al., 2015).

1.4 LIN28 inhibe selectivamente la biogénesis de let-7

Aunque están distribuidos por todo el genoma, muchos miembros de la familia let-7 están regulados de forma coordinada durante el desarrollo, y se expresan en niveles elevados en células diferenciadas (Büssing et al., 2008). La discrepancia entre la actividad transcripcional de let-7 y el retraso en la acumulación de let-7 maduro implica la existencia de al menos un factor regulador negativo que inhibe el procesamiento de let-7 en células no diferenciadas. Para determinar las proteínas que potencialmente intervienen en este bloqueo, varios grupos realizaron una purificación bioquímica de complejos asociados con pre-let-7 (Jovanovic et al., 2010). Los análisis de espectrometría de masas revelaron que las dos proteínas de interacción predominantes eran LIN28A (23 kDa) y LIN28B (27 kDa).

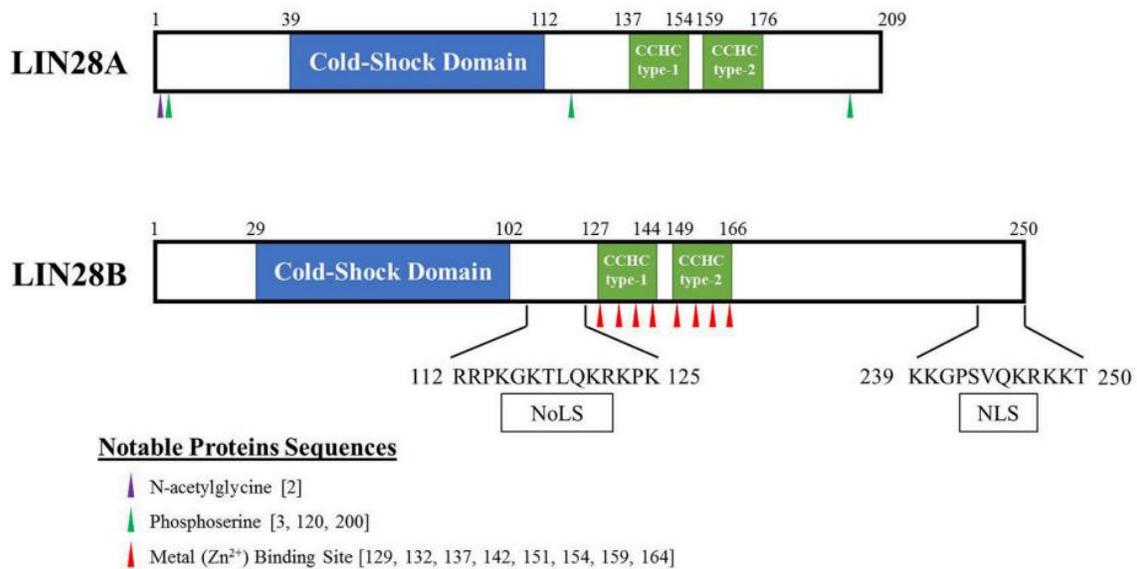


Figura 3. Proteínas LIN28A y LINB humanas. Estos protooncogenes altamente relacionados tienen dos regiones de unión de RNA distintas. El primero es un dominio de choque frío CSD (resaltado en azul) con preferencia por secuencias de RNA 5'-GNGAY-3', mientras que los dedos de zinc CCHC (resaltados en verde) se unen preferentemente a un motivo 5'-GRAG-3' (R = G o A). Se requiere la unión a ambos sitios de RNA para la unión de pre-let-7 de alta afinidad. La señal de localización nucleolar putativa (NoLS) y la señal de localización nuclear (NLS) se notifican para LIN28B. Tomado de Balzeau et al., 2017

Los genes humanos *lin28a* y *lin28b* codifican proteínas de 209 y 250 aminoácidos, respectivamente (Figura 3). Ambas proteínas de unión a RNA (RBP) comparten un alto grado de homología en los dominios estructurales con un “Cold Shock Domain” (CSD) N-terminal y dos “Zinc Knuckle Domain” (ZKD) Cys-Cys-His-Cys (CCHC) C-terminal (Zhou et al., 2013). En el caso particular de LIN28B presenta además una señal de localización nuclear (NLS) en el extremo carboxilo y una señal de localización nucleolar (NoLS) en el centro de la secuencia (Guo et al., 2006).

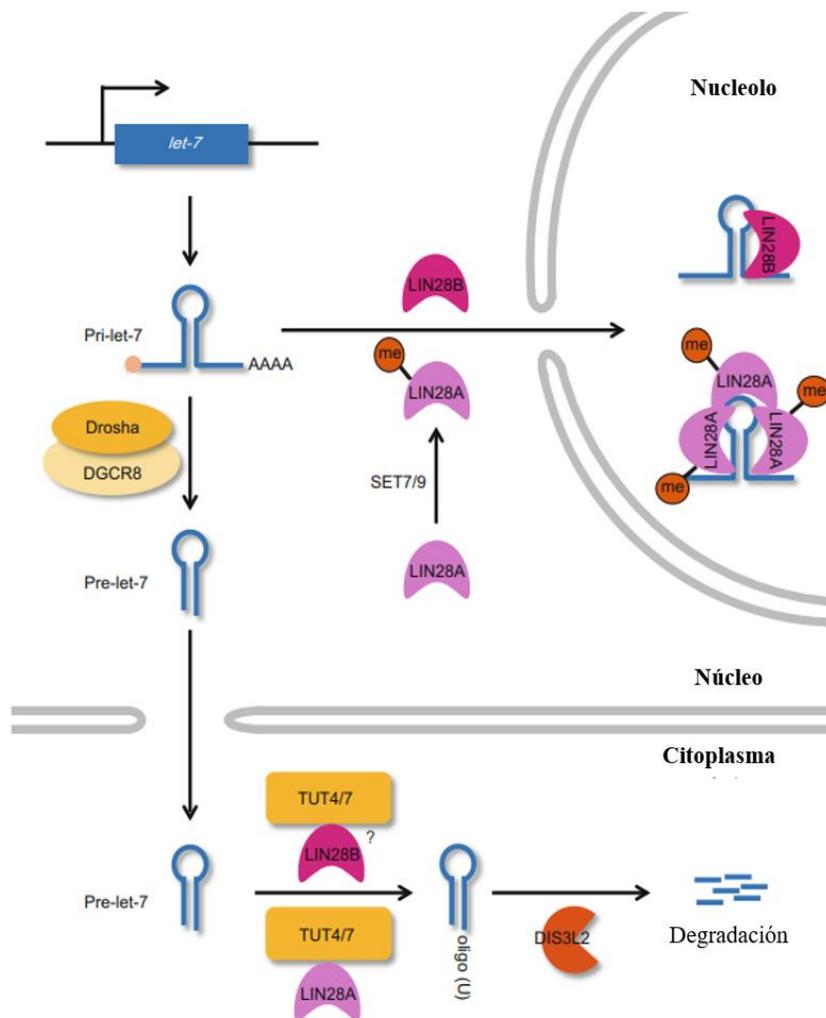


Figura 4. Regulación de la biogénesis de let-7 por LIN28A/B. LIN28A y LIN28B inhiben la biogénesis de let-7 a través de vías dependientes e independientes de TUTasa. LIN28A ayuda a las TUTasas a oligouridilar pre-let-7. El LIN28A metilado se une a pri-let-7 en el núcleo y lo sequestra en el nucleolo para evitar el procesamiento mediado por *Drosha*. LIN28B bloquea la biogénesis

de let-7 a través de vías independientes de TUTasa. La relación detallada entre LIN28B y TUTasas no está del todo dilucidada. Tomado de H. Lee et al., 2016

Los estudios bioquímicos y estructurales demuestran que la unión de let-7 y LIN28A/B se da mediante el dominio CSD con la secuencia consenso “5'-GNGAY-3'” (Y, pirimidina; N, cualquier base) la cual se encuentra en la burbuja del preE. Además, los dominios ZKD se unen a la secuencia consenso “5'-GGAG-3'”, la cual se encuentra en la burbuja asimétrica del tallo preE (Nam et al., 2011). Los dominios CSD y ZKD están separados por una región flexible que permite la unión a distintos bucles de los pre-let-7 donde los motivos GNGAY y GGAG varían en su espaciado. Se requieren interacciones de ambos dominios proteicos con los motivos de secuencia de RNA para una unión de alta afinidad (Loughlin et al., 2012; Mayr et al., 2012; Wang et al., 2017).

LIN28A y LIN28B son predominantemente citoplasmáticos y nucleares, respectivamente, y reprimen la biogénesis de let-7 mediante dos mecanismos distintos como se ilustra en la Figura 4 (H. Lee et al., 2016). LIN28A recluta a las TUTasas ZCCHC6 y ZCCHC11, que catalizan 3' oligouridilación de pre-let-7 (Hagan et al., 2009; Heo et al., 2009; Thornton et al., 2012). Esta modificación inhibe el procesamiento de *Dicer* e induce una degradación de 3'-5' de los precursores let-7 por la exonucleasa DIS3L2 (Chang et al., 2013; Ustianenko et al., 2013). LIN28B se une al preE de let-7 en el núcleo y bloquea la escisión de pri-let-7 mediada por el Microprocesador por un mecanismo independiente de TUTasas aún desconocido (Piskounova et al., 2011).

II. ANTECEDENTES

El reconocimiento de LIN28 con let-7 durante la regulación de la biogénesis requiere de dos regiones críticas para su unión que pueden observarse en la figura 5. La primera región incluye el preE *stem* y el preE *loop*. La otra región es el motivo 5'-GGAG-3' que se encuentra al extremo 3' del final de preE *bulge* y se encuentra bien conservado a través de la familia let-7 (Nam et al., 2011).

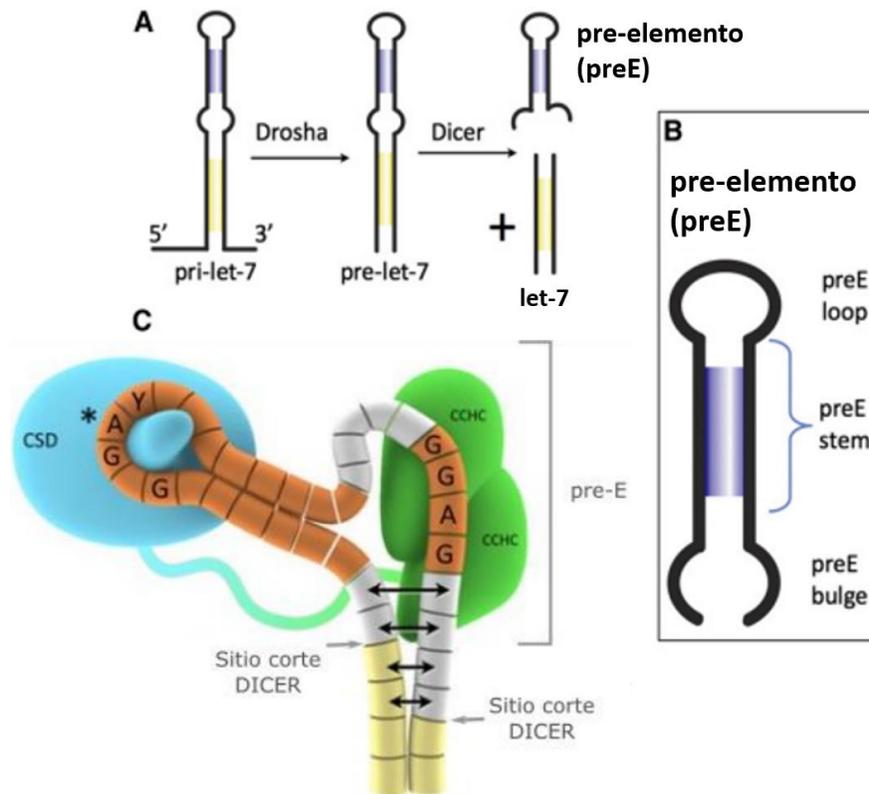


Figura 5. A) Maduración de un miRNA let-7. B) Arquitectura del pre-elemento (preE). C) Modelo esquemático para la unión de los dominios de LIN28 a dos regiones distintas de pre-let-7. Para LIN28: azul, CSD; verde, CCHCx2; *loop* azul-verde, enlazador de proteínas. Para pre-let-7 representado como una matriz de cilindros: amarillo, región madura; naranja, bases incluidas en la construcción de cristalización; gris, partes del preE no incluidas en el cristal. Se utilizó preE-let-7f-1 para la figura del modelo. La posible fusión parcial de dsRNA cerca de los sitios Dicer se representa con flechas de dos puntas; no se sabe hasta dónde llegaría el efecto. Tomado de (Nam et al., 2011)

LIN28A purificado bloquea el procesamiento de let-7 en las etapas de pri y pre-miRNA, porque LIN28/let-7 unido es resistente a la escisión *in vitro* utilizando complejos de Microprocesador o *Dicer* purificados (Heo et al., 2008; Viswanathan et al., 2008). Además, la sobreexpresión de LIN28A o LIN28B en células diferenciadas reprime potente y específicamente los niveles maduros de let-7, y la eliminación de LIN28A mediada por RNAs pequeños interferentes (siRNAs) en células no diferenciadas o LIN28B en células cancerosas es suficiente para aliviar específicamente la represión de let-7 (Rybak et al., 2008). Por lo tanto, la regulación de la expresión de let-7 durante el desarrollo embrionario, la diferenciación de células madre y el desarrollo de varios tipos de cáncer se controla principalmente a través del bloqueo postranscripcional de la biogénesis let-7 por parte de las proteínas LIN28 (Nguyen & Zhu, 2015; Thornton & Gregory, 2012).

Con respecto a la supresión de let-7, existen cuatro modos de acción distintos que se han planteado como hipótesis en los que múltiples mecanismos pueden ser responsables o tener un significado diferencial según el tipo de célula. El primer modelo sugirió que LIN28B se une a pri-let-7 en el núcleo, bloqueando la escisión del Microprocesador (Newman et al., 2008; Viswanathan et al., 2008). Un segundo modelo es que LIN28B probablemente se une a pre-let-7 en el citoplasma, bloqueando la escisión de *Dicer* (Rybak et al., 2008). El tercer modelo es que LIN28B dirige la poliuridilación de pre-let-7 a través de una TUTasa no identificada, lo que bloquea la escisión de *Dicer* y conduce a la degradación de pre-let-7 poliuridilado (Heo et al., 2008). Es de destacar que CLiP Seq de RNA asociados con la nucleasa DIS3L2 identificó pre-let-7 poliuridilado en la línea celular HEK-293T positiva para LIN28B (Ustianenko et al., 2016). El modelo final demostró que LIN28B no requiere la TUTasa ZCCHC11 para bloquear la biogénesis de let-7 y propuso que LIN28B bloquea la biogénesis de let-7 secuestrando pri-let-7 en el nucléolo (Piskounova et al., 2011). No obstante, la consecuencia funcional de la TUTasa ZCCHC6 no se investigó en este estudio. Esta omisión es notable ya que un trabajo posterior mostró que LIN28B promueve la uridilación *in vitro* pre-let-7 por ZCCHC6 (Thornton et al., 2012). Dado que la localización subcelular de LIN28B es controvertida, los mecanismos precisos de la represión let-7

mediada por LIN28A y si LIN28B utiliza o no una TUTasa para la represión let-7 siguen sin estar claros.

Triboulet et al., 2015 mostraron que LIN28 inhibe el procesamiento de todos menos uno de los 12 miembros de la familia let-7. Aunque LIN28A y LIN28B ejercen un grado similar de represión en diferentes miRNAs let-7, un miembro específico, let-7a-3 humano (y su ortólogo murino let-7c-2), escapa del bloqueo mediado por LIN28 tanto *in vitro* como en células cancerosas humanas (HeLa, HEK293T, HepG2 y H1299) y ESC de ratón (mESC). Ellos encontraron que la secuencia de 5 nucleótidos pareada que forma parte del *stem-loop* apical de preE let-7c-2 impide la unión de LIN28A *in vitro* y la represión mediada por LIN28A en células. De hecho, reemplazar esta secuencia con los nucleótidos correspondientes del bucle preE de pre-let-7a-1 restableció sustancialmente la interacción con LIN28A. Esta interacción podría resultar del efecto combinado de lo siguiente: (1) crear un motivo de unión al CSD más favorable; y (2) debilitar el emparejamiento de bases en el tallo cambiando un par G-C por un par A-U, permitiendo así que el CSD se proyecte a través del bucle terminal y remodelando el emparejamiento de bases en el tallo.

Por otra parte, adentrándose en la caracterización estructural de la interacción LIN28/let-7, Ustianenko et al., 2018 utilizando un mapeo de resolución de un solo nucleótido (*Single-Nucleotide-Resolution mapping*) de los sitios de unión de LIN28 *in vivo*, descubrieron que el dominio de choque frío (CSD) reconoce un motivo 5'-(U)GAU-3'. Este motivo clasifica a los miRNA let-7 en dos grupos: precursores con sitios de unión tanto para CSD como para ZKD (CSD+) y precursores con sitios de unión solo para ZKD (CSD-). Para obtener una medida más cuantitativa de la interacción entre LIN28 y las dos subclases de pre-miRNAs let-7, realizaron un ensayo de precipitación con RNA mediada por LIN28A (*RNA-mediated LIN28A pull-down assay*) utilizando los 12 precursores de let-7 y LIN28 endógeno de la línea celular de teratocarcinoma NTera2; la horquilla pri-miR-18b sin motivos de unión a LIN28 se utilizó como control negativo. El reconocimiento *in vivo* de LIN28, y la posterior uridilación y degradación del extremo 3' de los precursores CSD+ es más eficiente lo que conduce a una supresión más fuerte

en las células activadas por LIN28 y en tumores. Por lo tanto, los sitios de unión de CSD intensifican los efectos regulatorios de LIN28.

Estudios recientes llevados a cabo por nuestro grupo determinaron las estructuras de los precursores de let-7 mediante SHAPE y relación con la interacción con LIN28B (Rangel-Guerrero et al., 2020). La estructura secundaria de cada precursor tiene relación con la afinidad que presentan hacia LIN28B y los cambios en afinidad pueden explicar la regulación diferencial ejercida por LIN28B a cada pre-let-7. Por otro lado, la diferencia de longitud del preE *stem* de los pre-miRNAs de let-7 se caracterizó sobre la afinidad y/o interacción con LIN28B mediante ensayos de retardamiento electroforético (EMSA). Los precursores de let-7 presentan constantes de disociación que no dependen del largo del preE, por lo que no es un elemento clave de los factores que determinan la unión con LIN28B y por lo tanto su regulación (Franco-Urquijo, 2018). Ambos estudios destacan a pre-let-7f-1 y pre-miR-98 como los let-7 de mayor afinidad a LIN28B, lo que se corrobora con el trabajo de Ustianenko et al., 2018.

La interacción entre las proteínas LIN28 y los miRNAs let-7 es una de las interacciones RNA-proteínas más extensamente caracterizadas (Connerty et al., 2016). Los miRNAs let-7 funcionan como supresores de tumores al regular a la baja la expresión de oncogenes, incluidos RAS, c-MYC, HMGA2 (Balzeau et al., 2017). Muchas células tumorales humanas primarias expresan LIN28A/B y su sobreexpresión se ha relacionado con un mal pronóstico clínico. Por lo tanto, la inhibición de LIN28A/B o la interrupción de su interacción con los pri-/pre-let-7 utilizando moléculas pequeñas es una estrategia anticancerígena atractiva. De hecho, diferentes efectos de detección han llevado al descubrimiento de moléculas pequeñas inhibidoras de la interacción LIN28A/let-7 entre los que se encuentran el inhibidor de LIN28 TPEN que desestabiliza el dominio ZKD, mientras que LI71 se une al dominio CSD para suprimir la actividad de LIN28 contra let-7 en células de leucemia y células madre embrionarias. Los resultados demostraron la inhibición farmacológica selectiva de dominios individuales de LIN28 y proporcionaron una base para la inhibición terapéutica de la vía de biogénesis de let-7 en enfermedades impulsadas por LIN28 (Goebel et al., 2022; Wang et al., 2018)

En una revisión más extensa, Oyejobi et al., 2024 se centraron en el mecanismo molecular de la represión de let-7 por LIN28 y las estrategias actuales para superar este bloqueo con el propósito de la terapia contra el cáncer. Propusieron tres estrategias farmacológicas para modular el eje LIN28/let-7: 1. Miméticos de let-7 (*Let-7mimics*), 2. Bucles de miRNAs (*Looptomirs*) y 3. Moléculas pequeñas inhibidoras (*Small-Molecule Inhibitors*). Destacaron el valor de la vía LIN28/let-7 como un objetivo farmacológico, ya que múltiples proteínas oncogénicas que regula la vía se consideran no farmacológicas debido a su ubicación celular inaccesible y la falta de cavidades para la unión de pequeñas moléculas.

