

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS



**ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-RNA DE MDM2 CON
P53 Y RB USANDO UN SISTEMA DE INMOVILIZACIÓN EN SÍLICE**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS INTERDISCIPLINARIAS**

PRESENTA

ISAÍ OLMOS SÁNCHEZ

DIRECTORES:

DRA. VANESA OLIVARES ILLANA Y DR. BERNARDO YÁÑEZ SOTO

SINODALES:

DR. JOSÉ ALFREDO MÉNDEZ CABAÑAS Y DR. JUAN RODRIGO VÉLEZ CORDERO



**POSGRADO
EN CIENCIAS
INTERDISCIPLINARIAS**

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P. OCTUBRE 2025.

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Este proyecto se desarrolló en el Posgrado en Ciencias Interdisciplinarias (PCI), impartido en la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP). Agradezco a Conahcyt (ahora Secihti) que me permitió ser becario de la convocatoria nacional para estudios de posgrado 2023-2 con el número de apoyo 4001964.

La tesis se dirigió con Profesores Investigadores adscritos a dicho posgrado, la Dra. Vanesa Olivares Illana miembro del área de Bioquímica y el Dr. Bernardo Yáñez Soto por parte de Biofísica y bioingeniería. Ambos encabezan grupos de investigación en el Instituto de Física, por lo que se ejecutó el trabajo experimental en el Laboratorio de interacciones biomoleculares y cáncer (Libyc) dirigido por la Dra. Vanesa y en el Laboratorio nacional de la ingeniería de la materia fuera de equilibrio (Lanimfe) donde el Dr. Bernardo es el representante técnico.

La contribución de otros grupos fue necesaria para el proyecto: el Laboratorio de Marcadores biomoleculares dirigido por el Dr. Jesús Hernández Monge, que conforma parte el grupo de Investigación de Libyc. El Laboratorio de Materia activa y microfluídica aplicada en donde el Dr. Juan Rodrigo Vélez Cordero nos prestó equipamiento y reactivos y el Laboratorio de Biofísica molecular encabezado por el Dr. José Alfredo Méndez Cabañas que nos ofreció reactivos.

El Laboratorio de Biología Molecular de la Dra. Mónica Raquel Calera Medina y el Dr. Roberto Sánchez Olea nos hizo accesible su equipo con el apoyo del doctorante Julio Alberto Muñoz Luna. También el Laboratorio de Materia Blanda y biofísica del Dr. Said Eduardo Aranda Espinoza, para usar su equipo, con la ayuda del posdoctorante Carlos Alejandro Moreno Aguilar.

La creación de ilustraciones las realicé con el programa BioRender (<https://BioRender.com>). Los créditos de las figuras que se tomaron de otros trabajos están en la descripción de cada una.

DEDICATORIA

Para la tierra colorada donde se me enterregó de valentía y enlodó de creatividad.

AGRADECIMIENTOS

Al Valle Helado, donde se me dio la oportunidad de ser hijo, hermano y ahora tío. El concepto de mi persona existe por la fortuna de tenerlos. Su ejemplo, visión, empuje y amor me mantiene fuerte y pleno. Gracias por hacer posible que nuestra familia crezca con personas tan increíbles.

A mis familias Olmos y Sánchez que siempre han estado, me siento honrado de recibir su arroje y cariño. Abuelitas y abuelitos son una bendición, los amo.

Las carcajadas y alegrías con mis amigos han hecho de mí un ser muy feliz, gracias compañeros de mi infancia, del rancho, del deporte y de ciencias, agradezco haber crecido con la orientación de sus consejos.

A los maestros y administrativos de Tlachichila, quienes no cesaron de aplaudir mis cualidades, también a los que me exigían más y a los que me contagiaron y enamoraron de su conocimiento.

A los Profesores Investigadores y cátedras de Biofísica y del PCI, los admiro y me complace haber aprendido de ustedes. Y a ti Maricela, porque Biofísica y el PCI se sostienen con tu valiosa ayuda, esto lo logramos contigo.

A ti Vane por permitirme ser parte de Libyc, aquí encontré mi lugar en la ciencia. El equipo y entorno que construye fue un campamento de aprendizaje, refugio y emoción para mí. Jesús, Karlita, Celi, May, Nath, gracias por su estima, escucha y apoyo, serán mis favoritos siempre. Anita, Ixa, Nan, Andrés, Gabo y Alo, cada uno de ustedes me enriqueció bastante, gracias. Aunque fue poco tiempo, fue muy grato convivir con ustedes Karen, Luis, Leo, Uri, Rex, Dani, Mariana, Iván, Uli, Deni, Vivi y Samu, confío en los bonitos trabajos que lograrán realizar. Xitali y Amely, enseñarles a hacer y criticar experimentos me enorgullece, espero se hayan divertido. Compi Mati, gracias por escogerme como tu amiguito.

Dr. Bernardo usted es el tipo más práctico y activo que conozco, gracias por invitarme a ser parte del grupo. Manuel a ti por tu asesoramiento al trabajar con superficies y a ti Silvia, por tu amabilidad y atenciones. Mi admiración al resto de Lanimfe, un grupo repleto de gente fregona.

El Instituto de Física está lleno de administrativos que logran un entorno preparado, seguro y limpio, gracias Cristi, Mary, Francisco, Adrián, Joven, Morquecho y don Memo. Y señora Sandy, porque Ciencias también necesitan comer, gracias por su divertida amistad.

Y a ti Aranzazú, por la dicha de tu existencia.

RESUMEN

MDM2 es una proteína muy conservada porque al haber daño participa en la traducción no canónica de los supresores tumorales *p53* y *Rb*, esenciales para regular el ciclo celular. En la literatura se ha caracterizado la interacción proteína-RNA de MDM2 con *p53* y en paralelo a este trabajo se explora con el RNA de *Rb*.

Esta investigación nace del interés en el comportamiento de MDM2 hacia los dos RNAs porque hipotetizamos una interacción simultánea. Nuestra propuesta de estudio es una inmovilización de RNAs en sílice funcionalizada y durante el desarrollo del proyecto nos enfocamos en la unión de cada RNA con MDM2.

En este trabajo se produjeron proteínas recombinantes de MDM2 y se generaron RNAs de diferentes largos de *p53* y *Rb*. Con estas biomoléculas se implementaron los ensayos ELISA y EMSA para estudiar la interacción de *Rb* con MDM2, con controles positivos como *p53*. En la EMSA se estandarizaron las condiciones para visibilizar la proteína y los RNA, y así comparar la migración de cada molécula.