III. JUSTIFICACIÓN

El eje regulador LIN28/let-7 tiene un impacto profundo en diversos procesos biológicos de los mamíferos, incluida la pluripotencialidad de las células madre, el desarrollo, el metabolismo de la glucosa, la regeneración de tejidos, el crecimiento de organismos y las edades de inicio de la menopausia y la pubertad en humanos. Aparte de su papel como reguladores del desarrollo, las proteínas LIN28 son oncogenes reactivados en aproximadamente el 15 % de todos los cánceres analizados, funcionando en gran medida a través de su represión de los let-7.

Apuntar a la interacción proteína-RNA de LIN28 y let-7 es una estrategia prometedora para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer. Sin embargo, actualmente hay un número limitado de inhibidores que interrumpen eficazmente la interacción LIN28/let-7. Buscar nuevas moléculas de origen biológico que promuevan la biogénesis de los miRNAs let-7 puede contribuir al desarrollo de nuevos tratamientos contra las manifestaciones que implican la desregulación de LIN28/let-7.

IV. HIPÓTESIS

Si las características estructurales de la región preE de la familia de let-7 es la responsable de la interacción con LIN28B entonces una molécula sintética preE-let-7 que conserva los motivos estructurales de interacción competirá por la unión a la proteína Lin28B.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Verificar la interacción entre el análogo sintético preE-let-7 y LIN28B

5.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar las moléculas controles pre-miR-98 (control positivo) y pre-miR-18b (control negativo), así como el preE-let-7 de estudio, en sus análogos de DNA y RNA correspondientes mediante síntesis química *in vitro*.
2. Obtener la proteína LIN28B recombinante purificada en bacteria.
3. Caracterizar la cinética de interacción entre los análogos de DNA y RNA con LIN28B mediante ensayos de retardamiento electroforético (EMSA).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Sondas de RNA

6.1.1 Generación de la doble cadena

Para la generación de las moléculas de RNA se partió de moldes y cebadores de DNA sintetizados por T4 oligo® (DNA Artificial S.A. de C.V., Irapuato), los cuales contienen el promotor para la RNA polimerasa del fago T7 y la secuencia específica (Tabla 1).

Tabla 1. Moldes y cebadores para la generación del cDNA

Nombre	Secuencia (5'-3')	Longitud (b)
preE-let-7 molde	CGTAATACGACTCACTATAGGGCGCCGAGAGGGATTAGCTCCATTGA AGGGCG	55
preE-let-7 Fw	CGTAATACGACTCACTATAGGG	22
preE-let-7 Rv	CGCCCTCAATGGAGCTAAATC	22
pre-miR-98 molde	CGTAATACGACTCACTATAGGGAGGATTCTGCTCATGCCAGGGTGAG GTAGTAAGTTGTATTGTTGTGGGGTAGGGATATTAGGCCCAATTAG AAGATAACTATAACAATACTACTTTCCCTGGTGTGTGGCATATTCA	141
pre-miR-98 Fw	CGTAATACGACTCACTATAGGGAGG	25
pre-miR-98 Rv	TGAATATGCCACACACCAGG	20
pre-miR-18b molde	CGTAATACGACTCACTATAGGGTGTGTTAAGGTGCATCTAGTGCAGTT AGTGAAGCAGCTTAGAATCTACTGCCCTAAATGCCCTTCTGGCA	93
pre-miR-18b Fw	CGTAATACGACTCACTATAGGGTGTG	26
pre-miR-18b Rv	TGCCAGAAGGGGCATTTAG	19
Se muestra en rojo la secuencia del promotor de la T7 RNA polimerasa		

Se generó DNA de doble cadena de los precursores pre-miR-98 y pre-miR-18B y de la molécula preE-let-7 mediante PCR con la siguiente mezcla de reacción: Buffer Tag 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 2 mM c/u (R0191, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA), cebador *forward* (Fw) 0.25 µM, cebador *reverse* (Rv) 0.25 µM, Taq DNA polimerasa 2.5 U/µL (EA500, Biotecnologías Moleculares S.A. de C.V., Cd. de México), 10⁷ moléculas de molde sintético y agua libre de nucleasas. Se utilizaron las siguientes condiciones de

amplificación: desnaturalización inicial de 95 °C durante 3 min; 30 ciclos de desnaturalización de 94 °C durante 30 s, alineamiento de 58.4 °C durante 30 s y extensión de 72 °C durante 32 s; más una extensión final de 72 °C durante 5 min. Los amplicones se visualizaron en un gel nativo de acrilamida: bis-acrilamida en relación 19:1 al 8 % en buffer de corrida TBE 1X (Tris-base 90 mM pH 8.3, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM) durante 1 h a 100 V.

6.1.2 Transcripción *In Vitro*

La amplificación por PCR de los moldes se utilizó para generar plantillas de DNA para la transcripción *in vitro* de los RNA marcados con fluorescencia. Estas plantillas de DNA se purificaron en gel y la reacción se realizó de acuerdo con el protocolo modificado para Transcripción *In Vitro* (Roche) utilizando 12-UTP-Fluoresceína (11427857910, Roche Diagnostics, Indianapolis IN USA) para el marcaje. Se utilizó la siguiente mezcla de reacción: Buffer de transcripción 1X, DTT 5 mM (R0861, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA), ATP/CTP/GTP 1 mM c/u (R0481, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA), UTP/12-UTP Fluoresceína 0.65/0.35 mM, DNA molde purificado 1 µg, RiboLock™ 50 U (EO0382, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA), T7 RNA polimerasa 30 U (EP0111, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA), agua libre de nucleasas tratada con DEPEC hasta un volumen de 60 µL. Se incubó la reacción a 37 °C durante 2 h. Finalmente se añadió DNasa I libre de RNasa 3 U y se volvió a incubar la reacción a 37 °C durante 1 h.

6.1.3 Purificación de la TIV

Para la purificación la mezcla de transcripción fue tratada con buffer STOP 2X (EDTA 0.5 mM, azul de bromofenol 0.01 % (p/v), formamida 95 % (v/v)), se calentó a 65 °C durante 10 min seguido de baño de hielo 5 min. Se corrieron en un gel desnaturalizante mediano con urea 7 M de PA (19:1) 18 % durante 8 h a 400 V. La banda correspondiente al producto se cortó y colocó en buffer de elución de ácidos nucleicos (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaOOCCH₃ 0.25 mM, EDTA 1 mM, SDS 0.25 % (p/v)) e incubó a 4 °C durante 24 horas. El RNA eluido se filtró por 0.45 µm seguido de una extracción Fenol ácido: Cloroformo (AM9720, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA USA). Se colectó la fase acuosa y se añadió 0.1 volumen de acetato de amonio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto para precipitación a -20 °C durante 2 h. Pasado el tiempo se centrifugó

a 17,460 x g durante 1 h y a la pastilla se le realizaron dos lavados con etanol 75 % (v/v). Los RNAs fríos se cuantificaron en el espectrofotómetro Nanodrop 2000® (Thermo Scientific). A los RNAs fluoresceinados se les midió la intensidad de fluorescencia en el fluorómetro Synergy HTX (Bio Tek Instruments Inc., Winooski VE USA) y se calculó la molaridad de estos para los ensayos posteriores. Los RNAs purificados se corrieron en un gel desnaturante con urea 7 M de acrilamida: bis-acrilamida (19:1) 8 % durante 1 h a 100 V en buffer TBE 1X.

6.2 Sondas de DNA

Las moléculas de DNA de simple cadena (ssDNA) marcadas con fluoresceína fueron sintetizadas por T4 oligo® (DNA Sintético) como se ilustra en la tabla 2.

Tabla 2. Sondas de ssDNA marcadas con fluoresceína

Modificación en 5'	Nombre	Secuencia (5'-3')	Longitud (b)
6-FAM	preE-let-7	CGCCGGAGAG GGATT AGCTCCATT GAAGGGCG	33
6-FAM	pre-miR-98	AGGATTCTGCTCATGCCAGGGTGAGGTAGTAAGTTGTATTGTTGTGG GGTAG GGAT ATTAGGCCCAATT GAAG ATAACTATACAACCTACTAC TTCCCTGGTGTGTGGCATATTCA	119
6-FAM	pre-miR-18b	TGTGTTAAGGTGCATCTAGTGCAGTTAGTGAAGCAGCTTAGAATCTAC TGCCCTAAATGCCCTTCTGGCA	71
6-FAM: 6-Carboxifluoresceína Se muestra en negrita los motivos de interacción con LIN28			

6.2.1 Purificación de las sondas de ssDNA

Las sondas fueron purificadas siguiendo el protocolo de purificación anterior con las siguientes modificaciones. La extracción se realizó con Fenol saturado:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1 (v/v)) y la precipitación se hizo con acetato de sodio 3M.

6.3 Síntesis del ssDNA 5'-FAM pre-miR-98

Los cebadores para la síntesis de dsDNA 5'-FAM pre-miR-98 fueron producidos por T4 oligo® (DNA Sintético) como se ilustra en la tabla 3.

Tabla 3. Cebadores modificados para la síntesis de dsDNA 5'-FAM pre-miR-98

Modificación en 5'	Nombre	Secuencia (5'-3')	Longitud (b)
6-FAM	pre-miR-98 Fw	AGGATTCTGCTCATGCCAGGG	21
Fosfato	pre-miR-98 Rv	TGAATATGCCACACACCAGGG	21

6.3.1 Generación de dsDNA 5'-FAM pre-miR-98

Se generó DNA de doble cadena marcado con 5'-FAM la cadena con sentido y 5'-P la cadena antisentido con la siguiente mezcla de reacción: Buffer Tag 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 2 mM c/u (R0191, Thermo Fisher), cebador 5'-FAM (Fw) 300 nM, cebador 5'-P (Fw) 300 nM, Taq polimerasa 2.5 U/μL (EA500, Biotecnologías Moleculares), 80 ng de molde sintético y agua libre de nucleasas. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial de 95 °C durante 3 min; 30 ciclos de desnaturalización de 94 °C durante 30 s, alineamiento de 61.5 °C durante 30 s y extensión de 72 °C durante 32 s; más una extensión final de 72 °C durante 5 min. Los amplicones se visualizaron en un gel nativo de acrilamida: bis-acrilamida (19:1) al 8 % en buffer de corrida TBE durante 1 h a 100 V.

6.3.2 Generación de DNA de cadena sencilla (ssDNA) 5'-FAM pre-miR-98

Se generó el DNA de simple cadena con la exonucleasa lambda de acuerdo con el fabricante (M0262, New England Biolabs Inc., Ipswich MA USA). Se empleó la siguiente mezcla de reacción: 5 μg de dsDNA, buffer de reacción 1X, exonucleasa lambda 5 U y agua libre de nucleasas hasta 50 μL. La reacción se incubó a 37 °C durante 30 min y posteriormente se detuvo a 75 °C por 10 min. El producto se purificó siguiendo los pasos de purificación para las sondas de DNA anteriormente descrito.

6.4 Producción de la proteína LIN28B recombinante

6.4.1 Plásmido pGST-LIN28B

La construcción para la expresión de la proteína LIN28B fue diseñada por Franco-Urquijo, 2018 y su metodología se describe brevemente a continuación. La secuencia del gen *lin28B* humano se amplificó a partir un plásmido comercial (OriGene sc-300636) con cebadores flanqueados con los sitios de corte para las enzimas BamHI y Sall. Esta secuencia amplificada se digirió con las respectivas enzimas de restricción y fue purificada por gel para posteriormente llevar a cabo una reacción de ligación con el vector pGEX-4T-1 previamente digerido y purificado. La secuencia clonada fue amplificada por PCR utilizando los cebadores pEGX y el producto se verificó mediante secuenciación automatizada.

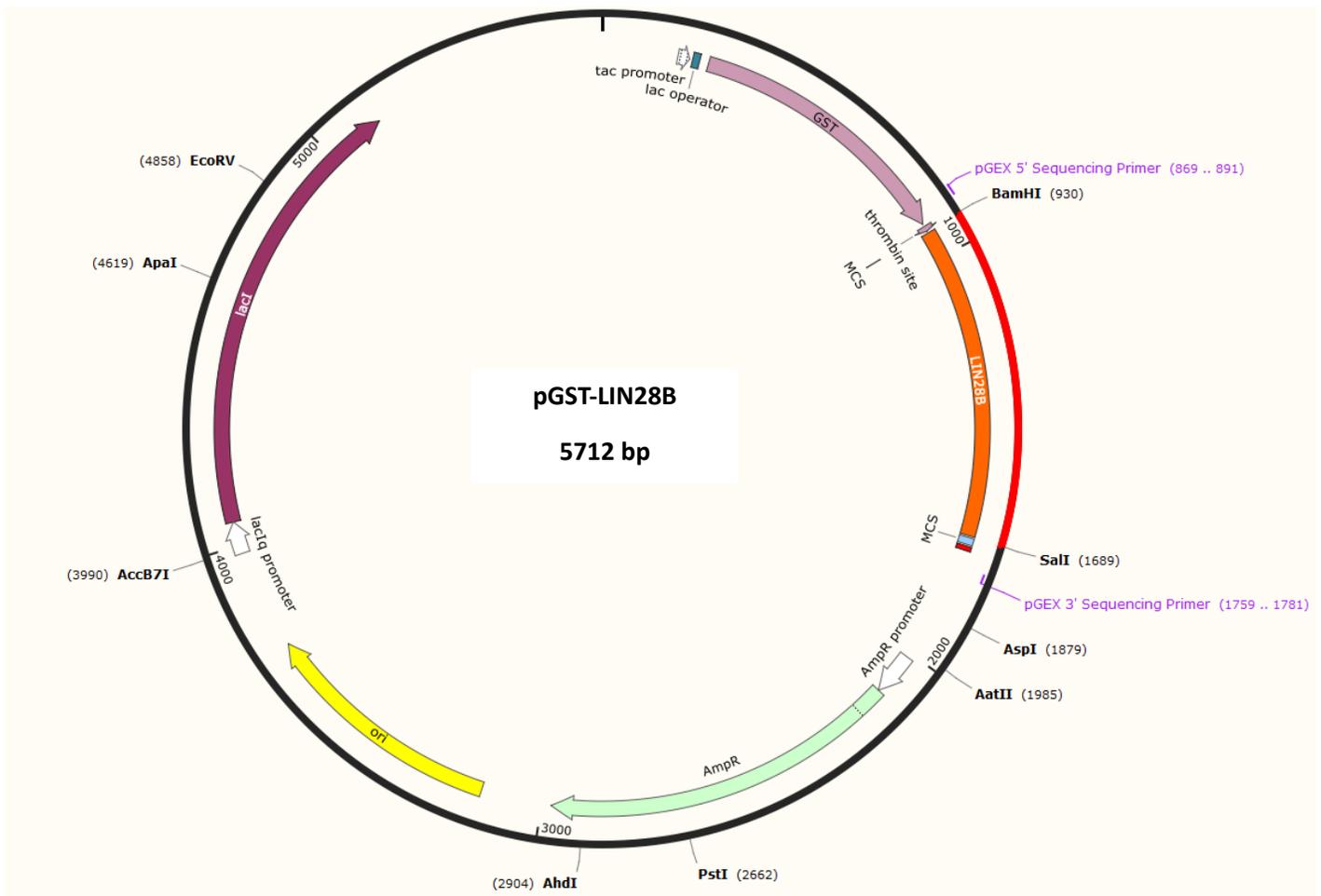


Figura 6: Mapa de restricción del plásmido pGEX-4T-1 clonado con el gen *lin28B* humano. Creado y visualizado con SnapGene®

6.4.2 Transformación de *Escherichia coli* Rosetta con el plásmido pGST-Lin28B

En un vial se añadió 50 µL de *E. coli* Rosetta [*F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm* (DE3) pRARE (Cam^R)] químicamente competentes con 200 µg de plásmido pGST-LIN28B. Se incubaron 30 min en hielo, 2 min a 42 °C, 3 min en hielo y se añadió a la mezcla de transformación 1 mL de medio SOC. Se realizó una primera incubación a 37 °C en agitación de 200 rpm durante 1 h. Pasado el tiempo el cultivo se centrifugó a 6000 x g durante 5 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla de bacterias se resuspendió y se plaqueó en LB agar condicionado con ampicilina (150 µg/mL) y cloranfenicol (30 µg/mL) para realizar la segunda incubación a 37 °C durante 16 h.

6.4.3 Expansión-Inducción de bacterias transformadas

Se sembraron colonias aisladas en 3 mL en medio LB con ampicilina (150 µg/mL) y cloranfenicol (30 µg/mL) a 37 °C en agitación 200 rpm durante 16 h. Posteriormente se realizaron expansiones en 50 y 100 mL. Durante esta última se dejó crecer el cultivo hasta alcanzar una DO₆₀₀ 0.35-0.4 en 3.5 h. Para la expresión de proteínas, el cultivo fue inducido con 33 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 37 °C durante 1.5 h. Se utilizó otro cultivo sin inducir como control negativo de expresión.

6.4.4 Purificación de la proteína LIN28B recombinante

Posterior al tiempo de inducción los cultivos se centrifugaron a 12000 g en 10 min, se desechó el sobrenadante para recolectar las pastillas de bacterias. Se añadió 1.5 mL de buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, EDTA 1mM, IGEPAL 0.5 % (v/v), 0.5 mM AEBSF) por cada pastilla seguido por sonicación de 10 rondas (Pulso 85 % amplitud 10 s y descanso 30 s) en un sonicador ultrasónico. El extracto se centrifugó 10 min a 17,460 x g en condiciones refrigeradas 4 °C y se colectó el sobrenadante. Por cada 1 mL de sobrenadante se añadieron 150 µL de perlas de glutatión-agarosa (16101, Thermo Scientific™) para posterior incubación de 1.5 h en cámara fría 4 °C y en agitación constante. Una vez terminado el tiempo de incubación se centrifugó 1 min a 17,460 x g, se retiró el sobrenadante y se agregó PBS 1X pH 7.3 (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM) filtrado para lavar las perlas. Se repitió este último paso 15 veces y se resuspendieron las perlas en 80 µL de PBS 1X filtrado. Se añadieron 5 U de trombina de plasma bovino (T7513, Merck & Co., Inc., Rahway NJ USA) y se dejaron incubando 12 h a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugo 1 min a 17,460

x g y se colectó el primer sobrenadante (SN1). Se añadió nuevamente 80 μ L de PBS 1X y se repitió el paso anterior 2 veces más para obtener el sobrenadante 2 (SN2) y 3 (SN3). La proteína fue cuantificada utilizando el kit Pierce® BCA Protein Assay (23225, Thermo Scientific™).

6.4.5 Electroforesis SDS-PAGE

Las muestras fueron tratadas con buffer Laemmli 2X (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glicerol 25 %, SDS 2 %, β -mercaptoetanol 2 % (v/v), azul de bromofenol 0.01 % (p/v)) y se llevaron a ebullición durante 5 min. La electroforesis se llevó a cabo en geles de acrilamida: bis-acrilamida (29:1) utilizando un gel concentrador al 4 % (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 0.1 % (p/v)) y un gel separador al 10 % (Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 0.1 % (p/v)) en buffer Tris-Glicina-SDS (Tris 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, SDS 0.1 % (p/v)) durante 20 min a 80 V y posterior aumento de voltaje a 125 V durante 2 h. Terminada la corrida el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie® G 250 durante 1 h en agitación con posterior limpieza en solución de destinción (Ácido acético 10 %, metanol 50 % y agua destilada 40 % (v/v)).