Como resultado se obtuvo que los 507 primeros ribonucleótidos de *Rb* son necesarios para la interacción *in vitro* con la fosfoproteína MDM2 S395D, especialmente los 265 ribonucleótidos del 5'UTR ya que un transcrito sin esta región carece de la unión, un comportamiento reportado previamente en células con la técnica PLA.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1	1
1.1 Introducción	1
1.2 Antecedentes	3
1.2.1 Importancia de MDM2 en estrés genotóxico	3
1.2.2 Regulación de MDM2 a <i>p53</i>	6
1.2.3 Caracterización del IRES de <i>p53</i>	6
1.2.4 MDMX y su importancia como chaperona del mRNA de <i>p53</i>	8
1.2.5 Regulación de MDM2 hacia <i>Rb</i>	9
1.2.6 Caracterización del IRES de <i>Rb</i>	11
CAPÍTULO 2	14
2.1 Justificación	14
2.2 Objetivos	14
2.3 Propuesta de trabajo	14
CAPÍTULO 3	16
Materiales y métodos	
3.1 Proteínas recombinantes	16
3.1.1 Producción de proteínas recombinantes	16
3.1.2 Purificación de proteínas recombinantes	18
3.1.3 SDS-PAGE	21
3.2 RNAs <i>in vitro</i>	22
3.2.1 Producción de RNAs <i>in vitro</i>	22
3.2.2 Mini prep de DNA	24
3.2.3 Digestión de DNA	25
3.2.4 Amplificación de DNA por PCR	28
3.3 Mutagénesis sitio dirigida	29
3.3.1 Diseño de oligonucleótidos con la mutación	29
3.3.1 Secuenciación	31
3.4 ELISA	31

3.4.1 Biotinilación de RNA	31
3.4.2 Ensayo ELISA proteína-RNA	33
3.5 EMSA (<i>electrophoretic mobility shift assay</i>)	34
3.6 Funcionalización de superficies	36
3.6.1 Lavado de partículas de SiO ₂	37
3.6.2 Deposición de vapor química de MPTMS	38
3.6.3 Test de Ellman	39
CAPÍTULO 4	43
Resultados	
4.1 Silanización de MPTMS evaluado con <i>test</i> de Ellman	43
4.2 Electroforesis de DNA	43
4.3 Secuenciación de las construcciones de <i>p53</i> y <i>Rb</i>	45
4.4 Resultado de la mutagénesis sitio dirigida	45
4.5 Purificación de proteínas MDM2, MDM2 S166D, S395D y MDMX S403D	46
4.6 Resultados del ensayo ELISA	47
4.7 Avances del EMSA	48
CAPÍTULO 5	52
Discusión y conclusiones	
REFERENCIAS	53
ANEXOS	60
7.1 Perspectivas	60
7.2 Oligonucleótidos diseñados	62

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 A. Traducción no canónica de <i>Rb</i> y <i>p53</i> en estrés al DNA	1
Figura 1 B. Detección de interacciones RNA-proteína-RNA con micropartículas .	2
Figura 1 C. Diagrama de los dominios de MDM2	4
Figura 1 D. Red de interacciones de MDM2	5
Figura 1 E. Modelo de la estructura bidimensional del IRES de <i>p53</i>	7
Figura 1 F. Diagrama de los dominios de MDM2 y MDMX	8
Figura 1 G. Estructura del RNA de <i>p53</i> y su reacomodo por MDMX	9
Figura 1 H. MDM2 reconoce el 5'UTR de <i>Rb in situ</i>	10
Figura 1 I. Simulación de los motivos bidimensionales del 5'UTR de <i>Rb</i>	11
Figura 1 J. Expresión de construcciones de <i>Rb</i> en estrés genotóxico	12
Figura 1 K. Análisis de estructuras del -210 al +50 de <i>Rb</i> con MXfold2	13

CAPÍTULO 2

Figura 2 A. Sistema de inmovilización de RNAs en sílice.....	15
Figura 2 B. Enlace covalente entre SH y maleimida ribonucleótido	15

CAPÍTULO 3

Figura 3 A. Fosfomimetización de aminoácido serina	16
Figura 3 B. Mapa del vector pET28a (+)	17
Figura 3 C. Mapa del vector pcDNA 3.1 (+).....	23
Figura 3 D. Programa de temperaturas para amplificaciones de <i>Rb</i>	29
Figura 3 E. Programa de temperaturas para mutagénesis <i>L22L</i>	30
Figura 3 F. Esquema representativo de ELISA proteína-RNA	31
Figura 3 G. Migración de un EMSA proteína-RNA	34
Figura 3 H. Red vítrea que compone la sílice y su superficie	36
Figura 3 I. Esquema de interacción entre MPTMS y la sílice	37
Figura 3 J. Estructura básica de un silano. Ejemplos APTES y MPTMS	38
Figura 3 K. Reducción de reactivo Ellman.....	39

CAPÍTULO 4

Figura 4 A. Regresión linear de cisteínas	43
Figura 4 B. Mediciones de la silanización de MPTMS y su control	43
Figura 4 C. Linearización de <i>p53</i> con enzimas de restricción	44
Figura 4 D. Linearización de <i>Rb</i> con <i>EcoRV</i>	44
Figura 4 E. Electroforesis de la amplificación de <i>Rb</i> por PCR	44
Figura 4 F. Electroforesis de la PCR para la mutagénesis de <i>p53</i>	46
Figura 4 G. <i>Multialin</i> y cromatograma de la secuenciación de <i>p53</i>	46
Figura 4 H. SDS-PAGE de la purificación de MDM2 WT y MDM2 S395D	46
Figura 4 I. SDS-PAGE de la purificación de MDM2 S395D.....	47
Figura 4 J. SDS-PAGE de la purificación de MDMX S403D	47
Figura 4 K. SDS-PAGE de la purificación de MDM2 WT y S166D	47
Figura 4 L. ELISA proteína RNA de MDM2 WT.....	48
Figura 4 M. ELISA proteína-RNA de MDM2 S395D.....	48
Figura 4 N. Electroforesis de MDM2 en agarosa TAE 1 X	49
Figura 4. Ñ. Gradiente de MDMX en agarosa TAE 1 X	49
Figura 4. O. Cantidades pequeñas de proteína con nueva tinción.....	49
Figura 4. P. EMSA de la interacción de MDM2 con <i>Rb</i>	50
Figura 4. Q. Mejora en el contraste del EMSA	50
Figura 4. R. <i>Merge</i> del EMSA de MDM2 S395D y <i>Rb wt</i>	50

ANEXOS

Figura 7 A. Estrategia alternativa 1	60
Figura 7 B. Estrategia alternativa 2	61
Figura 7 C. Estrategia alternativa 3.....	61
Figura 7 D. Entropía posicional del nt -176 al -91 con RNAfold 2.0	63

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUCCIÓN

Las proteínas son una de las cuatro biomoléculas esenciales para la vida, estas se conforman por una o más secuencias de aminoácidos y cada uno de estos se une a otro por enlaces peptídicos. Estas contienen una estructura terciaria y/o cuaternaria, que les atribuye una función que puede cambiar al adquirir modificaciones post-traduccionales (MPT), uniones covalentes, enzimáticas o no enzimáticas de un grupo químico a un residuo de la o las cadenas de aminoácidos, reestructurándola (Huang et al., 2016).

Al alterar las propiedades fisicoquímicas de una proteína, cambia su interfaz, lo que permite que en ocasiones algunas de ellas sean capaces de interactuar con más de un tipo de biomolécula, como pueden ser el DNA (ácido desoxirribonucleico), el RNA (ácido ribonucleico) u otras proteínas. Y es de esta manera en que la célula logra tener infinidad de interacciones dentro de sí para su funcionamiento. (Lee et al., 2023)

En este trabajo se explora las funciones de la proteína MDM2, quien regula de manera dual a *Rb* y *p53*, dos de los principales supresores tumorales que actúan si hay estrés celular. Por una parte, en condiciones normales de crecimiento MDM2 usa su función de E3 ligasa de ubiquitinas

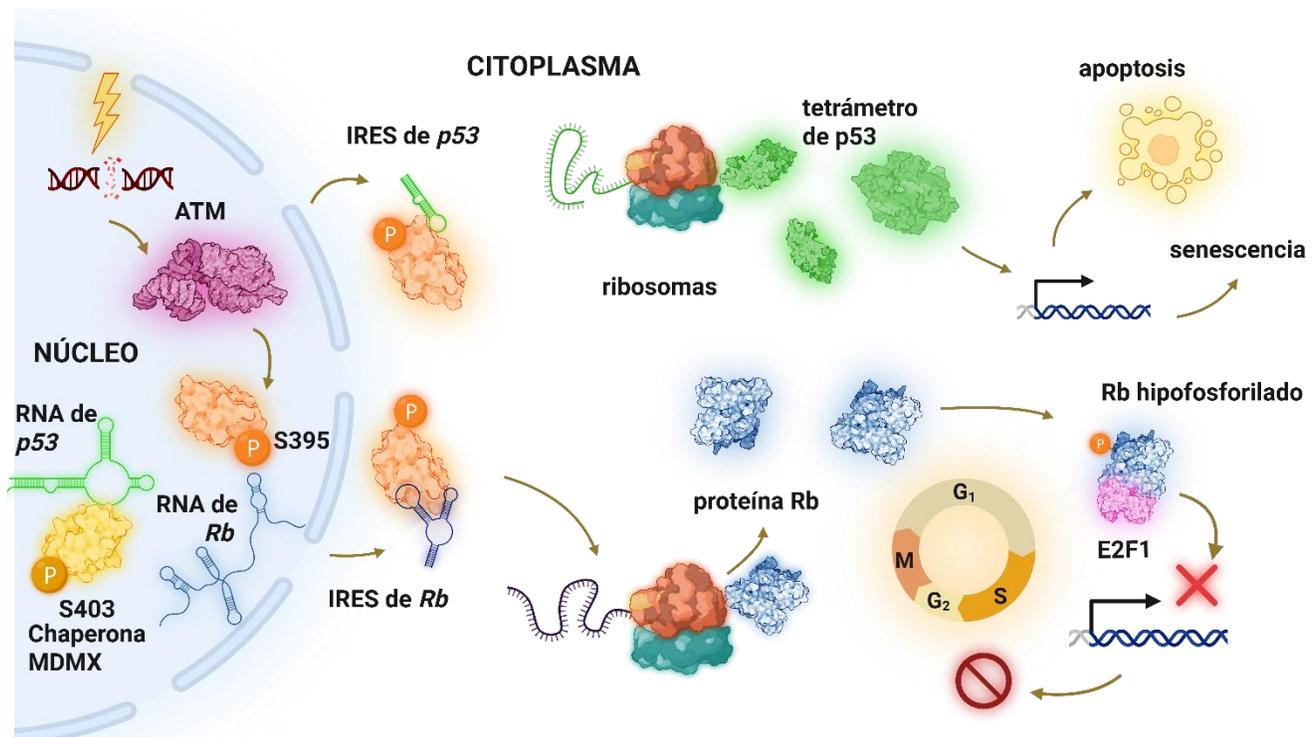


Figura 1 A. Traducción no canónica de *Rb* y *p53* en estrés al DNA. Activación de la vía ATM que fosforila la serina 395 de MDM2 para que uniendo el IRES de *Rb* y *p53*, los lleve a ser traducidos y efectúen su actividades como supresores tumorales. También es fosforilada MDMX en su serina 403, lo que genera que haya un plegamiento idóneo de *p53* naciente.

para poliubiquitar las proteínas p53 y Rb para su degradación. En cambio, cuando hay daño al DNA, MDM2 sufre una MPT al ser fosforilada en su residuo serina 395 (S395) y puede unir RNAs mensajeros (mRNA) y llevarlos a los ribosomas.

La traducción de mensajeros se da generalmente por el mecanismo dependiente de cap, pero en el caso de *Rb* y *p53*, se ha descubierto que tienen en su región 5'UTR (*un-translated region*), un IRES, que es un sitio de entrada interno al ribosoma (del inglés *internal ribosome entry site*). Este sitio facilita la traducción de ciertos RNA en caso de que la maquinaria de traducción tipo cap se detenga por estrés celular, como el genotóxico, la hipoxia o falta de nutrientes. Específicamente *Rb* y *p53* al ser traducidos pueden apoyar con la reparación del daño a la doble cadena de DNA, detienen el ciclo, activan la senescencia, incluso activan la apoptosis de la célula, como se muestra en la **figura 1 A**.

Nosotros creemos que es importante estudiar a MDM2 por su relevancia como proteína esencial en el desarrollo embrionario y la carencia de investigaciones de su interactoma de RNA que, aunque siguen aumentando, se ha abordado más en sus interacciones proteicas.

En este proyecto buscamos dilucidar si interactúa simultáneamente con 2 RNAs en su interfaz. El planteamiento se debe a que el comportamiento con ambos RNAs parece tan paralelo que podría transportarlos juntos al ribosoma.

Para conocer las interacciones proteína-RNA por lo general se utilizan ensayos *in vitro*, *in silico* e *in vivo*. Por el interés específico de las interacciones que buscamos, las técnicas bioquímicas elegidas son *in vitro*, estas se generan fuera del contexto celular, siendo el objetivo utilizar proteínas y RNAs idóneos para caracterizarlos de una manera muy controlada.

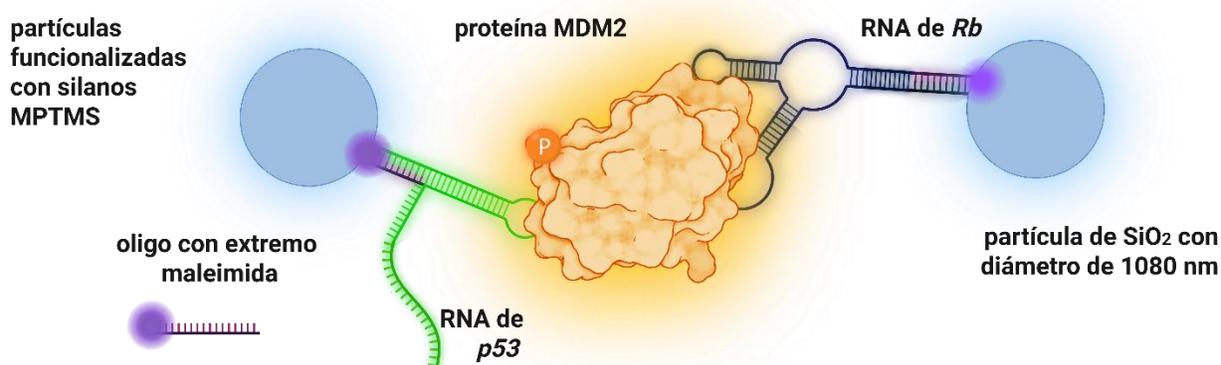


Figura 1 B. Detección de interacciones RNA-proteína-RNA con micropartículas. Inmovilización de RNA por su hibridación con oligos de extremo maleimida que unen MPTMS covalentemente, como estrategia para explorar la interacción simultánea de 2 RNAs a una proteína, dependiente de la formación del conglomerado de partículas.