6.4.6 Inmunotransferencia (*Western blot*)

Posterior a la corrida de las muestras en SDS-PAGE descrita anteriormente el gel se transfirió a una membrana de PVDF (IPVH00010 Millipore Corporation, Bedford MA) en buffer de transferencia (Tris-base 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, metanol 20 % (v/v)) utilizando un Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules CA USA) bajo las condiciones de 7 min. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5 % en PBS-Tween 0.01 % durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo anti-LIN28B policlonal (sc-130802, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz CA USA) o anti-LIN28B monoclonal (EPR18717, Abcam Ltd., Cambridge UK) 1:2000 en PBS-Tween 0.01 %, en agitación suave a 4 °C durante 12 h. Se lavó la membrana tres veces con PBS-Tween 0.01 % y se incubó con el anticuerpo secundario anti-rabbit (sc-2357, Santa Cruz) 1:50000 en PBS-Tween 0.01 % a temperatura ambiente durante 1 h. Finalmente se realizaron los tres últimos lavados en PBS-Tween 0.1% y se añadió el reactivo Luminata Forte ELISA HRP (WBLUF0500, Millipore) para incubación 1 min. El revelado se realizó en un C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR Biosciences Inc., Lincoln NE USA) usando el protocolo estándar.

6.5 Ensayos de retardamiento electroforético (EMSA)

50 nM de DNA o RNA etiquetados con fluoresceína fueron incubados con 300-1000 nM de LIN28B purificada en una reacción de 20 µl que contenía Tris-HCl 20 mM pH 8.6, NaCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, glicerol 10 %, DTT 5 mM y 40 U de Ribolock® (para sondas de RNA). El tiempo de incubación fue de 1 h a 25 °C. Las muestras se cargaron en un gel nativo de acrilamida:bis-acrilamida (37.5:1) 8 % y se corrieron a 100 V en buffer TB 0.5X frio. Los geles se leyeron en un fotodocumentador de imágenes ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad) en la función *Fluorescein* (Filtro 1) para ácidos nucleicos. Las imágenes fueron visualizadas con el software Image Studio 6.0 y se determinó el porcentaje de unión (Sonda unida * 100/ (sonda unida + sonda libre)). Los datos se ajustaron a una función de unión específica de un sitio con una pendiente de Hill, considerando así una posible unión cooperativa. Se utilizó la siguiente ecuación de unión del modelo de regresión no lineal de GraphPad Prism versión 8.0:

$$B = \frac{B_{max} * [P]^h}{K_d + [P]^h}$$

donde B representa la cantidad de complejo en función de la concentración de proteína [P], B_{max} es la fracción máxima observada del complejo, h es el coeficiente de Hill y K_d es la constante de disociación.

6.6 Predicción de la estructura secundaria de los precursores

Para obtener la estructura secundaria se realizó un análisis *in silico* en el servidor RNAstructure del Mathews Lab (<https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructure.html>) utilizando las secuencias de DNA y RNA de cada precursor, así como la molécula de estudio. Se modeló la estructura bajo los siguientes parámetros Temperatura: 298 K, Tamaño Máximo del Bucle: 30, Diferencia Máxima de Energía en % (MFE, MEA): 10, Número Máximo de Estructuras (MFE, MEA): 20, Tamaño de Ventana (MFE, MEA): 3, Gamma (MEA): 1, Iteraciones (Predicción de Pseudonudos): 1, Longitud Mínima de Hélice (Predicción de Pseudonudos): 3.

VII. Resultados

7.1 Síntesis *in vitro* de las sondas de RNA

7.1.1 Generación de los moldes de doble cadena

En nuestro laboratorio utilizamos la técnica de Transcripción *In Vitro* (TIV) para generar los transcritos de estudio. Para realizar la TIV se diseñaron los moldes y cebadores de las moléculas controles pre-miR-98 (control positivo) y pre-miR-18b (control negativo), y la molécula de estudio preE-let-7 acoplados al promotor de la RNA polimerasa del fago T7. Estos oligodeoxinucleótidos se sintetizan químicamente por el método de las fosforamiditas en fase sólida. Como son moléculas de DNA de cadena simple (ssDNA) se verificó su integridad en electroforesis desnaturizante (Figura S1) y se purificaron para la PCR.

La T7 RNA polimerasa además de su promotor específico necesita una doble cadena de DNA (dsDNA) para poder asentarse. Con este fin se generó la doble cadena mediante PCR de punto final como se muestra en la figura 7. Se estableció una temperatura de fusión media de los cebadores para las tres moléculas lo que permitió realizar las reacciones bajo el mismo ciclaje.

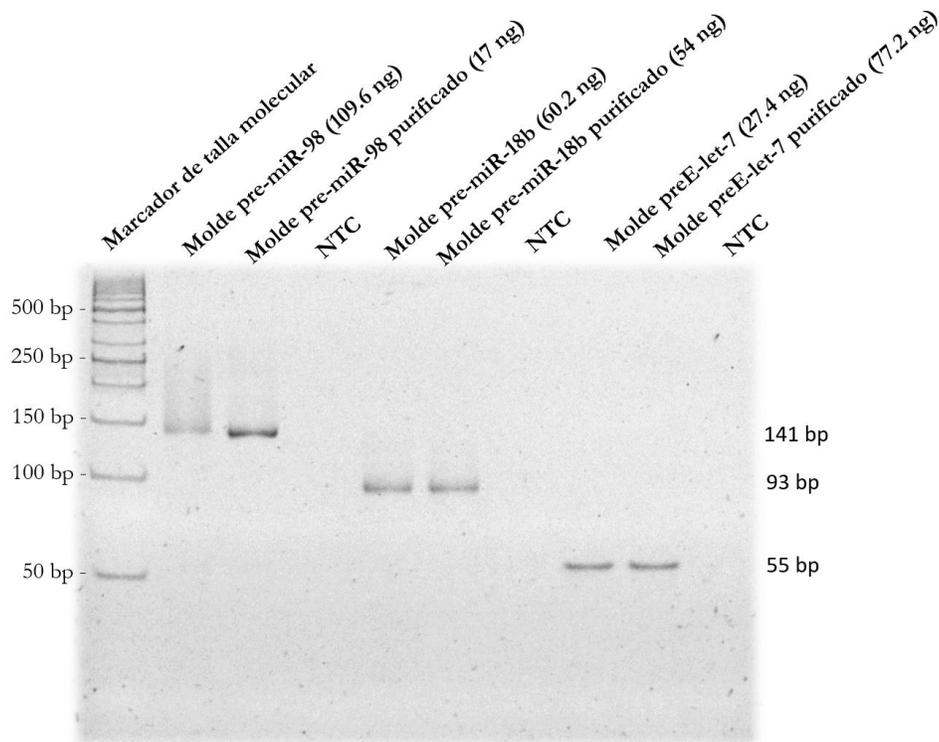


Figura 7. PCR de los moldes para la generación de la doble cadena: A la derecha se indican las migraciones electroforéticas de los moldes dsDNA con sus tallas moleculares sin purificar y purificados. NTC (Control sin molde no amplificado).

Los amplicones producidos migraron al peso molecular esperado para la doble cadena. Se corrió cada reacción por duplicado, pero con el molde sin purificar y purificado. Para moléculas de mayor talla molecular como pre-miR-98, su purificación favoreció la generación del amplicón con menor cantidad de molde. Debido a su talla que se generan mayor cantidad de productos truncados durante la síntesis química una purificación adecuada concentra el molde de talla esperado aumentando la eficiencia de la PCR. Para el caso de moldes de menor talla como pre-miR-18b y preE-let-7 no se observaron diferencias en cuanto a la purificación de los moldes y la generación de amplicones.

7.1.2 Generación de los transcritos fluorescentes

Se realizó primeramente la TIV con ribonucleótidos no marcados o “fríos” (Figura S2) para verificar la eficiencia de la transcripción. Posteriormente se llevó a cabo la reacción con el nucleótido fluorescente en dos modalidades: UTP/12-UTP-Fluoresceína y 12-UTP-Fluoresceína (sin UTP). Los resultados se muestran en la figura 8.

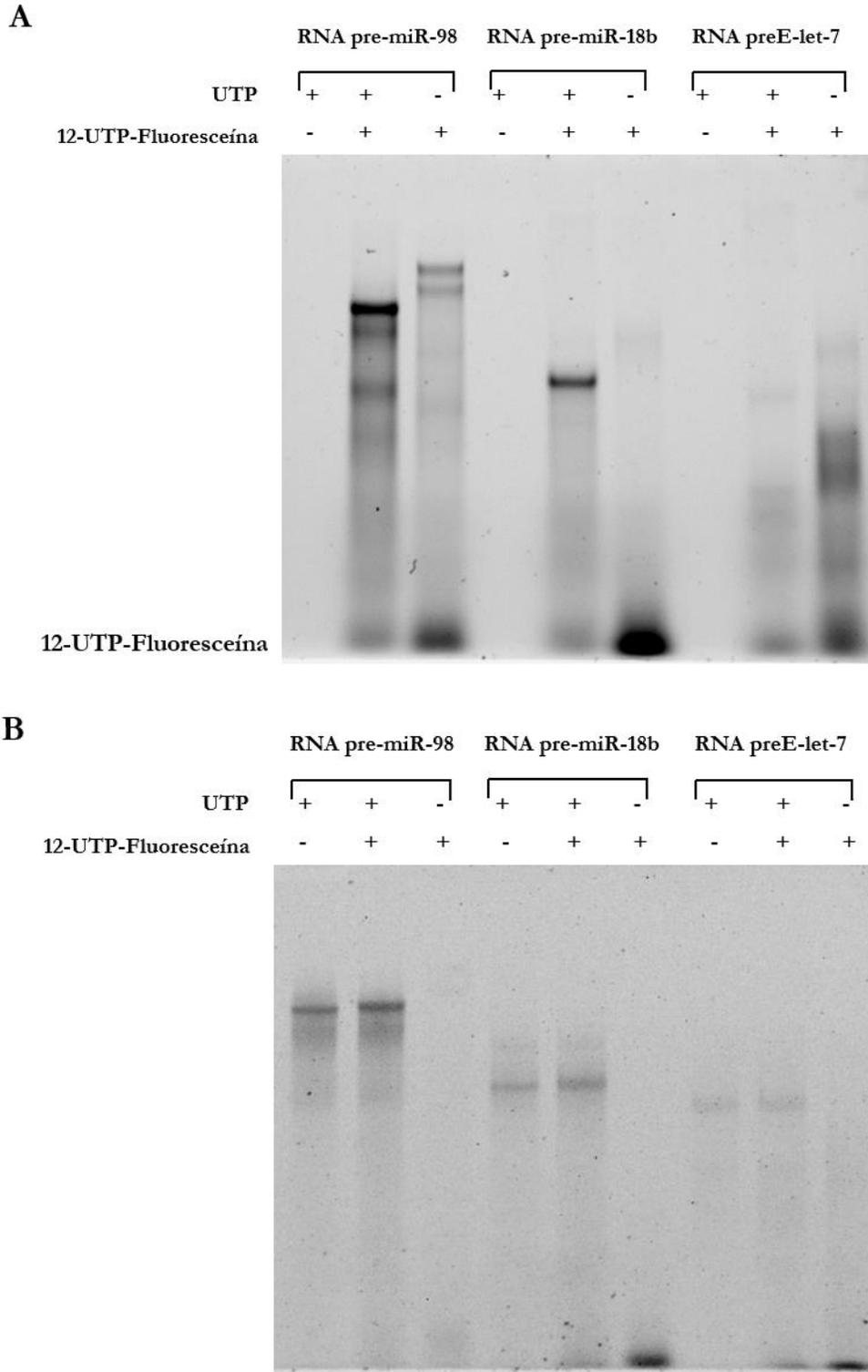


Figura 8: Transcripción *in vitro*. (A) Revelado con el filtro *Fluorescein*. (B) Revelado con el filtro *Ethidium_bromide*

Los amplicones incubados con el reactivo 12-UTP-Fluoresceína incorporaron el nucleótido fluorescente al RNA como puede observar bajo el filtro *Fluorescein* del Chemidoc. Sin embargo, tanto la concentración del reactivo como la longitud del amplicón impactaron sobre la eficiencia de la transcripción.

Primeramente, cuando se incubó la reacción con los ribonucleótidos sin UTP y 12-UTP-Fluoresceína no se obtuvieron transcritos marcados. Debido a esto se observan bandas bien definidas correspondientes a 12-UTP-Fluoresceína en el final del gel (Figura 8A). La síntesis enzimática se restableció cuando se incubó la reacción con ribonucleótidos y la mezcla UTP /12-UTP-Fluoresceína como se observa para los RNA pre-miR-98 y pre-miR-18b. Esto es indicio de que la T7 RNA polimerasa no puede incorporar ribonucleótidos puros acoplados a fluoróforos ya que según su tamaño no deben acoplarse adecuadamente en el bolsillo de la enzima y por tanto se cae la transcripción. Se necesitan los 4 ribonucleótidos fríos más el marcado para que la reacción se lleve a cabo. Como consecuencia el marcaje de las uridinas en el RNA no es total, sino parcial donde a lo largo de la molécula va a haber uridinas marcadas y no marcadas.

A pesar de haber determinado la relación idónea de UTP /12-UTP-Fluoresceína para la TIV aun así no fue posible sintetizar el RNA preE-let-7 marcado lo que conllevó a la hipótesis del efecto de la longitud del amplicón sobre la eficiencia de la transcripción. Conforme disminuye la longitud del amplicón se sintetizan menos transcritos (RNA pre-miR-98 > RNA pre-miR-18b > RNA preE-let-7). Como no hay estudios publicados al respecto se infiere que la T7 RNA polimerasa no puede asentarse adecuadamente en moldes pequeños (<70 pb) y además como la secuencia a transcribir es muy corta disminuye su procesividad y se cae generando más transcritos truncados e iniciando más ciclos de transcripción.

Por último, el gel se impregnó con bromuro de etidio para ver la migración de los RNA fríos contra los marcados (Figura 8B). Para el caso de los RNA pre-miR-98 y pre-miR-18b las sondas marcadas presentaron una menor movilidad electroforética comparada con los RNA fríos. Esto se debe al tamaño molecular de la fluoresceína, con un tamaño similar a un nucleótido, promueve el retratamiento.

7.2 Síntesis *in vitro* de las sondas de DNA

Las sondas de ssDNA marcadas en 5'-FAM e al igual que los moldes y cebadores para la TIV se generaron por síntesis química por lo que se procedió a su verificación (Figura 9) y posterior purificación (Figura S3).

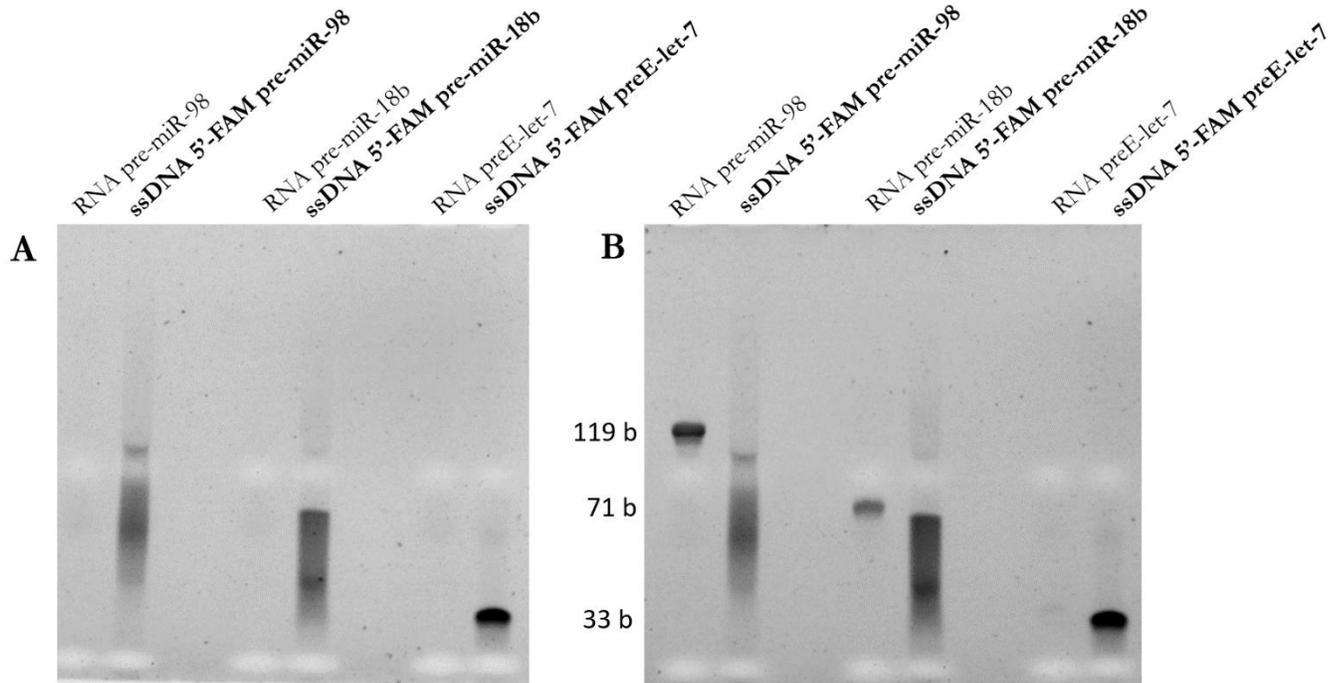


Figura 9. Análisis de las sondas de ssDNA marcadas en 5'-FAM en gel desnaturalizante: (A) Revelado con el filtro *Fluorescein*. (B) Revelado con el filtro *Ethidium bromide*. Se emplearon como marcadores de talla molecular los RNA fríos purificados.

Por este método clásico de síntesis química de fosoramiditas se logró producir los ssDNA 5'-FAM pre-miR-18b y preE-let-7. Los DNA fluoresceinados presentaron una movilidad electroforética ligeramente mayor que los RNAs fluoresceinados debido al número de fluoresceínas acopladas. En cuanto a ssDNA 5'-FAM pre-miR-98 la síntesis no fue específica por lo que no se observa una banda definida en el gel de purificación. Se infiere que sea por la adición del 5'-FAM ya que el molde para la TIV sí pudo sintetizarse. Por tanto, se diseñó una nueva alternativa para su generación.

7.3 Síntesis enzimática de la sonda 5'-FAM pre-miR-98

Para sintetizar de forma enzimática un DNA de simple cadena primero es necesario generar la doble cadena. Para ello se diseñaron cebadores modificados en el extremo 5': *forward* (5'-FAM) y *reverse* (5'-Fosfato). Se realizó una PCR utilizando el mismo molde para la TIV de pre-miR-98. El cebador *forward* (5'-FAM) generó la cadena de interés marcada y el cebador *reverse* (5'-Fosfato) su complementaria (Figura 10 A/B).

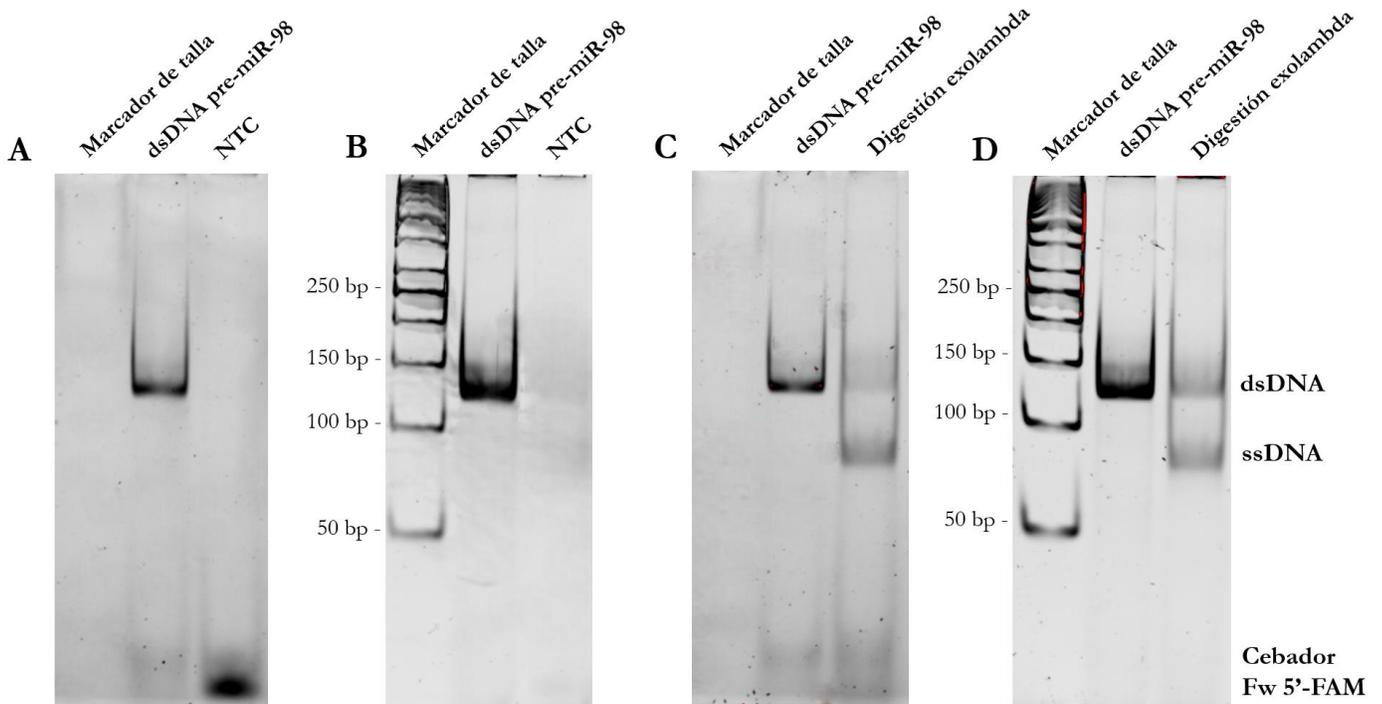


Figura 10. Síntesis enzimática del ssDNA 5'-FAM pre-miR-98: (A y B) PCR para generar el dsDNA revelado con el filtro *Fluorescein* y *Ethidium_bromide* respectivamente. (C y D) Digestión de la PCR con exonucleasa lambda revelado con el filtro *Fluorescein* y *Ethidium_bromide* respectivamente.