Así mismo, este proyecto aborda la investigación con la implementación de vidrio o sílice (SiO_2) como forma de inmovilización de biomoléculas, específicamente los RNAs de interés, con un sistema de silanos, moléculas que pueden generar interacciones covalentes con moléculas específicas. Con el fin de explorar formas alternativas de estudiar complejos con una proteína y más de un RNA, en el mismo sistema. Una manera esquemática del planteamiento se aborda en la **figura 1 B**.

Inicialmente habíamos propuesto unir secuencias de RNA a un oligonucleótido con maleimida, que sería unido al grupo SH del silano MPTMS, con el que se pretendía recubrir las superficies de sílice. Para que esto fuese posible, utilizaríamos los primeros 31 nucleótidos de las secuencias, que eran comunes a los diferentes genes estudiados debido a que el vector pcDNA 3.1, que es donde están insertados tanto *p53* como *Rb*, pero al mandarlos secuenciar, nos percatamos de que solo contenían 12 nt comunes y la inmovilización carecería de fuerza. Otra alternativa sería hacer uno para *Rb* y otro para *p53*, pero aumentaría el costo.

Por la razón anterior y el tiempo que involucraría pedir los oligonucleótidos modificados en el extranjero, decidimos redireccionar el estudio a estas propuestas: la primera, ELISAs de proteína-RNA, un ensayo semicuantitativo muy específico que nos permiten identificar si una secuencia de RNA interactúa mucho o poco con una proteína, preliminarmente observamos la interacción que tiene dos versiones del RNA de *Rb* con la proteína MDM2, cuyo

comportamiento *in vitro* no se tenía reportado en la literatura. Y la segunda, la exploración con EMSAs, una técnica visual y más económica que la anterior, donde se estandarizaron cantidades visibles mínimas de proteína, así como la evaluación de *buffers* y soluciones que afectan la migración de las proteínas individualmente. La propuesta de trabajo es muy ambiciosa y necesita continuar desarrollándose.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 IMPORTANCIA DE MDM2 EN ESTRÉS GENOTÓXICO

MDM2 fue observada por primera vez en 1987 por Cahilly-Snyder y colaboradores, como una amplificación de genes en pequeños minutos extracromosómicos en la línea celular transformada de ratón 3T3 (Cahilly-Snyder et al., 1987), por ello su nombre en inglés *murine double minutes* (en humanos, HDM2). En el 95, se hizo el K.O. de MDM2 en ratones, esta deficiencia les impedía su desarrollo y morían (Jones et al., 1995).

En sus primeros estudios demostró ser capaz de producir tumorigénesis al estar sobre expresada (Fakharzadeh et al., 1991) (Finlay, 1993), aunque tiene actividad de oncogén, esto es solo en caso de tener mutaciones o estar sobre-expresada, y por ello su denominación como protooncogén es más asertiva, ya que en su forma silvestre apoya a el crecimiento normal de las células.

No pasó mucho tiempo cuando se reportó el primer compañero de interacción,

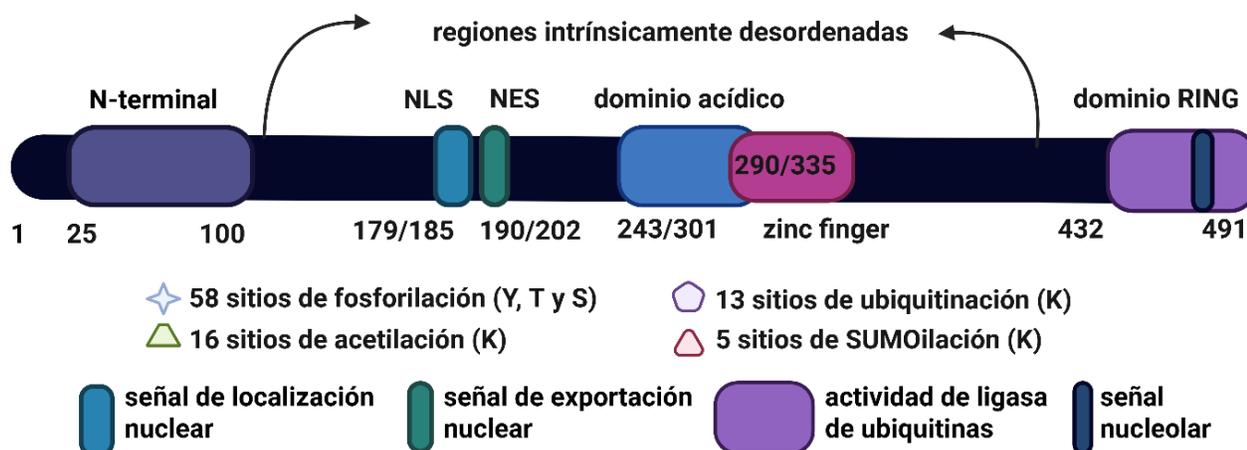


Figura 1 C. Diagrama de los dominios de MDM2. Esta proteína contiene 4 dominios con regiones intrínsecamente desordenadas que los conectan, también sitios de exporte (NES) y localización nuclear (NLS), así como de señal nucleolar. Teóricamente tiene 92 residuos de aminoácidos donde puede adquirir MPT (modificaciones postraduccionales).

p53 (Hinds et al., 1990; (Momand et al., 1992) (Oliner et al., 1993). Debido a la gran cantidad de estudios realizados sobre MDM2, se propuso su capacidad como conector en más de una vía de señalización, de hecho, en 2014 un listado presentado por Fähræus y Olivares-Illana mostró su capacidad de interactuar con más de 100 macromoléculas y esta habilidad de nodo hace que se justifique el término de proteína *hub* (Fähræus & Olivares-Illana, 2014).

Están entre sus características como *hub*: la presencia de regiones intrínsecamente desordenadas (IDR), que le confieren ser plástica; que los dominios que expone varían; que está altamente conectada y es evolutivamente conservada. El interactoma que ha sido caracterizado, muestra que sus interacciones son mediadas a partir de MPT, que logran control de su localización y la restricción de su plasticidad (Fähræus & Olivares-Illana, 2014). En la **figura 1 C.** se muestra su

estructura con sus dominios y regiones más importantes, así como el número de residuos que teóricamente pueden adquirir una MPT.