El próximo paso fue generar el ssDNA, para ello se realizó una reacción de digestión la exonucleasa lambda (Figura 10 C/D). Esta exonucleasa tiene la peculiaridad de catalizar la eliminación de nucleótidos del DNA bicatenario lineal o mellado en la dirección de 5' a 3'. Sin embargo, lo que la hace altamente específica es que su sustrato preferido es el DNA bicatenario 5' fosforilado, aunque los sustratos no fosforilados se degradan a una velocidad muy reducida. Una vez que se realiza la reacción se observan dos bandas en

la electroforesis, la de menor intensidad que menos migra correspondiente a dsDNA no digerido y una banda mayoritaria de mayor migración correspondiente al ssDNA.

Según especificaciones del fabricante la digestión con exonucleasa lambda se considera una reacción incompleta ya que mayores tiempos de incubación y concentración de enzimas puede degradar el ssDNA. Incluso marcar el extremo 5' con una molécula de FAM no es motivo de bloqueo de su actividad, aunque lo hace con mucho menor radio que con un extremo 5' fosforilado.

El rendimiento de la reacción para las condiciones experimentales empleadas no fue óptimo (Figura S4) por lo que su purificación de la sonda fue poco eficiente. Esto conllevó a que no pudieran realizarse su ensayo de interacción con LIN28B.

7.4 Producción de la proteína recombinante LIN28B

7.4.1 Ensayo de restricción del plásmido pGST-LIN28B

El plásmido pGST-LIN28B se empleó para obtener la proteína LIN28B. Se verificó primeramente su integridad para determinar si era óptimo para la transformación bacteriana (Figura 11). El plásmido sin digerir muestra una sola banda correspondiente a un confórmero resultado de una eficaz purificación. Cuando se digirió con una sola enzima de restricción BamHI o Sall se produjo el plásmido lineal con una talla de 5712 bp. Finalmente, cuando se realizó la doble digestión el fragmento clonado de 759 bp fue liberado.

pGST-LIN28B	+	+	+	+
BamHI	-	+	-	+
SalI	-	-	+	+

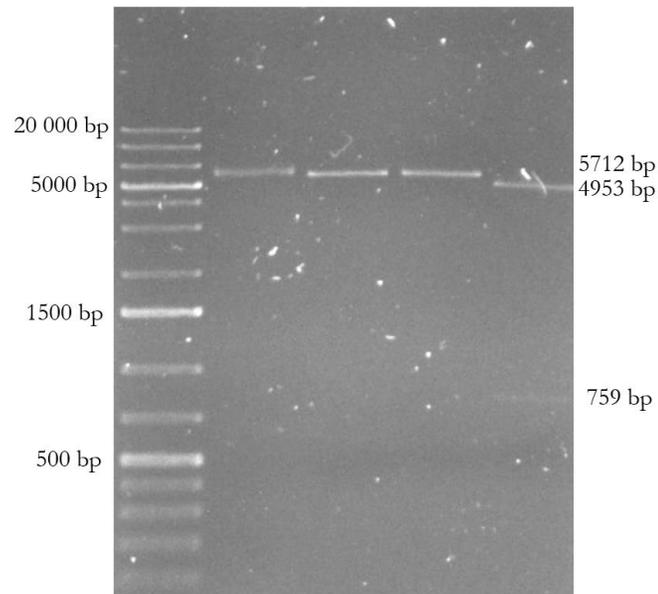


Figura 11. Ensayo de restricción del plásmido pGST-LIN28B. Se muestra el marcador de talla molecular en el primer carril

7.4.2 Generación de las colonias transformadas

Una vez verificado la integridad del vector de expresión se realizó la transformación de la cepa *E. coli* Rosetta (Figura 12). Se generaron un gran número de colonias transformantes probando que ni el plásmido ni la proteína eran tóxicos para la cepa Rosetta.

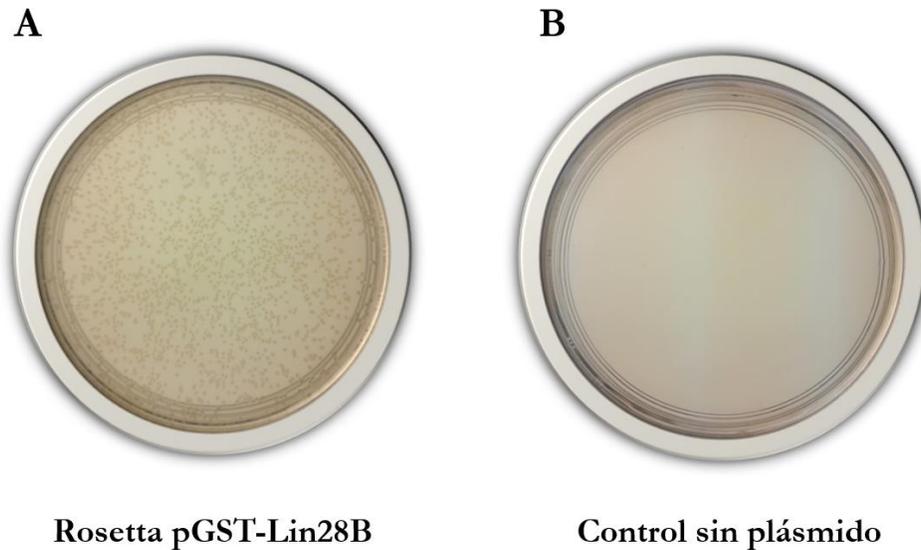


Figura 12. Transformación de *E. coli* Rosetta con el plásmido pGST-LIN28B: (A) Colonias transformadas. (B) Control negativo sin plásmido

7.4.3 Control de la purificación de LIN28B

Se procedió a realizar el control de la purificación de LIN28B (Figura 13). Primeramente, se corrieron los lisados totales sometidos a diluciones 1:10 y 1:25. En los extractos inducidos se aprecia una banda alrededor de los 55 kDa correspondiente a la proteína de fusión que fue capturada con las perlas de glutatión-agarosa, ya que a glutatión S-transferasa (GST) tiene afinidad por el glutatión reducido. Cuando se añade trombina a las perlas el *tag* de GST es liberado ya que se nota la presencia de una banda que migra aproximadamente a 26 kDa (GST). Finalmente, en los sobrenadantes recuperados se obtuvo la proteína purificada LIN28B con un peso molecular alrededor de los 35 kDa. No se ha encontrado una explicación sobre el por qué la LIN28B producida migra a 35 kDa

y no alrededor de los 27 kD que es su peso esperado. Se infiere que sea por el sistema de expresión acoplado a GST.

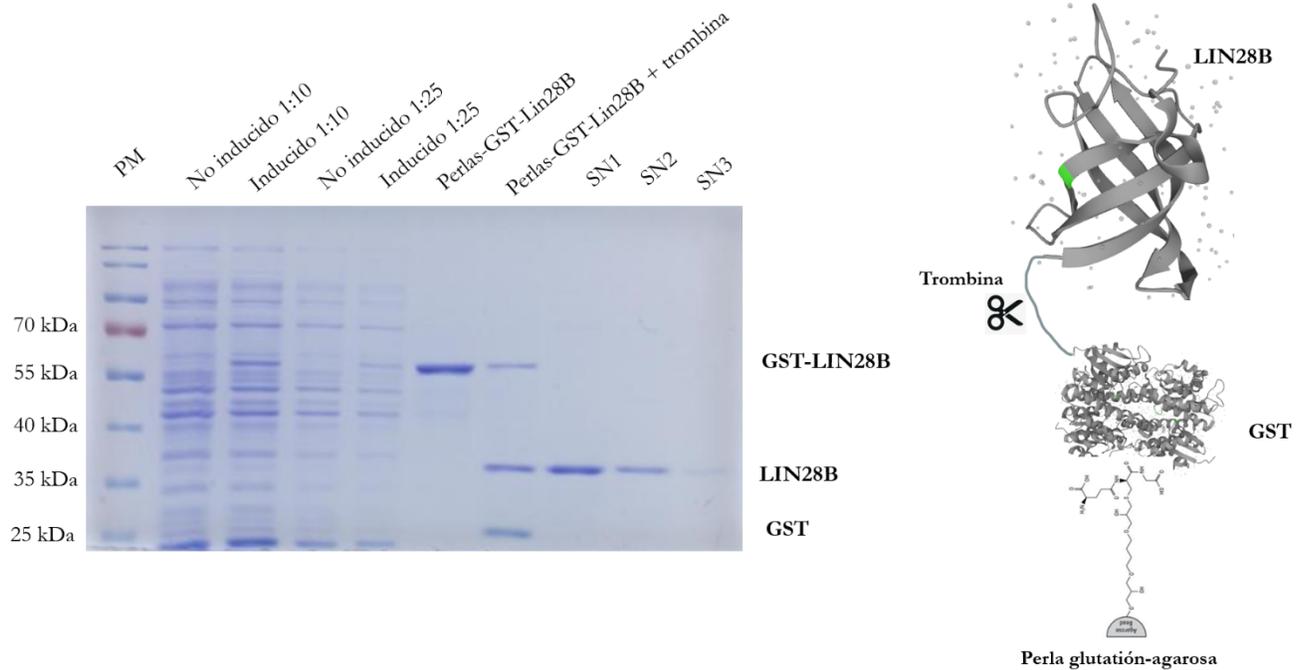


Figura 13. SDS-PAGE I: Tinción con azul de Coomassie G 250 (izquierda). Ilustración de la proteína de fusión GST-LIN28B expresada unida a perla de glutatión-agarosa (derecha)

Al emplear este sistema de expresión, es factible recuperar la proteína LIN28B en cantidades de microgramos por extracción. Después de establecer las condiciones para la recuperación de la proteína LIN28B, se verificó su especificidad a través de electroinmunotransferencia (Figura 14).

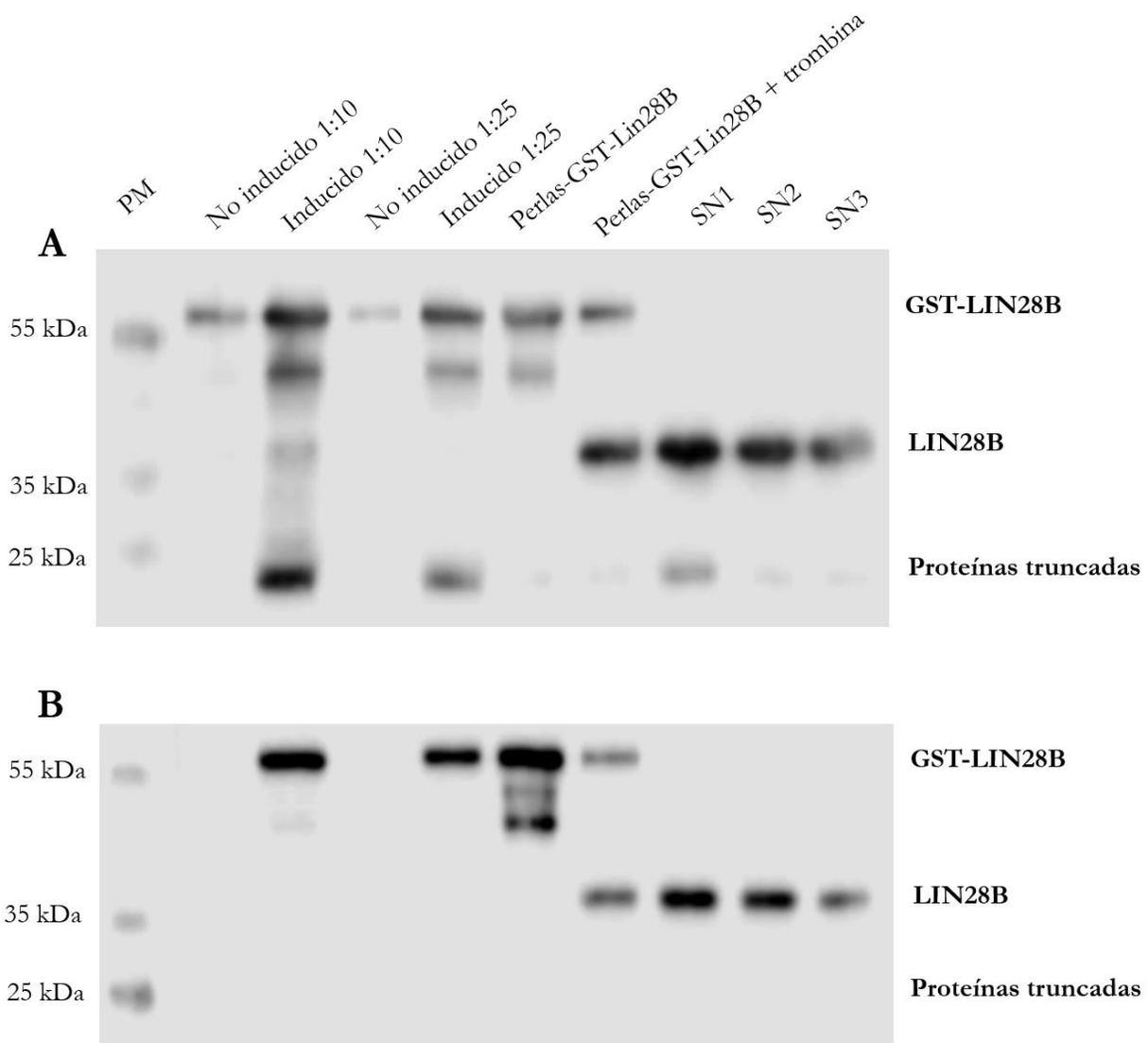


Figura 14. SDS-PAGE II. Inmunotrasferencias contra LIN28B incubadas con diferentes anticuerpos primarios: (A) *Rabbit* monoclonal Anti-LIN28B. (B) *Rabbit* policlonal Anti-LIN28B. PM, marcador de peso molecular

Las inmunotrasferencias revelaron la presencia de LIN28B tanto en su forma de fusión como purificada. Cabe destacar que para estos ensayos en nuestro grupo de trabajo siempre se empleó el anticuerpo policlonal Anti-LIN28B (Figura 14A). Sin embargo, cuando usamos un nuevo anticuerpo monoclonal Anti-LIN28B (Figura 14B) aumentó la sensibilidad de la técnica pudiendo reconocerse hasta la expresión basal de la proteína (no inducida). Otro aspecto importante fue la detección de proteínas truncas o

incompletas en el final del gel cuya concentración disminuye con la dilución de los sobrenadantes.

Para concluir, es importante señalar que se realizaron varias extracciones de proteínas a lo largo de este trabajo, ya que se observó que la proteína LIN28B perdía su capacidad de unión con el tiempo (datos no mostrados). Se decidió utilizar un lote fresco de proteína una vez que el lote anterior alcanzara una vida útil de un mes y medio. De este lote se trabajó con los sobrenadantes más diluidos (SN2 y SN3) debido a la disminución de la cantidad de proteínas trucas.

7.5 Ensayos de interacción de las sondas con LIN28B

7.5.1 Optimización de la concentración de sondas y rango de LIN28B

Para realizar los ensayos de interacción, se tuvo que determinar la cantidad de sonda necesaria que pudiera ser visualizada correctamente en el sistema de fotodocumentación ChemiDoc XRS+ (Figura 15 A). Se observa que a medida que aumenta la concentración del precursor también lo hace la intensidad de la señal. Se concluyó que la concentración óptima para ejecutar los estudios de interacción es de 50 nM, ya que a esta concentración se obtiene una señal visible.

Una vez determinada la concentración óptima las sondas se corrieron en un gel desnaturizante para verificar la calidad de su fluorescencia (Figura 15B). Tanto las sondas de DNA como RNA presentaron lectura bajo el filtro *Fluorescein* del fotodocumentador a la concentración de trabajo.

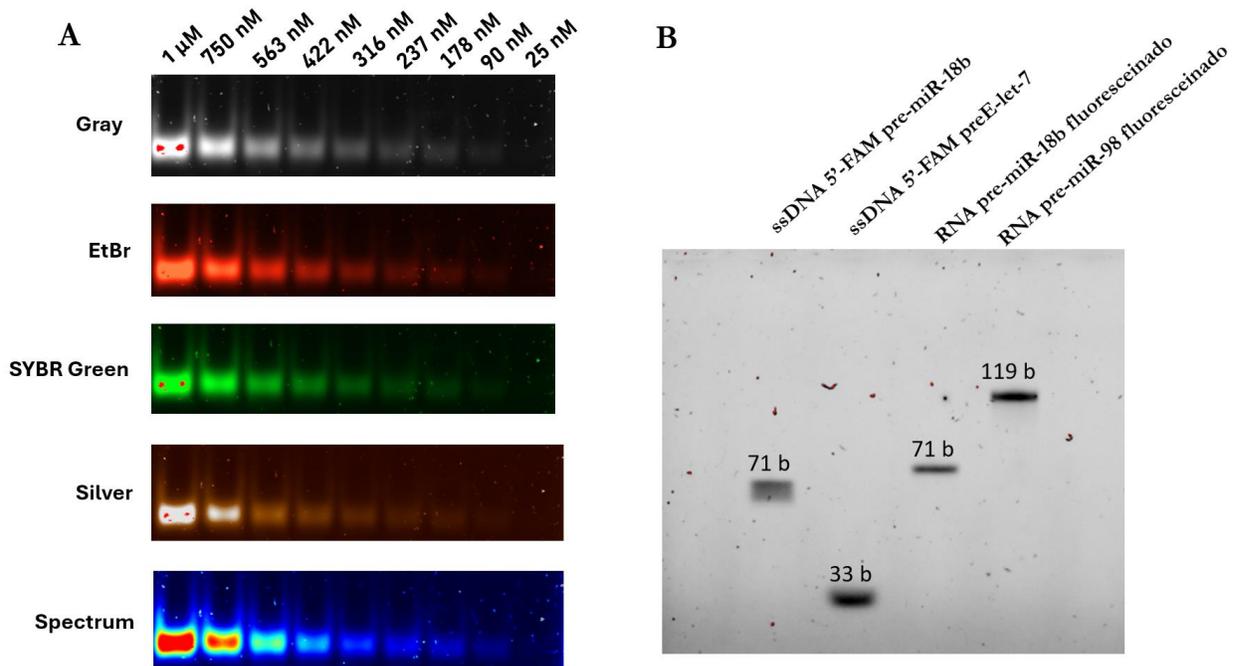


Figura 15. Verificación de la fluorescencia de las sondas: (A) Curva de sensibilidad de ssDNA 5'-FAM-preE en función de la concentración. (B) Gel fluorescente desnaturalizante de las sondas.

Una vez determinada la concentración óptima de sonda a emplea en los EMSA se procedió a calibrar las distintas concentraciones de la proteína LIN28B (datos no mostrados). Se escogió el rango 300 -1100 nM para realizar las interacciones. Cabe destacar que se observó la formación de más de un complejo para cada precursor a partir de una cierta concentración de LIN28B. Sin embargo, se determinó la constante de disociación (K_d) global para cada precursor, ya que el cálculo implica la cantidad de sonda libre o sonda unida, lo que hace imposible determinar las demás constantes de disociación.

7.5.2 Ensayos de retardamiento electroforético (EMSA)

A continuación, se muestran los estudios de interacción para cada precursor con LIN28B, así como sus constantes de disociación.

En la figura 16 se muestra el ensayo de interacción del RNA pre-miR-98 con LIN28B que constituye nuestro control positivo de unión. Como era de esperar, la sonda se unió con alta afinidad siguiendo una curva sigmoide que se corresponde con una cinética de unión cooperativa.

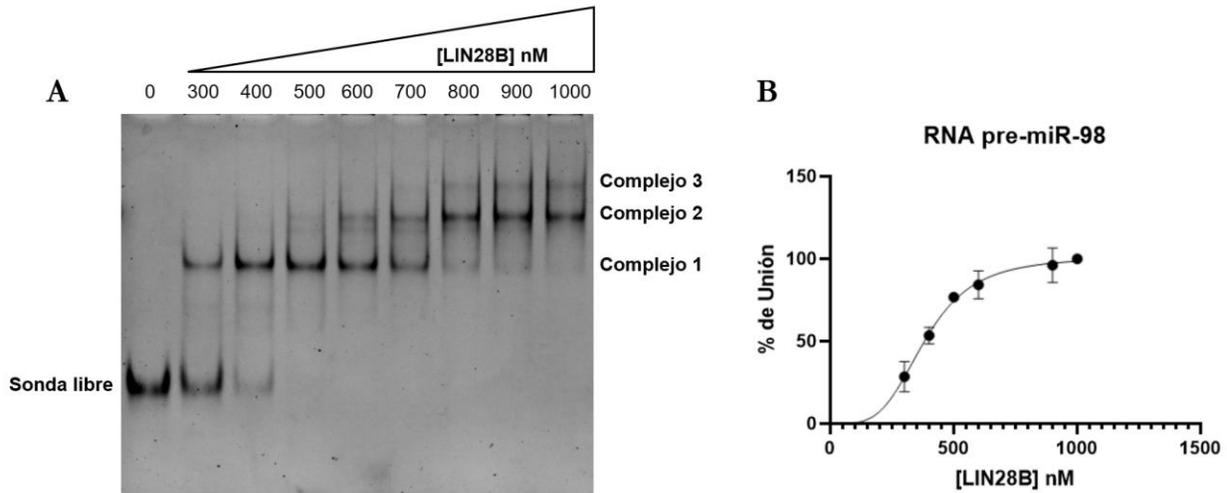


Figura 16. Ensayo de interacción de la sonda RNA pre-miR-98 con LIN28B: (A) EMSA entre RNA pre-miR-98 y LIN28B empleando 50 nM de sonda marcada con 12-UTP-Fluoresceína y concentraciones crecientes de LIN28B. (B) Porcentaje de unión de RNA pre-miR-98 en función de la concentración de proteína ($K_d = 382.9$ nM, $h = 3.87$, $R^2 = 0.95$ y $n=3$).

En las figuras 18 se muestran los ensayos de interacción para los análogos de DNA y RNA de pre-miR-18b propuestos como control negativo de unión. Sorprendentemente para las condiciones experimentales empleadas si hubo interacción de ambas sondas con LIN28B. Los resultados de su cinética muestran una curva sigmoide poco definida cercana a la linealidad. Incluso para el DNA se obtuvo un R^2 por debajo de 0.9, por lo que la determinación de su K_d no fue precisa. Estos resultados pudieran indicar interacciones no específicas con LIN28B.

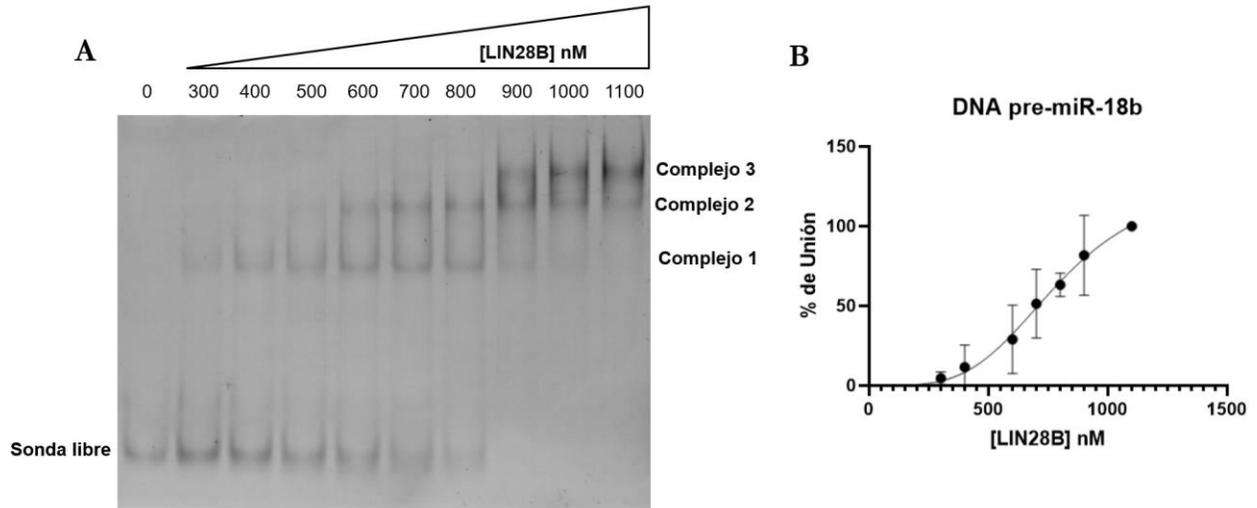


Figura 17. Ensayo de interacción de la sonda DNA pre-miR-18b con LIN28B: (A) EMSA entre DNA pre-miR-18b y LIN28B empleando 50 nM de sonda marcada en 5'-FAM y concentraciones crecientes de LIN28B. (B) Porcentaje de unión de DNA pre-miR-18b en función de la concentración de proteína ($K_d = 798.5$ nM, $h = 3.85$, $R^2 = 0.84$ y $n=3$).

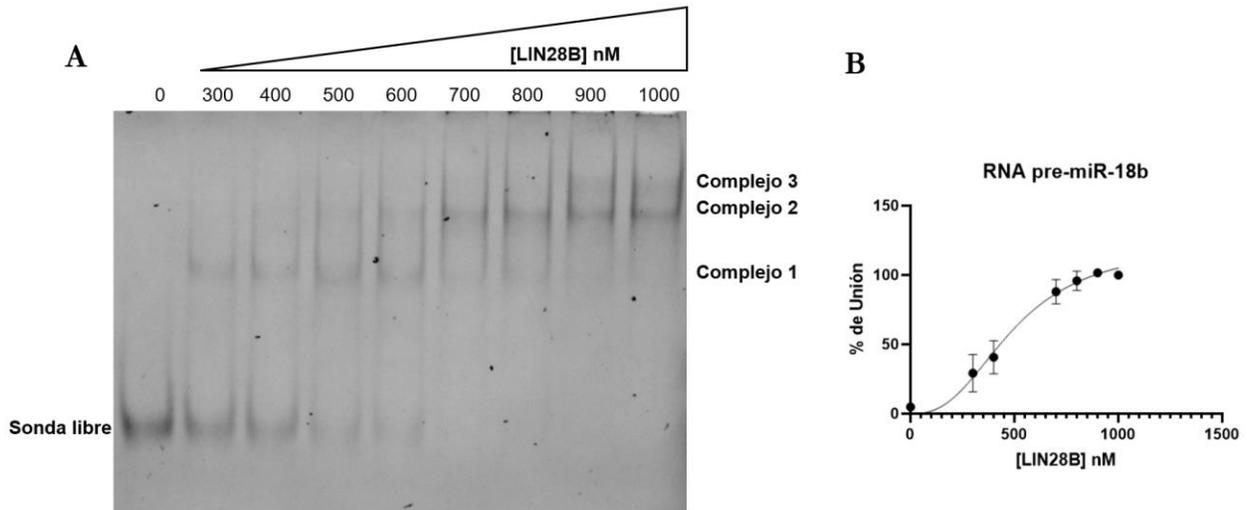


Figura 18. Ensayo de interacción de la sonda RNA pre-miR-18b con LIN28B: (A) EMSA entre RNA pre-miR-18b y LIN28B empleando 50 nM de sonda marcada con 12-UTP-Fluoresceína y concentraciones crecientes de LIN28B. (B) Porcentaje de unión de RNA pre-miR-18b en función de la concentración de proteína ($K_d = 497.1$ nM, $h = 2.58$, $R^2 = 0.94$ y $n=3$).

Finalmente, en la figura 19 se muestra el ensayo para nuestro DNA preE-let-7 diseñado. Presentó una K_d en el orden de los nanomolar con un R^2 favorable. En términos de afinidad por LIN28B bajo el método de detección utilizado nuestra molécula queda en el siguiente orden: RNA pre-miR-98 > RNA pre-mi-18b > **DNA pre-let-7** > DNA-pre-miR-18b. Cabe destacar que independientemente de su secuencia las sondas de RNA presentaron mayor afinidad por LIN28B que las de DNA, evidenciándose la naturaleza de LIN28B de ser una proteína de unión a RNA.

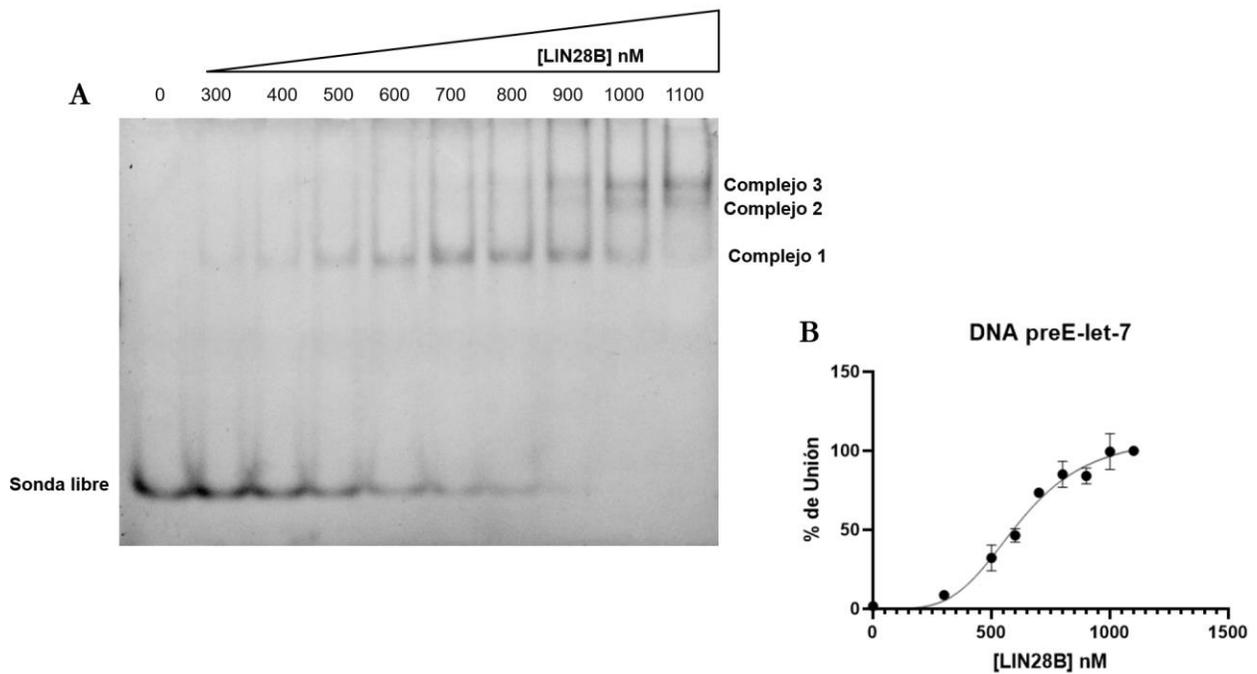


Figura 19. Ensayo de interacción de la sonda DNA pre-E-let-7 con LIN28B: (A) EMSA entre DNA pre-E-let-7 y LIN28B empleando 50 nM de sonda marcada en 5'-FAM y concentraciones crecientes de LIN28B. (B) Porcentaje de unión de RNA pre-miR-18b en función de la concentración de proteína ($K_d = 618.1$ nM, $h = 4.12$, $R^2 = 0.96$ y $n=3$).

Como última observación general de estos ensayos se aprecia inestabilidad en la fluorescencia de la fluoresceína evidenciándose en muchos puntos su apagamiento principalmente en las sondas de DNA respecto a las RNA, ya que la cantidad sonda libre total no coincide con la cantidad de sonda unida total. Esto será motivo de discusión en el próximo capítulo.

7.5.3 Control de especificidad

Para determinar si la interacción de la sonda de DNA pre-E-let-7 es específica por LIN28B se realizó un ensayo de especificidad con la proteína estándar albúmina de suero bovino (BSA). Se incubaron concentraciones saturantes de BSA o LIN28B o ambas con el preE. No se observó formación de complejos del preE con BSA a diferencia con LIN28B. Por tanto, la sonda sintética de estudio es específica por LIN28B.

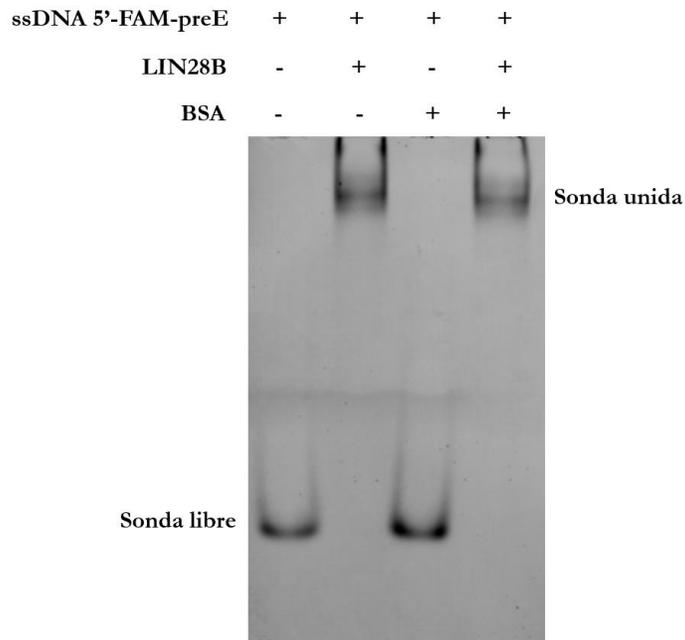


Figura 20. Ensayo de especificidad de ssDNA 5'-FAM-preE: Para el ensayo se emplearon 50 nM de sonda ssDNA 5'-FAM-preE con 900 nM de LIN28B o BSA o ambas proteínas

7.5.4 Ensayos de competición de los precursores con el DNA preE-let-7

Debido a que se demostró interacción de los análogos de pre-miR-18b con LIN28B (Figuras 17 y 18) se realizaron ensayos de competencia con DNA y RNA competidores fríos para verificar estos resultados inesperados.

Primeramente, se evaluaron los competidores DNA y RNA de pre-miR-98, ya que constituyen el control positivo de unión a LIN28B (Figura 21). El RNA pre-miR-98 competidor desplaza con más facilidad a la sonda preE que el DNA competidor. Esto se debe a que el pre-miR-98 es un blanco natural de LIN28B por tanto presenta mayor afinidad de unión. Incluso cuando se añade la misma concentración de sonda preE y el competidor de RNA prácticamente se une a toda la proteína disponible desplazando a la sonda. En cambio, se necesitan 4 veces más DNA competidor para desplazar la sonda totalmente. La sonda preE comparte los mismos motivos de unión a LIN28B que el DNA competidor, solo se diferencian en su talla molecular

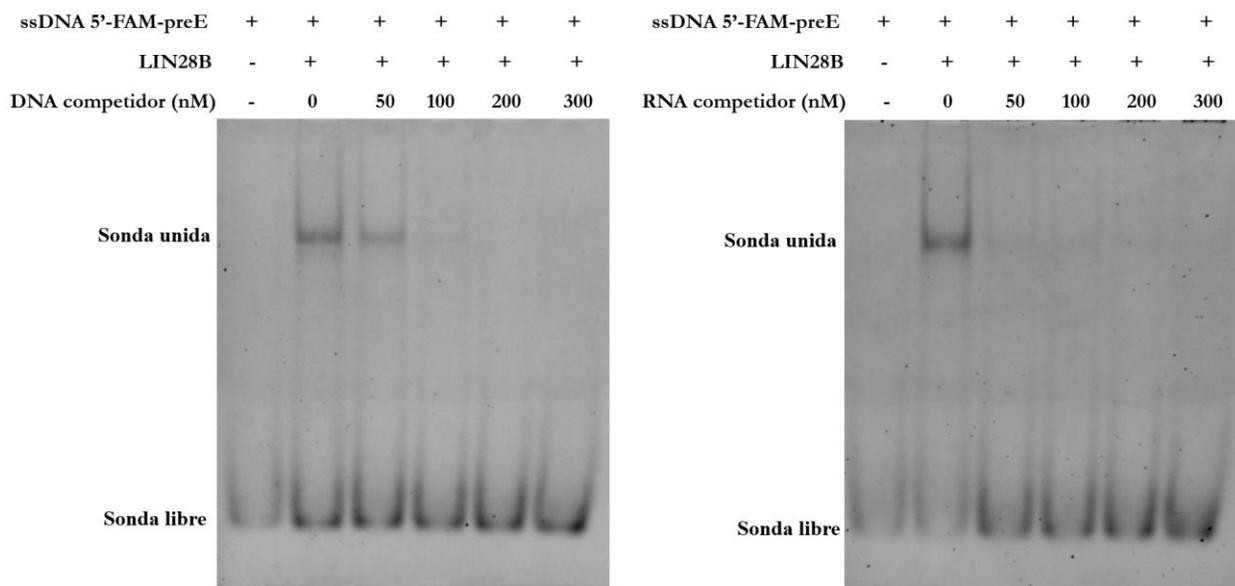


Figura 21. Ensayos de competencia I con pre-miR-98: La competencia se realizó con 50 nM de sonda ssDNA 5'-FAM-preE, 600 nM de LIN28B y concentraciones crecientes de DNA competidor (Molde pre-miR-98, a la izquierda) o RNA competidor (pre-miR-98 no marcado, a la derecha).

En la segunda parte de este experimento se evaluaron los competidores DNA y RNA de pre-miR-18b (Figura 22). Se enfatizó en este resultado debido a pre-miR-18b constituye el control negativo de unión a LIN28B; sin embargo, se demostró que ambos análogos mostraron interacción. Se obtuvo un resultado similar al ensayo anterior en cuanto a que LIN28B tiene más afinidad por el RNA que por el DNA competidor. El RNA competidor desplazó toda la sonda a la concentración máxima de este ensayo. En cambio, el competidor de DNA no logró desplazarla totalmente, pero el resultado nos infiere que si seguimos aumentando la concentración de competidor finalmente lo hará.

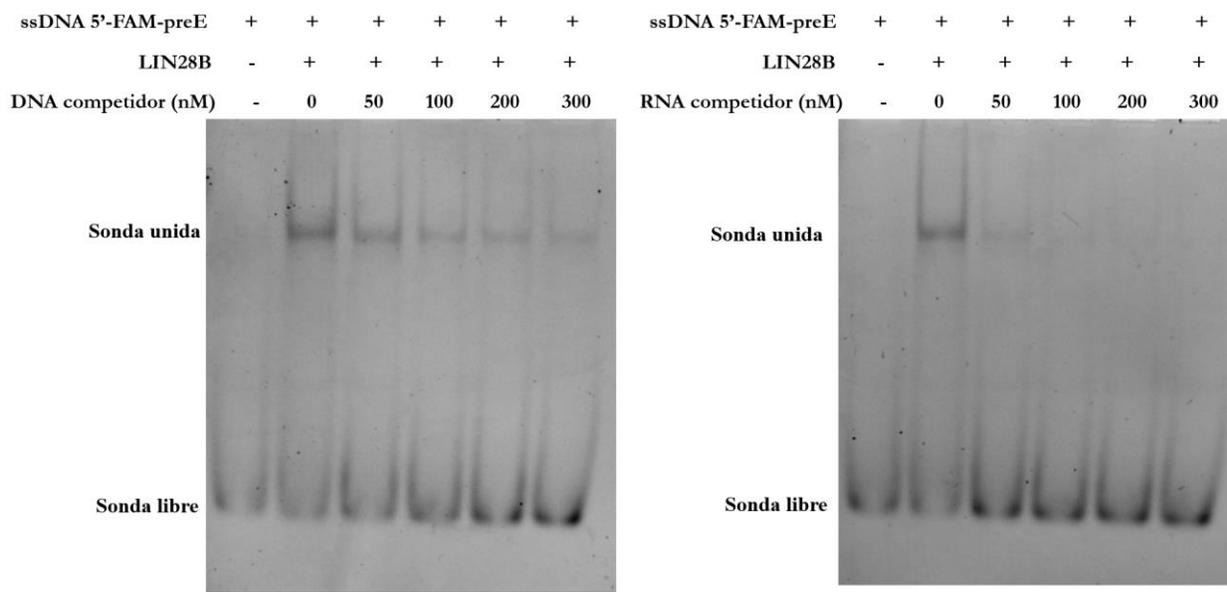


Figura 22. Ensayos de competencia II con pre-miR-18b: La competencia se realizó con 50 nM de sonda ssDNA 5'-FAM-preE, 600 nM de LIN28B y concentraciones crecientes de DNA competidor (Molde pre-miR-18b, a la izquierda) o RNA competidor (pre-miR-18b no marcado, a la derecha).