Interactoma proteico: las interacciones proteína-proteína (IPP) de MDM2 son AKT (Chibaya et al., 2021), ATM (Maya et al., 2001), MDMX (Medina-Medina et al., 2016), p53 (Hara et al., 2011), Rb (Rousset-Roman et al., 2019), Slug (Jung et al., 2013) (S. P. Wang et al., 2009), Notch4 (Y. Sun et al., 2011), entre otras. Así mismo tiene interacciones con factores ribosomales como RPL23 (Dai et al., 2004), RPL5 (Marechal et al., 1994), RPL11 (Lohrum et al., 2003)(Q. Zhang et al., 2011), RPS27a (X. X. Sun et al., 2011), RPS14 (X. Zhou et al., 2013), L26 (Ofir-Rosenfeld et al., 2008) y RPS7 (D. Chen et al., 2007), cuya importancia en la traducción de proteínas es esencial. Dentro de las investigaciones que confirman sus interacciones, se resalta que MDM2 puede funcionar como E3 ligasa, por lo que poli ubiquitina algunos de sus blancos proteicos

y así los marca para degradación en el proteasoma (Hernández-Monge et al., 2016).

Interactoma de RNA: al haber mencionado su capacidad de interacción con factores ribosomales, no parece extraño que también muestre interacciones con mRNAs. Algunos mensajeros blanco de MDM2 son: *E2F1* en estrés traduccional (Gnanasundram et al., 2020); *p53* en estrés genotóxico (Candeias et al., 2008), *Slug*, que tiene una interacción con el RING de MDM2, de una manera parecida a la de *p53* y *E2F1*, ya que los 3 su región codificante es clave para la unión (Jung et al., 2013); *VEGF* (Xiong et al., 2017); *XIAP*, que contiene un IRES rico en AUs y este es al que se une MDM2, (Lubing Gu et al., 2009); *MYCN* en cambio lo hace con su región 3'UTR (L. Gu et al., 2012), los dos últimos son estabilizados e incrementan su traducción al interactuar con MDM2 citoplásmica en su dominio RING. En la **figura 1 D** se muestra un esquema con ejemplos de estas interacciones.

El estudio sobre RNAs continúa, debido a que aún se busca describir la predisposición

de MDM2 a interactuar con estos, sobre todo el mecanismo en procesos de traducción. La posibilidad que MDM2 forme complejos ribonucleoprotéicos (RNPs) con varios RNAs simultáneamente para así optimizar la traducción de estos, es una cuestión que las técnicas de biología molecular y computacional aún no resuelven.

Puntualmente, las investigaciones más completas de mensajero es con su blanco *p53* y una de gran interés es con *Rb*. Ambos supresores tumorales que interactúan con MDM2 en su versión de mensajero y proteína, la dualidad que tiene MDM2 de controlar la síntesis en estrés genotóxico y degradación en crecimiento normal de ambos es un objetivo de estudio muy interesante. Las vías de señalización de MDM2 con *Rb* y *p53*, son las principales herramientas de la célula para suprimir la tumorigénesis con el bloqueo de factores de transcripción asociados a crecimiento y/o activando vías de muerte celular controlada con la activación de genes pro-apoptóticos (Y. Zhou et al., 2023).

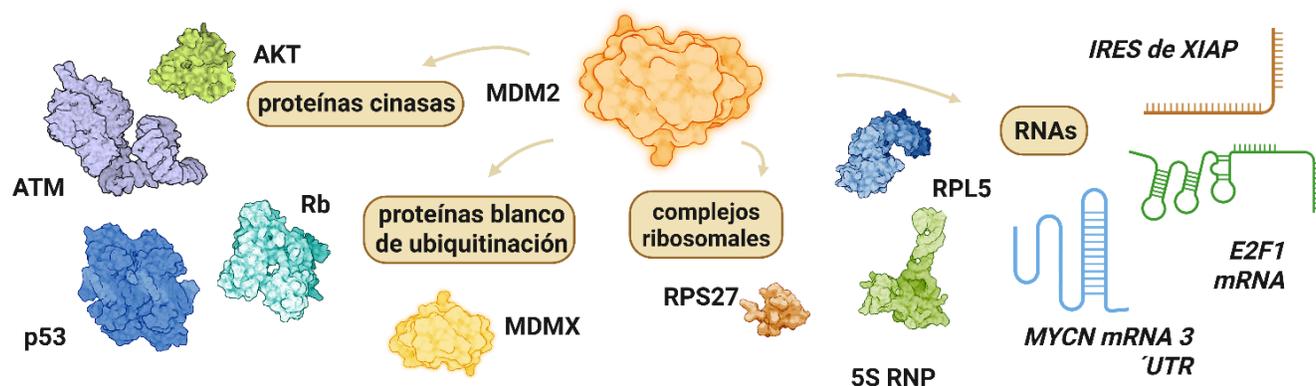


Figura 1 D. Red de interacciones de MDM2. MDM2 puede ser fosforilada por cinasas, es capaz de ubiquitinar diversas proteínas y de interactuar con complejos ribosomales que le permiten apoyar en la traducción de mRNAs, con los que también se une.

1.2.2. Regulación de MDM2 a p53

El gen *TP53* (o p53) se considera como el guardián del genoma, ya que ayuda a regular la activación de diversos genes que logran en conjunto la homeostasis celular. El regulador más importante de expresión y supresión de *p53* es la proteína MDM2, su regulación puede ser a nivel transcripcional, o bien a traduccional, interactuando con el mensajero o postraduccionalmente, con la proteína. En cada uno de estos niveles se puede impactar su destino de manera muy importante (Swiatkowska et al., 2019).

Recientemente se encontró que solo en condiciones de crecimiento normales la cinasa ATM interactúa con el mRNA de *p53* (Karakostis et al., 2024), este mecanismo es muy interesante debido a que en caso de haber daño a la doble cadena, es esta cinasa se activa por factores que censan el daño y activa una vía de señalización que inicia con su autofosforilación en la serina 1981 (Stracker et al., 2013) y posteriormente fosforila a MDM2 en la serina 395 (Maya et al., 2001).

MDM2 tiene cambios conformacionales que permiten la unión del mRNA de *p53* en su región 5'UTR y parte inicial de su región codificante con el dominio RING de esta proteína (Candeias et al., 2008). También se regula el mRNA de *p53* independiente a MDM2 gracias a la interacción con L26. (Ofir-Rosenfeld et al., 2008) Así mismo se promueve una sumoilación que hace que MDM2 se vaya al nucleolo, para que transporte el mRNA de *p53* a los polisomas y se traduzca a

proteínas. Al terminar MDM2 se desfosforila por Wip1 (Gajjar et al., 2012).

MDM2 es una ligasa de ubiquitinas E3 que en condiciones normales logra regular los niveles de la proteína de p53 traducida, ya que la puede ubiquitinar o poliubiquitinar para que se active su degradación en el proteasoma 26S, esto lo puede hacer como homo o heterodímero con su homóloga MDMX (Okamoto et al., 2005)(Uldrijan et al., 2007)(Medina-Medina et al., 2016). A pesar de que MDMX no tiene función E3 ligasa, su apoyo en la formación del complejo MDM2-MDMX, mejora y estabiliza la actividad de ubiquitinación hacia p53 y tiene mejor rendimiento que el homodímero de MDM2 (Kawai et al., 2007).