Para validar lo observado en las figuras 21 y 23 se realizó una cuantificación de los ensayos de interacción (Figura 24). Los RNA competidores mostraron una caída abrupta de la curva cuando se añadieron a competir en concentraciones iguales a la de la sonda evidenciándose mayor afinidad de LIN28B por el RNA. Para el caso de los DNA, el pre-miR-98 desplazó el 50 % de la sonda en concentraciones equimolares mientras que el pre-miR-18b desplazó el 35 %. Tanto el RNA pre-miR-98, RNA pre-miR-18b y el DNA pre-miR-98 lograron desplazar la mayor parte la sonda al duplicar su cantidad, a diferencia del DNA pre-miR-18b que a concentraciones saturantes no alcanzó la inflexión del resto.

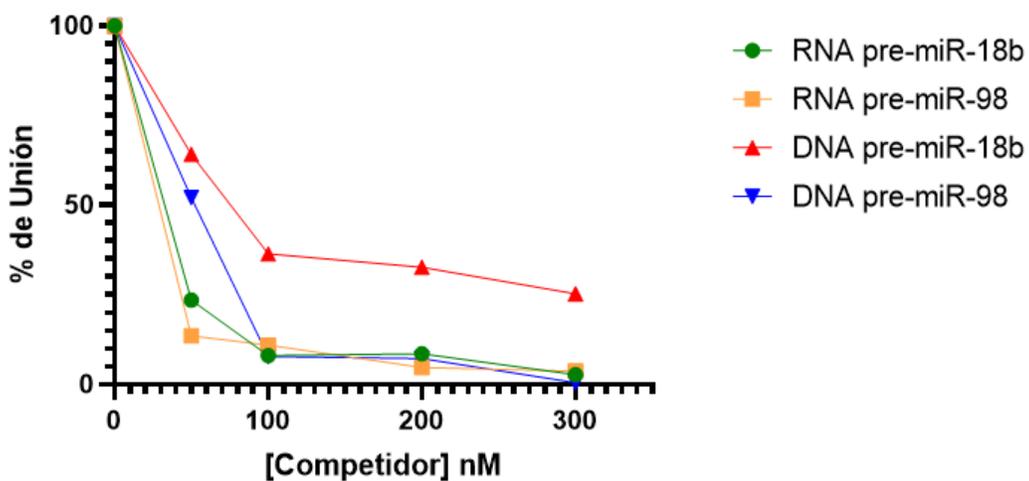


Figura 23. Ensayos de competencia III: Cuantificación del porcentaje de unión de la sonda ssDNA preE con LIN28B contra la concentración del competidor

A modo de conclusión queda demostrado que para la cantidad de sonda de estudio y proteína, los análogos de pre-miR-18b presentan interacción con LIN28B, por lo que no pudo emplearse como un control negativo de unión a LIN28B.

7.6 Predicción estructural secundaria de los precursores

Para obtener más información de la interacción de los precursores con LIN28B se realizó un análisis *in silico* predictivo de la estructura secundaria.

El análisis de los análogos de pre-miR-98 mostró la formación de *stem-loop* con los motivos expuestos de unión a LIN28B (Figura 24). Según los resultados predictivos el DNA presenta un *loop* más accesible a LIN28B que el RNA. Sin embargo, la estructura del RNA obtenida de manera experimental por SHAPE evidencia la formación abierta del *loop* igual que en el RNA. De ahí que estos modelos propuestos aporten una aproximación a la estructura real.

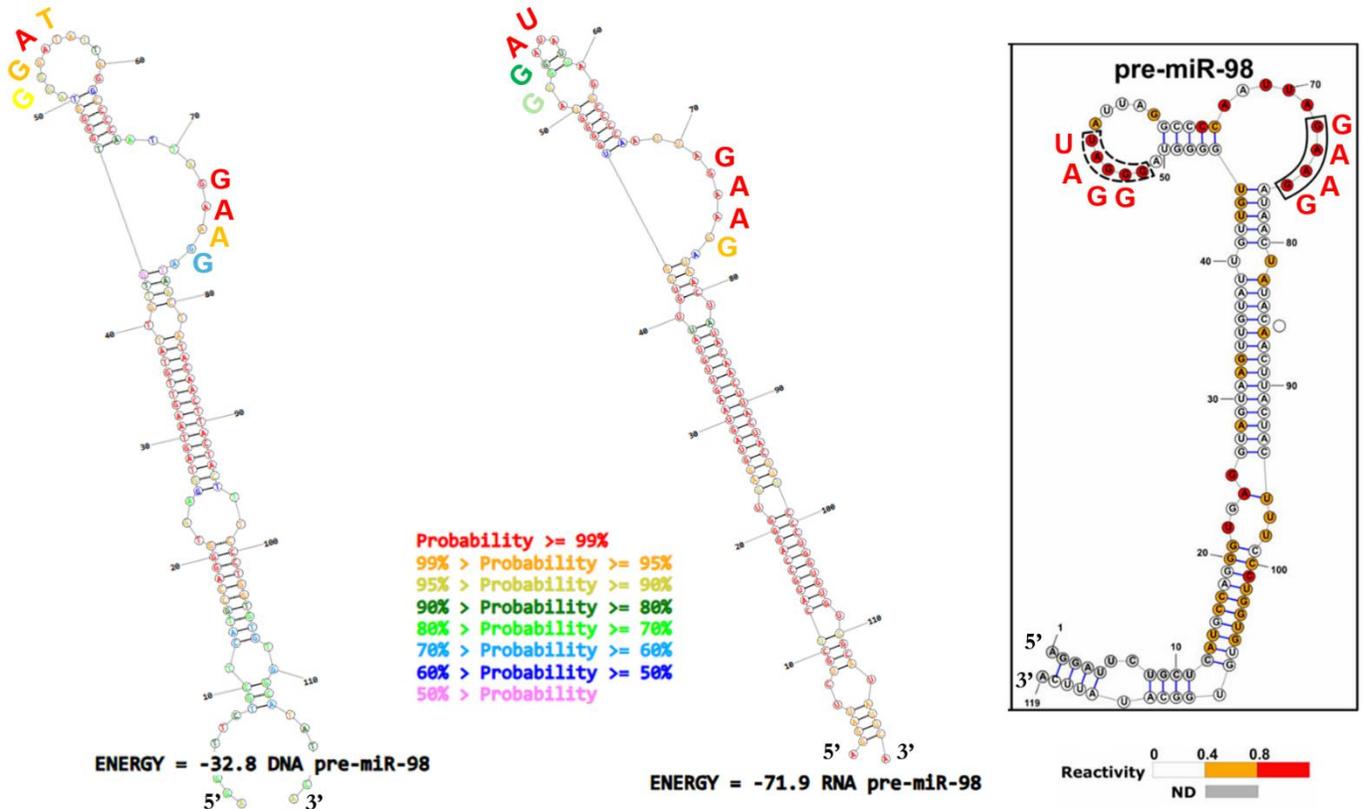


Figura 24. Predicción de la estructura secundaria de los análogos de pre-miR-98: Energías libres teóricas y los motivos de unión a LIN28B (bases ampliadas). En el extremo derecho se muestra la estructura secundaria real del RNA pre-miR-98 resuelta por SHAPE. Tomado de Rangel-Guerrero et al., 2020.

En el caso de los análogos de pre-miR-18b no existe la estructura de *stem-loop* por lo que se infirió que LIN28B no reconoce esta molécula (Figura 25). Sin embargo, las evidencias experimentales sugieren lo contrario lo que constituye motivo de análisis. A simple observación de los modelos destacan la formación de *loop*, regiones en forma de burbujas que podrían constituir blancos de reconocimiento para LIN28B independientemente de la secuencia de bases en estos sitios.

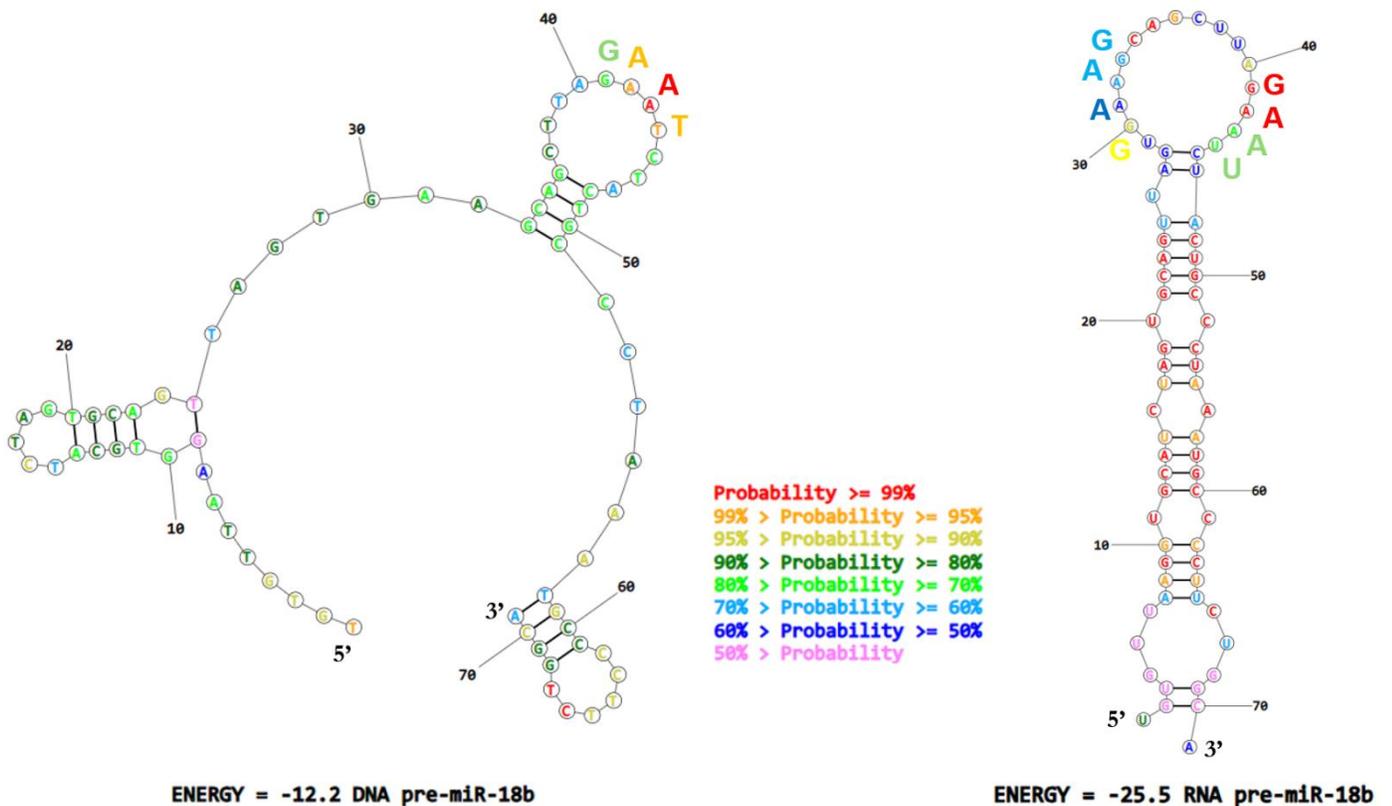


Figura 25. Predicción de la estructura secundaria de los análogos de pre-miR-18b: Energías libres teóricas y los motivos de unión a LIN28B (bases ampliadas).

Por último, se modeló la estructura de los análogos del preE ideal propuesto por Rangel-Guerrero et al., 2020 (Figura 26). Tanto el DNA como el RNA mostraron la formación del *stem-loop* y muestran una analogía muy similar al modelo propuesto incluso con las regiones de doble cadena que le confieren estabilidad a la estructura. Como mismo se observó en el pre-miR-98 el *loop* de DNA es mucho más accesible en tamaño que el del RNA. Sin embargo, ya quedó comprobado que solo con la estructura real obtenida por SHAPE se puede llegar a una conclusión más acertada.

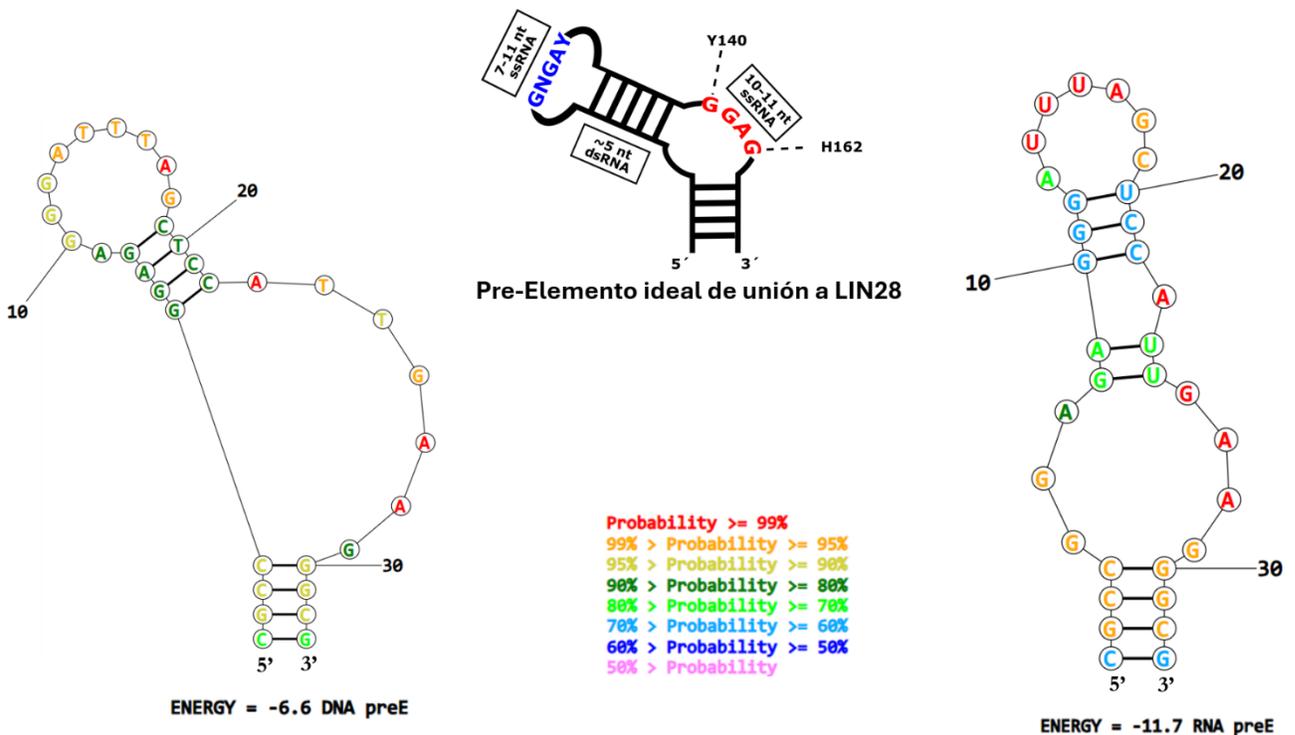


Figura 26. Predicción de la estructura secundaria de los análogos de preE-let-7: Energías libres teóricas y los motivos de unión a LIN28B (bases ampliadas). En la parte superior se muestra el preE ideal de unión a LIN28B propuesto por Rangel-Guerrero et al., 2020.

Una última observación de estos resultados evidencia que las estructuras de RNA de todas las moléculas analizadas presentaron mayor energía libre que las de DNA. Esto le confiere mayor estabilidad al momento de forma y mantener la estructura en el tiempo.

VIII. DISCUSIÓN

A pesar de la extensa investigación sobre la interacción entre LIN28 y la familia let-7, varios aspectos clave de su regulación aún no están completamente comprendidos. Primero, los mecanismos exactos a través de los cuales LIN28 inhibe la maduración de let-7 y cómo esta interacción es modulada por diferentes factores celulares o de señalización permanecen en gran parte indeterminados. Este desconocimiento se dificulta al asumir que no existen diferencias funcionales significativas entre LIN28A y LIN28B en su interacción con let-7, cuando en realidad podrían existir divergencias en sus modos de acción o regulación que no se han esclarecido.

Es particularmente intrigante que existan dos proteínas parálogas, LIN28A y LIN28B, ambas implicadas en la regulación de la familia de let-7. La presencia de estas dos formas podría sugerir una especialización funcional o una regulación redundante pero diferencialmente modulada en contextos específicos. Por ejemplo, aunque ambas proteínas puedan compartir la capacidad de inhibir la maduración de let-7, es posible que su expresión y función varíen dependiendo del tipo de tejido o del estado patológico, lo que podría llevar a diferencias en la regulación de let-7 que aún no han sido caracterizadas. Además, la variabilidad en la expresión entre la familia let-7, que comparten una región semilla común crucial para su función, en diferentes tejidos o condiciones patológicas, plantea preguntas sobre los mecanismos específicos que subyacen a esta regulación diferencial. Es plausible que LIN28A y LIN28B tengan afinidades distintas por diferentes miembros de la familia let-7 o que interactúen con otros factores reguladores en un contexto específico de tejido o enfermedad.

8.1 El DNA preE-let-7 interactúa con LIN28B a través de la formación de complejos

En nuestro laboratorio se investiga el desarrollo de tecnologías basadas en ácidos nucleicos con múltiples aplicaciones. Evaluamos el diseño de una molécula sintética análoga a la región preE de los let-7 que es considerada un preE ideal de unión a LIN28. Los ensayos de retardamiento electroforético revelaron que nuestro DNA preE interactúa con LIN28B con una constante de disociación en el orden de los nanomolar. El revelado de este resultado mostró la formación de hasta tres complejos DNA-proteínas que se favorecen con el incremento de la concentración de LIN28B.

Esto se corresponde con los resultados obtenidos por Mayr et al., 2012 donde caracterizó los dominios CSD y ZKD por separado para analizar su contribución a la interacción con LIN28A. En presencia de LIN28, el CSD se une primero a los motivos que contienen pirimidinas en el lazo terminal del preE. En una reacción rápida, el CSD remodela la región preE y distorsiona conformacionalmente una parte de la región del tallo superior, incluido el sitio de corte de *Dicer*. Como la unión de LIN28 a pre-let-7 es altamente cooperativa, la remodelación de pre-let-7 puede ser facilitada in trans por otra molécula de LIN28. Una vez que el motivo GGAG conservado es accesible, el ZKD de LIN28 media una unión específica a este motivo y la ancla a esta posición. Esta segunda reacción es bastante lenta, ya que tanto el ZKD como el conector básico flexible entre los dominios deben realizar cambios conformacionales mayores. Como consecuencia, el sitio de corte de *Dicer* permanece constantemente abierto e inhibe el corte. La interacción específica de secuencia a través del ZKD asegura así una posición direccional de LIN28 en pre-let-7, lo que puede promover la uridilación terminal de pre-let-7 para su degradación. Quizás el aporte más importante de este modelo fue que la interacción entre el pre-let-7 y LIN28 se establece de forma cooperativa lo que explica la formación de los multicomplejos (1:1, 1:2 y 1:3).