1.2.3 Caracterización del IRES de p53

La traducción dependiente de cap consiste en agregar m7G (7-metilguanosa) al precursor del RNA mensajero en su 5', para posteriormente ser reconocido por la maquinaria para el ensamblaje de los factores de iniciación eucariótica que forman el ribosoma 80 S (Sonenberg & Hinnebusch, 2009) y es esta manera, en la que los eucariotes inician su traducción generalmente. En otras ocasiones, hay mensajeros que sin esta capucha logran ser traducidos, debido a que contiene un sitio de entrada al ribosoma interno o IRES (*internal ribosome entry site*). Aunque estos generalmente los contienen RNA virales, también están presentes en RNAs que codifican para proteínas que responden a

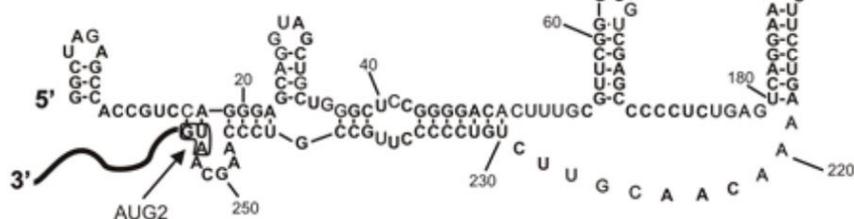
estrés como hipoxia, apoptosis o falta de nutrientes (Y. Yang & Wang, 2019).

En el 2006 se mostró por primera vez el mecanismo IRES de *p53*, este implementó células MCF-7 (cáncer de mama) con etopósido, que aumentaban la síntesis de *p53* y así mismo incrementaba la asociación del factor de inicio de la traducción eIF-4E con la proteína de unión 4E-BP1, un inhibidor de traducción dependiente de cap (D. Q. Yang et al., 2006). Al tener un factor IRES genera una independencia a la traducción por cap, facilitando su unión directa en un sitio interno del ribosoma, lo que hace que en estrés este mecanismo sean una alternativa que prioriza su traducción frente a mensajeros que no contienen dichas estructuras.

Esta región se modula por las interacciones de diversas proteínas, en las que algunas participan como factores ITAF (IRES *trans-acting factor*), los más estudiados han sido MDM2 y PTB (*tract-binding protein*), que se encargan de relocalizar del núcleo al citoplasma en condiciones de estrés (Khan et al., 2013).

Por otro lado, se han reportado mutaciones silenciosas de *p53* que impiden el comportamiento idóneo con MDM2, por ejemplo la mutación en la leucina 22 (L22L [CUA / CUG]) (Oscier et al., 2002), que se

Figura 1 E. Modelo de la estructura bidimensional del IRES de *p53*. AUG1 es el codón de inicio de la traducción para *p53*, mientras que AUG2 es para la isoforma *p53/p47*. La horquilla U180-A218 es la región con la que MDM2 interacciona. La estructura es de Swiatkowska et al., 2016. Modificada de Błaszczyk & Ciesiołka, 2011.



encontró en pacientes con cáncer, así como otras en los codones 10 y 21 (Ahuja et al., 1990; Hayes et al., 1999), lo que ocasiona que *p53* no logre interactuar exitosamente con MDM2.

La caracterización de toda la región 5'UTR ha proporcionado los motivos de la estructura secundaria de este IRES. Dentro de sus motivos más relevantes destaca uno que contiene el AUG para la traducción completa de *p53*. Otro es la horquilla es la que se une específicamente a MDM2 (Błaszczyk & Ciesiołka, 2011) (Szpotkowska et al., 2019), que abarca una longitud de 39 ribonucleótidos. Ambos dominios se muestran en el modelo estructural de la **figura 1 E** de (Swiatkowska et al., 2016).

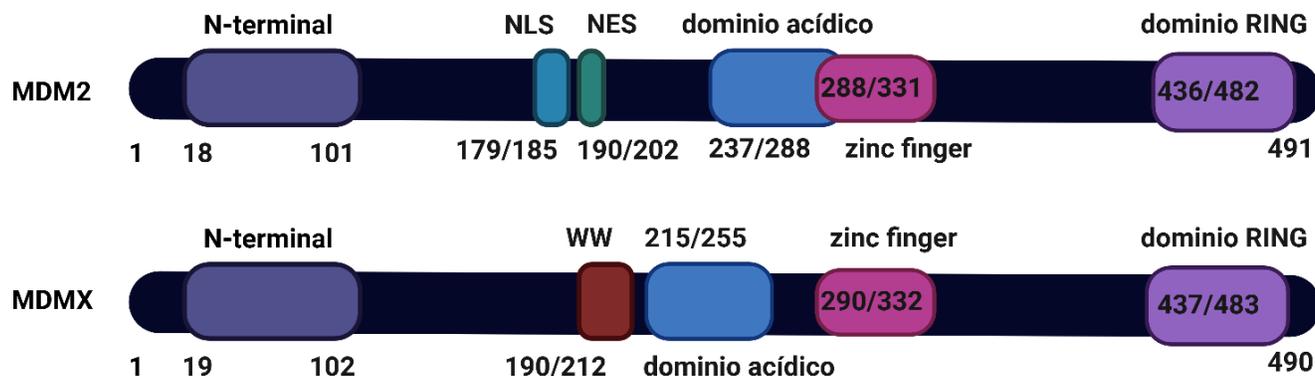


Figura 1 F. Diagrama de los dominios de MDM2 y MDMX. La estructura de ambas comparte los 4 dominios con similitudes en su secuencia. MDM2 se diferencia en tener secuencias señales NLS y NES únicas. MDMX de contener un elemento WW.

La exploración de estas estructuras se dio con la técnica SHAPE (*selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension*) y su análisis, que propusieron Kevin A. Wilkinson y colaboradores en el 2008 para conocer la estructura del RNA genómico de HIV-1 (Wilkinson et al., 2008).

1.2.4 MDMX y su importancia como chaperona del mRNA de p53

En el nacimiento del transcrito de p53, es de gran necesidad la presencia de MDMX también fosforilada en su serina 403, ya que esta es una chaperona que ayuda con plegamiento idóneo de este para que posteriormente interactúe con MDM2. Hay estudios que corroboran este comportamiento *in vitro* con las versiones recombinantes de ambas proteínas (Malbert-Colas et al., 2014).

MDMX tiene 490 aminoácidos y 4 dominios: el hidrofóbico; el RING, que tiene más del 70 % de similitud al de MDM2; el *zinc finger* y el dominio central ácido (Medina-

Medina et al., 2018). A diferencia de MDM2, esta contiene un motivo conocido como elemento WW, un fragmento rico en triptófano centrado en las tirosinas 200 y 201 (Bista et al., 2013). En la **figura 1 F** se muestra la comparación de ambas proteínas y sus estructuras (Lin et al., 2024).

El dominio ácido de MDMX es menos similar al de MDM2, por lo que no interactúa con factores como las proteínas ribosomales L23, L11 y L5, p14 (ARF) y p300 (Fåhraeus & Olivares-Illana, 2014)

Respecto a este reacomodo, se sabe por estudios de *footprint* de su IRES, que hay una interrupción de la interacción de los codones 10 y 21 de p53, y cambia la posición de los *stem-loop*: el S-L I y S-L II, de interactuar al no hacerlo, para que se forme una plataforma que permite que MDM2 interactúe con el S-L I y S-L III, como se muestra en la **figura 1 G**. Aunque la actividad de chaperona parece ser exclusiva de MDMX fosforilada (Malbert-Colas et al., 2014), Sa Chen y colaboradores recientemente reportaron el comportamiento del S-L II,

también conocido como BOX-I, que actúa como aptámero para que se dé la plataforma del RNA de *p53* hacia MDM2. BOX-I parece lograr separar el S-L I del S-L II, permitiendo que este último esté libre para MDM2, similarmente a la chaperona MDMX. Esto indica que *p53* muestra características similares a las de un *riboswitch* procarionte, que lo ayudan a su síntesis en condiciones de estrés (S. Chen et al., 2025).

1.2.5 Regulación de MDM2 hacia *Rb*

El gen RB1 fue el primer supresor tumoral clonado e identificado (Goodrich et al., 1991), a pesar de tener otras funciones, la regulación negativa en el ciclo celular es hasta el momento la más estudiada. Rb1 forma parte de la familia de proteínas bolsillo (*pocket proteins*), que incluye los genes Rb11 (p107) y Rb12 (p130) (Chinnam & Goodrich, 2011).

Frecuentemente se ha reportado la inactivación de pRb o Rb en cáncer, (Weinberg et al., 1995;), y fue por el cáncer pediátrico Retinoblastoma que adquirió su nombre. Hay cientos de mutaciones reportadas en los 27 exones de dicho gen, por lo que muchas de estas están aún siendo caracterizadas (Peña-Balderas et al., 2025).

Rb puede ser un adaptador que interactúa con diferentes proteínas celulares o virales, son más de 150 las documentadas, y de las cuales su actividad está validada, en su mayoría se relacionadas a la expresión génica y transcripción del RNA (Chinnam & Goodrich, 2011).

Una de las participaciones más relevantes de Rb como punto de control de la fase G1 temprana a la fase S (de síntesis), esto lo hace hipofosforilada al interactuar con E2F1, que causa que este factor ya bloquee su dominio de activación hacia factores de transcripción e histonas acetilasas, que son necesarias para la activación transcripcional (James, 1995). Las proteínas bolsillo en general pueden también unir histonas, histonas desacetilasas, desmetilasas o DNA

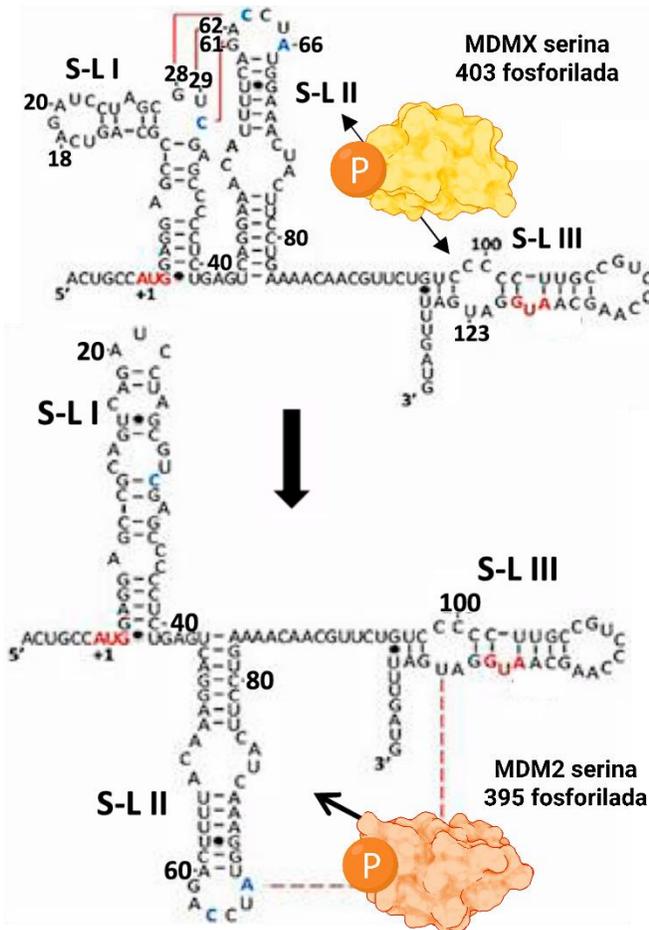


Figura 1 G. Estructura del mRNA de *p53* y su reacomodo por MDMX. MDMX es la chaperona del RNA naciente de *p53*, esta reacomoda la interacción de los S-L (*Steem loop*) I y S-L II para que el S-L I y S-L III formen una plataforma ideónea para MDM2. Figura modificada de Malbert-Colas et. al. 2014.

metiltransferasas (Chinnam & Goodrich, 2011). Cuando se hiperfosforila Rb por cinasas dependientes de ciclinas ya no interactúa con E2F1, por lo que libre podrá continuar el ciclo celular (Martínez-Sánchez et al., 2022).

La proteína Rb se une a MDM2 en su región C-terminal (Jim Xiao et al 1995) (Rousset-Roman et al., 2019) y con ello se puede degradar a causa de su actividad ligasa de ubiquitinas (Uchida et al., 2005) y es un puente entre Rb y la proteína proteosomal C8. Así mismo, se ha reportado que la disminución de Rb puede ser independiente de ubiquitinación (Sdek et al., 2005).

MDM2 recientemente se mostró que también puede regular el RNA mensajero de *Rb* en condiciones de daño al DNA, esta interacción involucra la fosforilación de MDM2 en su serina 395, por la cinasa ATM, el cual es un comportamiento similar al de *p53*. Hasta el momento no se han reportado

chaperonas que apoyen en su interacción, pero lo que si se abordó fue la exploración de la región del RNA que puede ser el responsable de la unión.

En 2021 Hernández-Mongue y colaboradores eliminaron 265 nt de la región 5'UTR de *Rb*, consiguiendo determinar que dichos nucleótidos sí son necesarios para la traducción de dicha secuencia, ya que disminuía la expresión de la proteína dependiente de MDM2, así mismo con ensayos como el PLA (*proximity ligation assay*) mostraron exitosamente la interacción y localización en los polisomas en caso de tener la región 5' completa **figura 1 H**. En este trabajo también se mostró el incremento de la proteína Rb dependiente de MDM2 en líneas celulares como HEK293, C33 y H1299 (Hernandez-Monge et al., 2021).