Otro grupo que caracterizó la cinética de multicomplejos fue el de Desjardins et al., 2014 de sus estudios con pre-let-7g y LIN28A. También propusieron un modelo de ensamblaje escalonado de LIN28A en el preE de pre-let-7g. Según este modelo la primera molécula de LIN28A inicia la formación del complejo a través de interacciones entre su dominio similar a NCp7 y el sitio conservado 5'-GAGGG-3' en el 5'-*bulge*, y entre su CSD y el *loop* cercano 5'-AUGAUAC-3'. Estas interacciones en la cadena 5' desestabilizan los apareamientos Watson-Crick dentro del bucle terminal y exponen la cadena 3', haciéndola disponible para la unión de una segunda molécula de LIN28, cuyo dominio similar a NCp7 se dirige a la secuencia conservada 5'-GGAG-3' y su CSD a una región 5' adyacente. La unión de la tercera molécula de LIN28 al sitio de alta afinidad 5'-AUGAUAC-3' implica solo su CSD e implica reubicar el CSD de la primera molécula de LIN28. El orden de ensamblaje propuesto para pre-let-7g puede diferir para precursores de otros miembros de la familia let-7.

En los análisis cinéticos de la interacción de tanto el RNA pre-miR-98 y nuestra molécula preE-let-7 se observó un efecto cooperativo. El resultado estadístico de la regresión no lineal arrojó un coeficiente de Hill superior a 1 lo que se corresponde con una cooperatividad positiva igual que en los modelos de Desjardins y Mayr. Posteriormente hubo otras investigaciones, descritas en los antecedentes, sobre la interacción de let-7 con LIN28 como las de Triboulet et al., 2015 y Ustianenko et al., 2018. Ellos no observaron la formación de complejos en sus ensayos de interacción debido a que solo querían caracterizar la interacción absoluta. Por ello emplearon geles de poliacrilamida: bis-acrilamida menos resolutivos al 5 %. A diferencia de nuestros estudios de grupo como los de Franco-Urquijo, 2018 y Rangel-Guerrero et al., 2020 que sí observaron la formación de multicomplejos en sus ensayos de interacción debido al empleo de geles de poliacrilamida: bis-acrilamida más resolutivos al 8 %.

Los resultados corroboraron que la formación de complejos se favorece con el incremento de proteínas. Mientras más grande es el pre-let-7 como pre-miR-98 mayor número de complejos se forman con el incremento de la concentración de proteína a tal punto que en condiciones de extrema saturación superan el tamaño de los poros del gel (datos no mostrados).

8.2 Las sondas fluorescentes son susceptibles a apagamiento

Una consecuencia del efecto cooperativo de unión podría darse por el método de detección empleado. Hasta el momento los ensayos de interacción realizados tanto por los grupos internacionales como de nuestro laboratorio se realizaban con sondas radiomarcadas. En el presente trabajo, realizamos la detección con sondas fluoresceinadas. Esta técnica de marcaje ofrece algunas ventajas sobre la radioactividad como es la seguridad en el trabajo y el costo de la misma. Sin embargo, el marcaje radiactivo es mucho más sensible. Para ofrecer una idea, cuando se emplean sondas radiactivas su detección es en el orden de los picomolares a diferencia del marcaje fluorescente que es detectable en el orden de los nanomolares. Se necesitó 100 veces más sonda fluorescente mínima que radiactiva para realizar los ensayos. Esto trajo como consecuencia el incremento en el rango de proteínas para alcanzar la saturación y el desplazamiento a mayores valores relativos de las constantes de disociación.

Otra desventaja de nuestra técnica fue la inestabilidad del fluoróforo. La fluoresceína es una molécula muy sensible a la luz. Teniendo en cuenta que las moléculas sintetizadas tuvieron que pasar varias etapas para realizar los ensayos de interacción como su purificación, extracción y lavados, es tiempo que se va apagando la sonda con el tiempo. Este fenómeno se observó con las sondas de DNA principalmente donde la cantidad sonda libre total no se correspondió con la cantidad de sonda unidad total, obteniéndose en porcentajes de unión superior al 100 %. Quizás la explicación más razonable de que se observó menor intensidad de fluorescencia en las sondas de DNA fue debido al número de moléculas fluoresceinadas por molécula. Si bien en las sondas de DNA solo había una molécula de fluoresceína en el extremo 5' por síntesis, en las de RNA encontramos varias fluoresceínas según del número de uracilos de la molécula.

También no puede descartarse que el apagamiento del fluoróforo en muchos casos pudo darse por el entorno químico de la mezcla de interacción donde algún componente pudo actuar como *quencher*, inclusive la misma secuencia de la sonda. Esto se fundamenta con una investigación realizada por Lietard et al., 2022 sobre cómo la secuencia de DNA afecta la intensidad de fluorescencia al preparar bibliotecas de cadena sencilla y doble marcadas en los extremos 3' o 5' con fluoresceína (6-carboxifluoresceína, FAM). Observaron el apagamiento significativo de la fluorescencia con la proximidad de guanina, pero también encontraron cambios más complejos en la intensidad de fluorescencia dependiendo de los contextos de secuencia que implican proximidad a las cuatro bases nucleotídicas. Incluso en ausencia de todas las guaninas, se retiene una disminución, pero aun así una gran variación en la fluorescencia de la fluoresceína dependiente de la secuencia. El rango de intensidades mostró una disminución del 30 % para ssDNA marcado con FAM en el extremo 3' (en comparación con un 50 % para esas secuencias que incluyen G), y casi un 40 % para ssDNA y dsDNA marcados con FAM en el extremo 5' (en comparación con un 60 % y 50 %, respectivamente, para las secuencias equivalentes que incluyen G). Hasta el momento no ha habido reportes del apagamiento de la fluorescencia por interacción con proteínas lo que no descarta su empleo como método de detección en el caso que sea posible.

8.3 Los análogos de pre-miR-18 interactúan con LIN28B

Sorprendentemente, el control negativo pre-miR-18b propuesto por Ustianenko et al., 2018 presentó interacción con LIN28B tanto con el análogo de DNA como el de RNA. Inclusive el RNA pre-miR-18b presentó más afinidad por LIN28B que el preE-let-7 sintético utilizado. Esto podría ser un claro ejemplo de que LIN28 tiene afinidad por estructuras conservadas como plantearon Sharma & Mohanty, 2017 en un análisis de dinámica molecular. Sus simulaciones sugieren que una característica estructural conservada de la región del preE-let-7 es más importante para el reconocimiento por LIN28 que la conservación de la secuencia entre los miembros de la familia let-7 o la presencia del motivo GGAG en la región 3'.

Recientemente Baek et al., 2024 emplearon la acilación selectiva de 2'-hidroxilo analizada mediante extensión de cebadores y perfilado mutacional (SHAPE-MaP), para desentrañar las estructuras secundarias de pri-miARNs humanos de alta confianza. Su estudio se basó en que la maduración del microRNA depende críticamente de las características estructurales de los transcritos primarios (pri-miRNA). Sus estructuras basadas en SHAPE divergieron sustancialmente de las inferidas únicamente por computación, particularmente en el lazo apical y los segmentos basales, subrayando la necesidad de datos experimentales en la predicción de la estructura del RNA.

Lo más interesante es que pre-miR-18b no presenta una región estructural calculada similar al preE definida; sin embargo, según los análisis predictivos de estructura secundaria sí cuenta con la formación burbujas y tallos que pudieran ser blancos para LIN28B principalmente el RNA cuya estructura resultó mucho más estable. Esta interacción a su vez se pudo haber favorecido por el incremento en la concentración de proteínas debido a la sensibilidad del método de detección empleado y a las condiciones *in vitro*. En un ensayo de especificidad realizado por Franco-Urquijo, 2018 incubó una sonda RNA pre-le-7c radiactiva con LIN28B y tRNA no específico 25 veces concentrado. A pesar de no observar diferencias significativas con el complejo formado solamente con la proteína, se observó desplazamiento de sonda unida a libre. El efecto de este ensayo quizás pudo darse por la cantidad de sus componentes. No obstante, un incremento en

la cantidad del tRNA pudiera desplazar toda la sonda a partir de interacciones no específicas.

Por tanto, para realizar ensayos de interacción con LIN28 *in vitro* se propone primeramente utilizar métodos de detección más sensibles para disminuir la cantidad de sonda y proteína y así evitar uniones inespecíficas del sistema. Luego utilizar como control negativo sondas con baja probabilidad de formar burbujas, podría emplearse RNA (ej. poli(I:C)) o DNA de doble cadena.

IX. CONCLUSIONES

1. Se logró sintetizar para los estudios de interacción los 5'-FAM-ssDNAs y por TIV los RNAs fluoresceinados (pre-miR-98 y pre-miR-18b).
2. La cepa *E. coli* Rosetta transformada generó proteínas trucas de LIN28B detectables solo por *Western Blot* pero la dilución de los sobrenadantes disminuyó la concentración de estos subproductos.
3. El ssDNA preE-let-7 diseñado interactuó con la proteína LIN28B con una constante de disociación en el orden de los nanomolar, con una afinidad menor a los RNA evaluados pero mayor que el DNA pre-miR-18b carente de los motivos de unión
4. La formación de complejos pre-miRNA/LIN28 está propiciada por el incremento en la concentración de proteínas siguiendo una cinética sigmoideal con cooperatividad positiva.
5. Los análogos de DNA y RNA de pre-miR-18b presentaron interacción con LIN28B, teniendo mayor afinidad por el RNA lo que demuestra el impacto de la estructura por encima de la secuencia durante la interacción.

X. PERSPECTIVAS

1. Diseñar un molde preE-let-7 de mayor talla para aumentar la eficiencia de la TIV para transcritos pequeños.
2. Optimizar las condiciones experimentales para incrementar el rendimiento de purificación de ssDNA 5'-FAM pre-miR-98.
3. Realizar los ensayos de interacción por un método más sensible como electroforesis capilar para disminuir el rango de concentraciones de proteína de LIN28B.
4. Determinar la estructura secundaria experimental de los análogos de RNA y DNA unidos a LIN28B mediante SHAPE y mapeo con nucleasas respectivamente.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón, C. R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N., & Tavazoie, S. F. (2015). N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, *519*(7544), 482–485. <https://doi.org/10.1038/nature14281>
- Baek, S. C., Kim, B., Jang, H., Kim, K., Park, I.-S., Min, D.-H., & Kim, V. N. (2024). Structural atlas of human primary microRNAs generated by SHAPE-MaP. *Molecular Cell*, *84*(6), 1158-1172.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2024.02.005>
- Balzeau, J., Menezes, M. R., Cao, S., & Hagan, J. P. (2017). The LIN28/let-7 pathway in cancer. *Frontiers in Genetics*, *8*(MAR). <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00031>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, *116*, 281–297.
- Büssing, I., Slack, F. J., & Großhans, H. (2008). let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends in Molecular Medicine*, *14*(9), 400–409. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.07.001>
- Chang, H. M., Triboulet, R., Thornton, J. E., & Gregory, R. I. (2013). A role for the Perlman syndrome exonuclease Dis3l2 in the Lin28-let-7 pathway. *Nature*, *497*(7448), 244–248. <https://doi.org/10.1038/nature12119>
- Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., & Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, *436*(7051), 740–744. <https://doi.org/10.1038/nature03868>
- Choudhury, N. R., Nowak, J. S., Zuo, J., Rappsilber, J., Spoel, S. H., & Michlewski, G. (2014). Trim25 Is an RNA-Specific Activator of Lin28a/TuT4-Mediated Uridylation. *Cell Reports*, *9*(4), 1265–1272. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.017>
- Chung, C. Z., Jo, D. H. S., & Heinemann, I. U. (2016). Nucleotide specificity of the human terminal nucleotidyltransferase Gld2 (TUT2). *RNA*, *22*(8), 1239–1249. <https://doi.org/10.1261/rna.056077.116>
- Connerty, P., Ahadi, A., & Hutvagner, G. (2016). RNA Binding Proteins in the miRNA pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(1). <https://doi.org/10.3390/ijms17010031>
- Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, *432*(7014), 231–235. www.nature.com/nature
- Desjardins, A., Bouvette, J., & Legault, P. (2014). Stepwise assembly of multiple Lin28 proteins on the terminal loop of let-7 miRNA precursors. *Nucleic Acids Research*, *42*(7), 4615–4628. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1391>
- Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J. (2006). Oncomirs - MicroRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *6*(4), 259–269. <https://doi.org/10.1038/nrc1840>

- Faehnle, C. R., Walleshauser, J., & Joshua-Tor, L. (2017). Multi-domain utilization by TUT4 and TUT7 in control of let-7 biogenesis. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(8), 658–665. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3428>
- Franco, P. (2018). *Evaluación de la interacción de la proteína LIN28B con los miRNAs de la familia de let-7*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.
- Frost, R. J. A., & Olson, E. N. (2011). Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(52), 21075–21080. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118922109>
- Goebel, G. L., Hohnen, L., Borgelt, L., Hommen, P., Qiu, X., Lightfoot, H., & Wu, P. (2022). Small molecules with tetrahydroquinoline-containing Povarov scaffolds as inhibitors disrupting the Protein–RNA interaction of LIN28–let-7. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 228. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.114014>
- Gregory, R. I., Yan, K. P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432(7014), 235–240. <https://doi.org/10.1038/nature03120>
- Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., Van Dongen, S., & Enright, A. J. (2008). miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 36. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm952>
- Guo, Y., Chen, Y., Ito, H., Watanabe, A., Ge, X., Kodama, T., & Aburatani, H. (2006). Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. *Gene*, 384(1–2), 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.07.011>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Hagan, J. P., Piskounova, E., & Gregory, R. I. (2009). Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16(10), 1021–1025. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1676>
- Heo, I., Ha, M., Lim, J., Yoon, M. J., Park, J. E., Kwon, S. C., Chang, H., & Kim, V. N. (2012). Mono-uridylation of pre-microRNA as a key step in the biogenesis of group II let-7 microRNAs. *Cell*, 151(3), 521–532. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.022>
- Heo, I., Joo, C., Cho, J., Ha, M., Han, J., & Kim, V. N. (2008). Lin28 Mediates the Terminal Uridylation of let-7 Precursor MicroRNA. *Molecular Cell*, 32(2), 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.09.014>
- Heo, I., Joo, C., Kim, Y. K., Ha, M., Yoon, M. J., Cho, J., Yeom, K. H., Han, J., & Kim, V. N. (2009). TUT4 in Concert with Lin28 Suppresses MicroRNA Biogenesis through Pre-MicroRNA Uridylation. *Cell*, 138(4), 696–708. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.002>
- Hertel, J., Bartschat, S., Wintsche, A., Otto, C., Students, T., & Stadler, P. F. (2012). Evolution of the let-7 microRNA Family. *RNA Biology*, 9(3), 231–241. <https://doi.org/10.4161/rna.9.3.18974>

- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli A, Bálint E, Tuschl T, & Zamore P. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293, 834–838.
- Iliopoulos, D., Hirsch, H. A., & Struhl, K. (2009). An Epigenetic Switch Involving NF-κB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 Links Inflammation to Cell Transformation. *Cell*, 139(4), 693–706. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.014>
- Iwakawa, H. Oki, & Tomari, Y. (2022). Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. *Molecular Cell*, 82(1), 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.11.026>
- Jin, W., Wang, J., Liu, C. P., Wang, H. W., & Xu, R. M. (2020). Structural Basis for pri-miRNA Recognition by Drosha. *Molecular Cell*, 78(3), 423-433.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.02.024>
- Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K. L., Brown, D., & Slack, F. J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120(5), 635–647. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.014>
- Jovanovic, M., Reiter, L., Picotti, P., Lange, V., Bogan, E., Hurschler, B. A., Blenkiron, C., Lehrbach, N. J., Ding, X. C., Weiss, M., Schrimpf, S. S., Miska, E. A., Großhans, H., Aebersold, R., & Hengartner, M. O. (2010). A quantitative targeted proteomics approach to validate predicted microRNA targets in *C. elegans*. *Nature Methods*, 7(10), 837–842. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1504>
- Kim, B., Ha, M., Loeff, L., Chang, H., Simanshu, D. K., Li, S., Fareh, M., Patel, D. J., Joo, C., & Kim, V. N. (2015). TUT7 controls the fate of precursor microRNAs by using three different uridylation mechanisms. *The EMBO Journal*, 34(13), 1801–1815. <https://doi.org/https://doi.org/10.15252/emj.201590931>
- Kloosterman, W. P., & Plasterk, R. H. A. (2006). The Diverse Functions of MicroRNAs in Animal Development and Disease. *Developmental Cell*, 11(4), 441–450. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.09.009>
- Lee, H., Han, S., Kwon, C. S., & Lee, D. (2016). Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein and Cell*, 7(2), 100–113. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0212-y>
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425, 415–419. www.nature.com/nature
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1), 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>
- Lietard, J., Ameer, D., & Somoza, M. M. (2022). Sequence-dependent quenching of fluorescein fluorescence on single-stranded and double-stranded DNA. *RSC Advances*, 12(9), 5629–5637. <https://doi.org/10.1039/D2RA00534D>

- Liu, Z., Wang, J., Cheng, H., Ke, X., Sun, L., Zhang, Q. C., & Wang, H. W. (2018). Cryo-EM Structure of Human Dicer and Its Complexes with a Pre-miRNA Substrate. *Cell*, *173*(5), 1191–1203.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.080>
- Loughlin, F. E., Gebert, L. F. R., Towbin, H., Brunschweiler, A., Hall, J., & Allain, F. H. T. (2012). Structural basis of pre-let-7 miRNA recognition by the zinc knuckles of pluripotency factor Lin28. *Nature Structural and Molecular Biology*, *19*(1), 84–91. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2202>
- Mayr, F., Schütz, A., Döge, N., & Heinemann, U. (2012). The Lin28 cold-shock domain remodels pre-let-7 microRNA. *Nucleic Acids Research*, *40*(15), 7492–7506. <https://doi.org/10.1093/nar/gks355>
- Michlewski, G., & Cáceres, J. F. (2010). Antagonistic role of hnRNP A1 and KSRP in the regulation of let-7a biogenesis. *Nature Structural and Molecular Biology*, *17*(8), 1011–1018. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1874>
- Moss, E. G., Lee, R. C., & Ambros, V. (1997). The Cold Shock Domain Protein LIN-28 Controls Developmental Timing in *C. elegans* and Is Regulated by the lin-4 RNA. *Cell*, *88*(5), 637–646. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81906-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81906-6)
- Nam, Y., Chen, C., Gregory, R. I., Chou, J. J., & Sliz, P. (2011). Molecular basis for interaction of let-7 MicroRNAs with Lin28. *Cell*, *147*(5), 1080–1091. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.020>
- Newman, M. A., Thomson, J. M., & Hammond, S. M. (2008). Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA*, *14*(8), 1539–1549. <https://doi.org/10.1261/rna.1155108>
- Nguyen, L. H., & Zhu, H. (2015). Lin28 and let-7 in cell metabolism and cancer. *Translational Pediatrics*, *4*(1), 4–11.
- Oyejobi, G. K., Yan, X., Sliz, P., & Wang, L. (2024). Regulating Protein–RNA Interactions: Advances in Targeting the LIN28/Let-7 Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(7). <https://doi.org/10.3390/ijms25073585>
- Partin, A. C., Zhang, K., Jeong, B. C., Herrell, E., Li, S., Chiu, W., & Nam, Y. (2020). Cryo-EM Structures of Human Drosha and DGCR8 in Complex with Primary MicroRNA. *Molecular Cell*, *78*(3), 411–422.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.02.016>
- Pasquinelli, A., Reinhart, B., Slack, F., Martindale, M., Kurodak, M., Maller, B., Hayward, D., Ball, E., Degan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., & Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, *408*(6808), 86–89. www.nature.com
- Piskounova, E., Polyarchou, C., Thornton, J. E., Lapierre, R. J., Pothoulakis, C., Hagan, J. P., Iliopoulos, D., & Gregory, R. I. (2011). Lin28A and Lin28B inhibit let-7 MicroRNA biogenesis by distinct mechanisms. *Cell*, *147*(5), 1066–1079. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.039>
- Rangel-Guerrero, S. I., Franco-Urquijo, P. A., Martínez-Salas, E., & Alvarez-Salas, L. M. (2020). Structural insights of the pre-let-7 interaction with LIN28B. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, *40*(2), 194–211. <https://doi.org/10.1080/15257770.2020.1859116>

- Rani, V., & Sengar, R. S. (2022). Biogenesis and mechanisms of microRNA-mediated gene regulation. *Biotechnology and Bioengineering*, *119*(3), 685–692. <https://doi.org/10.1002/bit.28029>
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, Michael., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., & Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *403*(6772), 901–906.
- Roush, S., & Slack, F. J. (2008). The let-7 family of microRNAs. *Trends in Cell Biology*, *18*(10), 505–516. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.07.007>
- Rybak, A., Fuchs, H., Smirnova, L., Brandt, C., Pohl, E. E., Nitsch, R., & Wulczyn, F. G. (2008). A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nature Cell Biology*, *10*(8), 987–993. <https://doi.org/10.1038/ncb1759>
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(5), 5451–5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
- Sampson, V. B., Rong, N. H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, N. J., Dunn, S. P., & Krueger, L. J. (2007). MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Research*, *67*(20), 9762–9770. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2462>
- Schultz, J., Lorenz, P., Gross, G., Ibrahim, S., & Kunz, M. (2008). MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth. *Cell Research*, *18*(5), 549–557. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.45>
- Sharma, C., & Mohanty, D. (2017). Molecular Dynamics Simulations for Deciphering the Structural Basis of Recognition of Pre-let-7 miRNAs by LIN28. *Biochemistry*, *56*(5), 723–735. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00837>
- Shi, X. B., Tepper, C. G., & DeVere White, R. W. (2008). Cancerous miRNAs and their regulation. *Cell Cycle*, *7*(11), 1529–1538. <https://doi.org/10.4161/cc.7.11.5977>
- Su, J.-L., Chen, P.-S., Johansson, G., & Kuo, M.-L. (2012). Function and Regulation of Let-7 Family microRNAs. *MicroRNA*, *1*, 34–39.
- Thornton, J. E., Chang, H. M., Piskounova, E., & Gregory, R. I. (2012). Lin28-mediated control of let-7 microRNA expression by alternative TUTases Zcchc11 (TUT4) and Zcchc6 (TUT7). *RNA*, *18*(10), 1875–1885. <https://doi.org/10.1261/rna.034538.112>
- Thornton, J. E., & Gregory, R. I. (2012). How does Lin28 let-7 control development and disease? *Trends in Cell Biology*, *22*(9), 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.06.001>
- Tokumaru, S., Suzuki, M., Yamada, H., Nagino, M., & Takahashi, T. (2008). let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. *Carcinogenesis*, *29*(11), 2073–2077. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn187>
- Treiber, T., Treiber, N., Plessmann, U., Harlander, S., Daiß, J. L., Eichner, N., Lehmann, G., Schall, K., Urlaub, H., & Meister, G. (2017). A Compendium of RNA-Binding Proteins that Regulate

- MicroRNA Biogenesis. *Molecular Cell*, 66(2), 270-284.e13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.014>
- Triboulet, R., Pirouz, M., & Gregory, R. I. (2015). A Single Let-7 MicroRNA Bypasses LIN28-Mediated Repression. *Cell Reports*, 13(2), 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.086>
- Ustianenko, D., Chiu, H. S., Treiber, T., Weyn-Vanhentenryck, S. M., Treiber, N., Meister, G., Sumazin, P., & Zhang, C. (2018). LIN28 Selectively Modulates a Subclass of Let-7 MicroRNAs. *Molecular Cell*, 71(2), 271-283.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.029>
- Ustianenko, D., Hrossova, D., Potesil, D., Chalupnikova, K., Hrazdilova, K., Pachernik, J., Cetkovska, K., Uldrijan, S., Zdrahal, Z., & Vanacova, S. (2013). Mammalian DIS3L2 exoribonuclease targets the uridylylated precursors of let-7 miRNAs. *RNA*, 19(12), 1632–1638. <https://doi.org/10.1261/rna.040055.113>
- Ustianenko, D., Pasulka, J., Feketova, Z., Bednarik, L., Zigackova, D., Fortova, A., Zavolan, M., & Vanacova, S. (2016). TUT-DIS3L2 is a mammalian surveillance pathway for aberrant structured non-coding RNAs. *The EMBO Journal*, 35(20), 2179–2191. <https://doi.org/10.15252/emboj.201694857>
- Viswanathan, S. R., Daley, G. Q., & Gregory, R. I. (2008). Selective Blockade of MicroRNA Processing by Lin28. *Science*, 320(5872), 97–100. <https://www.science.org>
- Wang, L., Nam, Y., Lee, A. K., Yu, C., Roth, K., Chen, C., Ransey, E. M., & Sliz, P. (2017). LIN28 Zinc Knuckle Domain Is Required and Sufficient to Induce let-7 Oligouridylation. *Cell Reports*, 18(11), 2664–2675. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.044>
- Wang, L., Rowe, R. G., Jaimes, A., Yu, C., Nam, Y., Pearson, D. S., Zhang, J., Xie, X., Marion, W., Heffron, G. J., Daley, G. Q., & Sliz, P. (2018). Small-Molecule Inhibitors Disrupt let-7 Oligouridylation and Release the Selective Blockade of let-7 Processing by LIN28. *Cell Reports*, 23(10), 3091–3101. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.116>
- Yang, X., Rutnam, Z. J., Jiao, C., Wei, D., Xie, Y., Du, J., Zhong, L., & Yang, B. B. (2012). An anti-let-7 sponge decoys and decays endogenous let-7 functions. *Cell Cycle*, 11(16), 3097–3108. <https://doi.org/10.4161/cc.21503>
- Yashiro, Y., & Tomita, K. (2018). Function and regulation of human terminal uridylyltransferases. *Frontiers in Genetics*, 9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00538>
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development*, 17(24), 3011–3016. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803>
- Yu, F., Yao, H., Zhu, P., Zhang, X., Pan, Q., Gong, C., Huang, Y., Hu, X., Su, F., Lieberman, J., & Song, E. (2007). let-7 Regulates Self Renewal and Tumorigenicity of Breast Cancer Cells. *Cell*, 131(6), 1109–1123. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.054>
- Zhang H., Kolb F., Brondani V., Billy E., & Filipowicz W. (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO*, 21(21), 5875–5885.

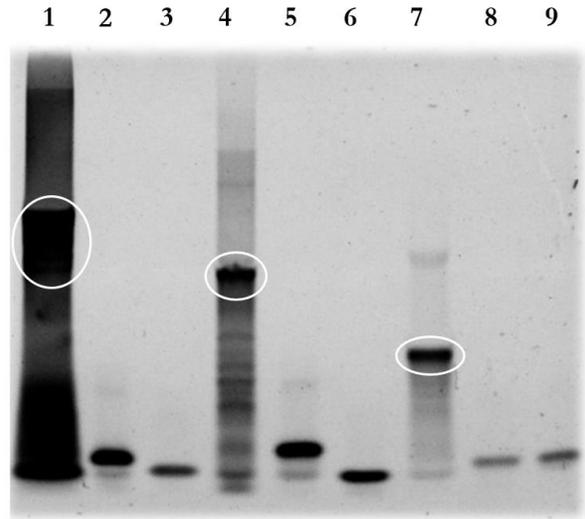
- Zhang, Y., Yun, Z., Gong, L., Qu, H., Duan, X., Jiang, Y., & Zhu, H. (2018). Comparison of miRNA Evolution and Function in Plants and Animals. *MicroRNA*, 7(1), 4–10. <https://doi.org/10.2174/2211536607666180126163031>
- Zhou, J., Ng, S. B., & Chng, W. J. (2013). LIN28/LIN28B: An emerging oncogenic driver in cancer stem cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(5), 973–978. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.006>
- Zhu, H., Ng, S. C., Segr, A. V., Shinoda, G., Shah, S. P., Einhorn, W. S., Takeuchi, A., Engreitz, J. M., Hagan, J. P., Kharas, M. G., Urbach, A., Thornton, J. E., Triboulet, R., Gregory, R. I., Altshuler, D., & Daley, G. Q. (2011). The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell*, 147(1), 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.033>

XII. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

A

Secuencia	Talla (b)
1. pre-miR-98 molde	141
2. pre-miR-98 cebador Fw	25
3. pre-miR-98 cebador Rv	20
4. pre-miR-18b molde	93
5. pre-miR-18b cebador Fw	26
6. pre-miR-18b cebador Rv	19
7. preE molde	55
8. pre E cebador Fw	22
9. pre E cebador Rv	22

B



C

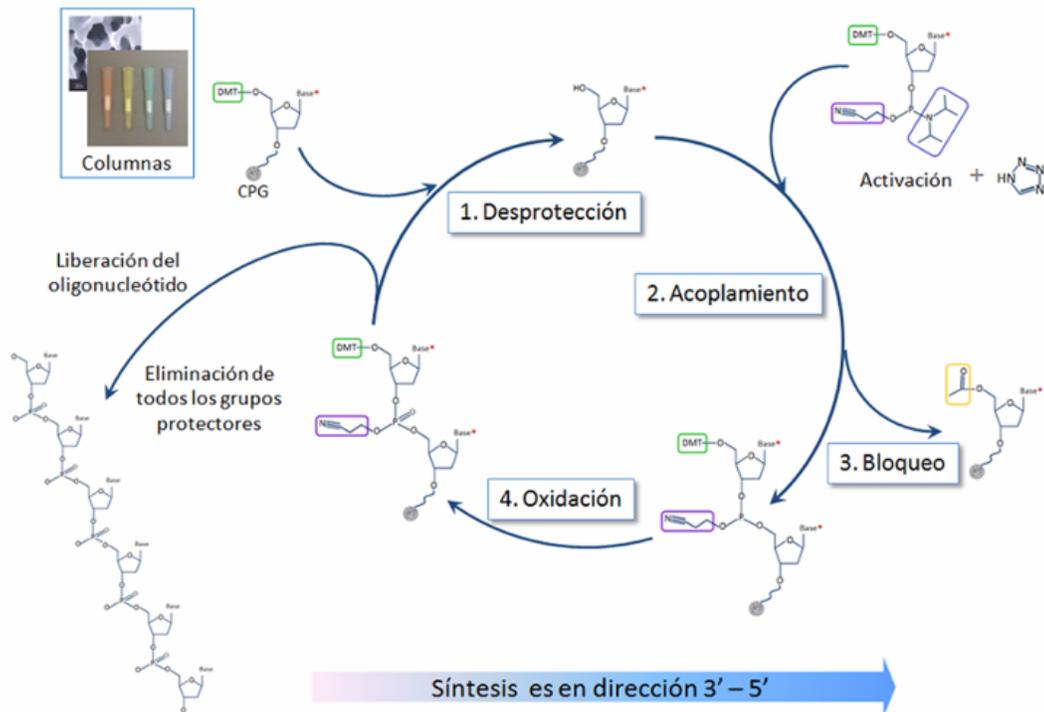


Figura S1. Relacionada con la figura 7: (A) Moldes y cebadores con sus tallas moleculares. (B) Análisis en gel desnaturante de la integridad de los moldes y cebadores para la PCR. Se muestra en los círculos blancos la banda de interés a purificar (C) Ciclo de síntesis del método de las fosforamiditas. El proceso se realiza en una fase sólida. El ciclo del proceso tiene cuatro pasos:

desprotección, activación/acoplamiento, bloqueo y oxidación. Este ciclo se repite hasta que se obtiene el oligonucleótido completo, el cual es liberado del soporte y se eliminan todos los grupos protectores.

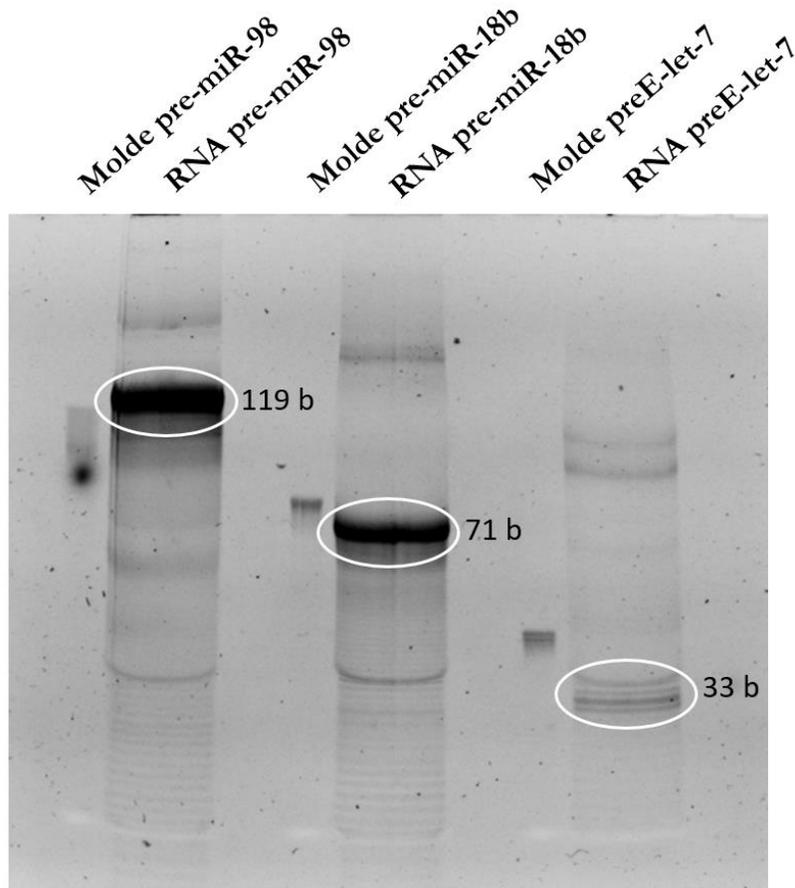


Figura S2. Relacionada con la figura 8: Gel desnaturante mediano para la purificación de la TIV de los RNA fríos (no marcados). Se muestra en blanco las bandas que fueron purificadas.

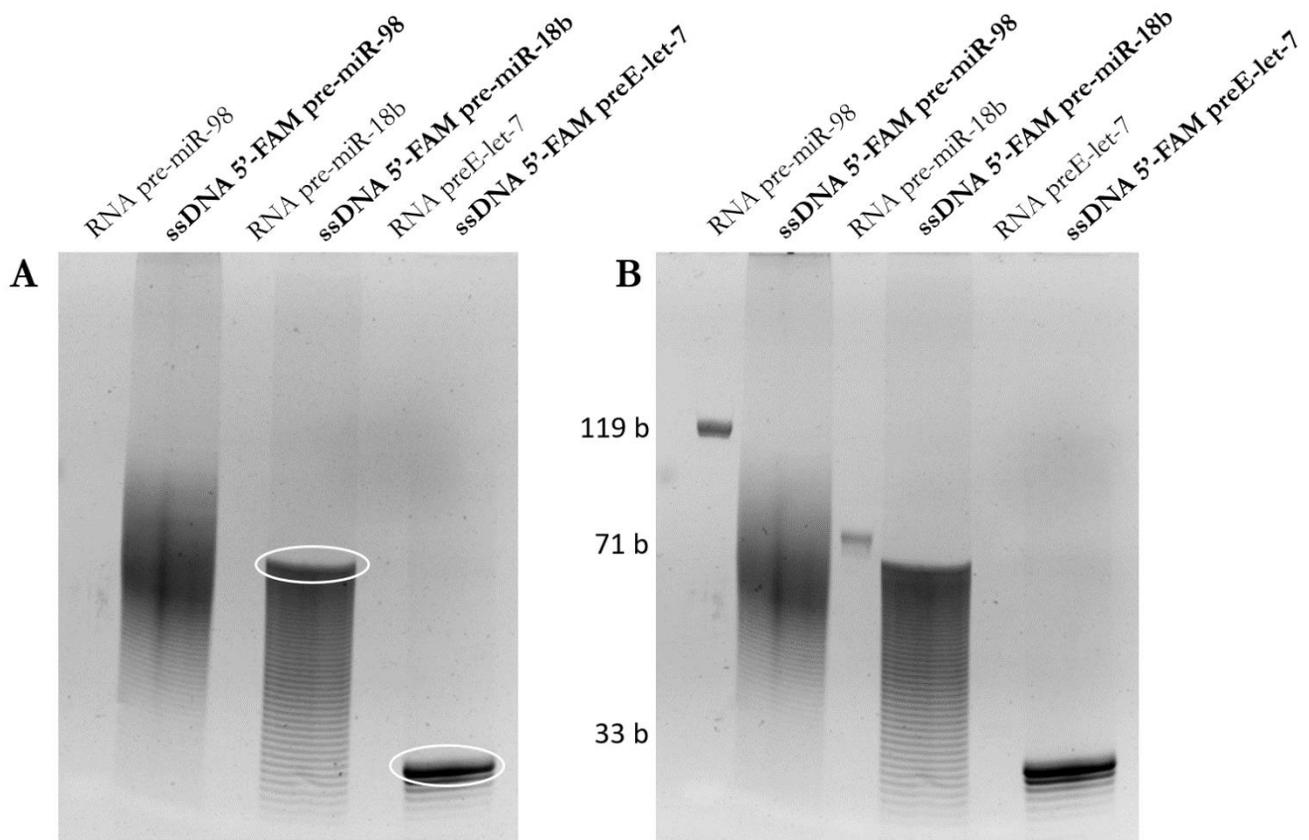


Figura S3. Relacionada con la figura 9: Gel desnaturalizante mediano de purificación de las sondas de ssDNA marcadas en 5'-FAM. (A) Revelado con el filtro *Fluorescein*. (B) Revelado con el filtro *Ethidium bromide*. Se emplearon como marcadores de talla molecular los RNA fríos. Se muestra en blanco las bandas que fueron purificadas.

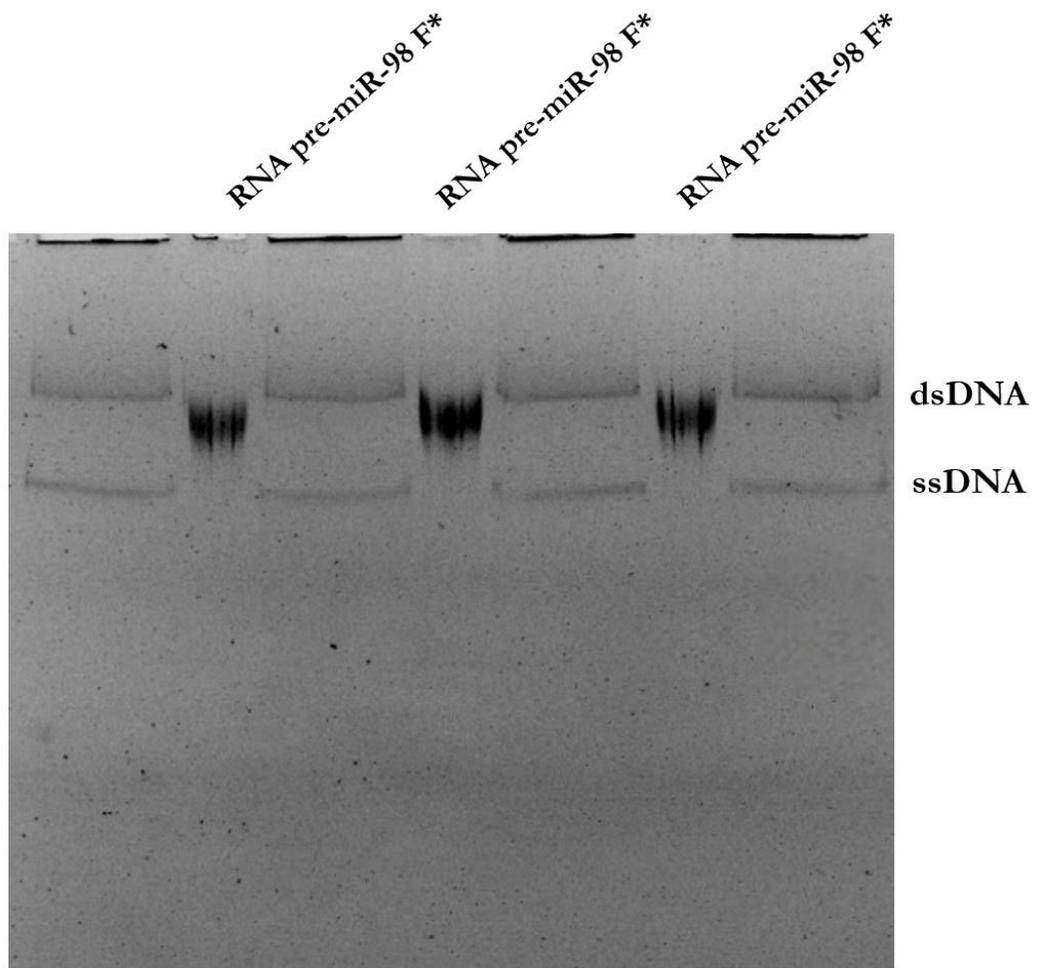


Figura S4. Relacionada con la figura 10: Gel desnaturante mediano de purificación de la sonda 5'-FAM pre-miR-98 revelado con el filtro *Fluorescein*. Se empleó como marcador de talla el RNA pre-miR-98 fluoresceinado.