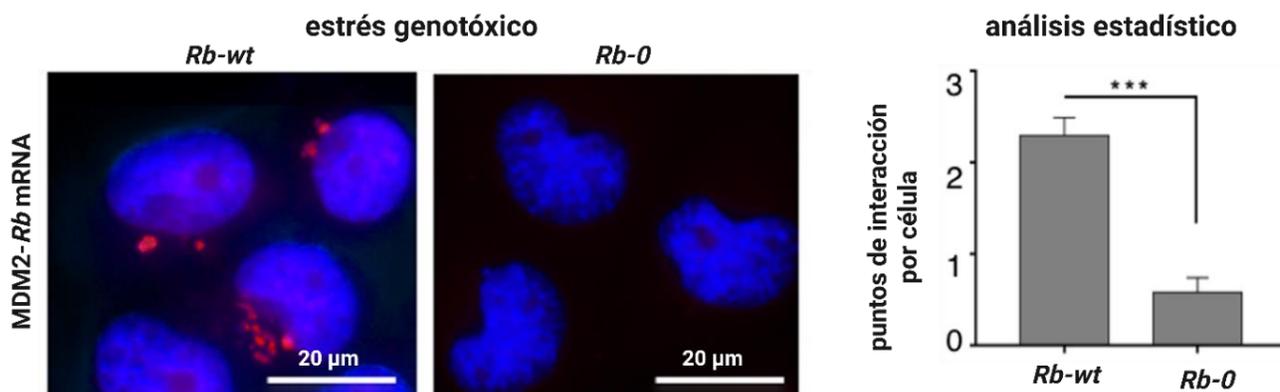


Figura 1 H. MDM2 reconoce el 5'UTR de *Rb* in situ. Los puntos rojos muestran la interacción de ambas moléculas con la técnica PLA (*proximity ligation assay*) en células H1299 K.O -/- *Rb*. El núcleo se tiñó con DAPI de color azul. El etopósido se utilizó como agente para generar estrés. *Rb-0* elimina 265 nt perteneciente a la región 5'UTR que sí contiene *Rb-wt*.

1.2.6 Caracterización del IRES de *Rb*

Fue hasta en el trabajo de Ma y colaboradores en 2023, que se nombró la actividad IRES de *Rb*, su trabajo destaca en el uso de un sistema de reportero dicistrónico, donde compararon el comportamiento de una región de 5'UTR de *Rb* (~100 nt) con la de un IRES conocido (NF-κB) en A2780 líneas células cancerosas de ovario y HEK 293, de riñón no cancerosas. La actividad resultante de la construcción de *Rb* fue más alta que el control positivo y el negativo (plásmido vacío), pero solo en la línea A2780. Este trabajo también exploró el comportamiento en la fase G₀/G₁. (Ma, W. et. Al 2023).

Por parte de nuestro grupo de investigación, en el 2023 se reportó un mapa de los posibles motivos estructurales de *Rb* específicamente de su región 5' **figura 1 I**. En

esta tesis de licenciatura se enfocó en encontrar regiones bidimensionales con características comunes de los IRES con el uso de software.

Con las estructuras encontradas se realizaron construcciones de *Rb* en un vector de expresión. El *Rb wt* clonado que se utilizó contiene 265 nt en el 5' y toda su región codificante. Para una de las construcciones se recortaron 53 nt (del -265 al -213), esta versión de *Rb* se nombró *Rb-210* conteniendo 212 nt de 5' con los 3 principales motivos bidimensionales encontrados en la **figura 1 I**. Para los estudios de expresión también se utilizó *Rb-0* del trabajo de (Hernandez-Monge et al., 2021) que se caracteriza de contener solamente la región codificante. Dichos ensayos se realizaron con la línea de cáncer pulmonar H1299 *Rb -/-*, donde se transfectó

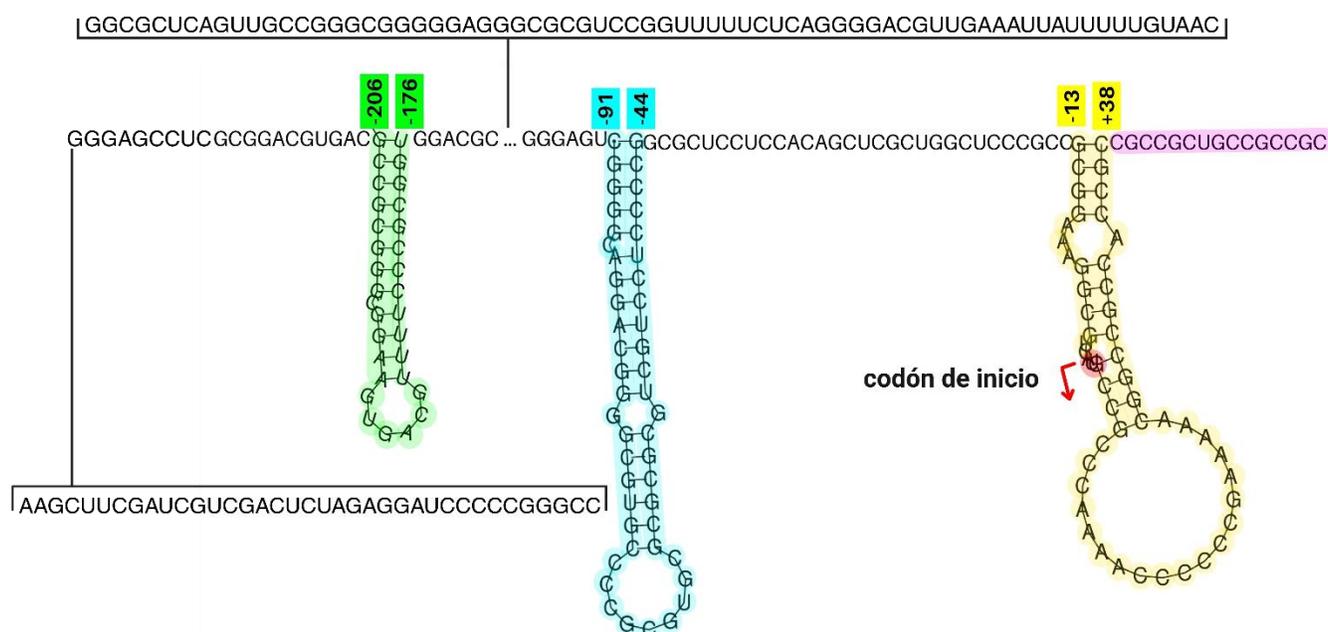


Figura 1 I. Simulación de los motivos bidimensionales del 5'UTR de *Rb*. Exploración de plegamiento secundario de los 265 nt correspondientes a la región 5' no codificante y 53 nt codificantes de *Rb*. En esta simulación se encontraron tres estructuras interesantes en verde, cian y amarillo. Modificado de la tesis de Licenciatura de (Martínez-Partida, 2023).

o no MDM2, con estrés genotóxico que mostró niveles de expresión de *Rb-210* mayores incluso que *Rb-wt* (Martínez-Partida, 2023).

Los resultados anteriores tuvieron continuación en con la tesis de maestría de la misma autora (Martínez-Partida, 2024) con la implementación de otras construcciones, entre ella *Rb-106*, que deja de considerar el motivo verde de la **figura 1 I** y *Rb-13*, que solo contiene el motivo amarillo. Los niveles relativos de la expresión de Rb dependiendo de la transfección de MDM2 se muestran en la **figura 1 J**. Los resultados muestran la cuantificación del triplicado de proteína en *westerblot* (Martínez-Partida, 2024).

A excepción de *Rb-0*, todas las construcciones en presencia de MDM2 incrementan su expresión, siendo estadísticamente significativa la construcción *Rb-210*, que superó el comportamiento de la versión completa *Rb-wt*. A partir de estos resultados se utilizó MXfold2, para explorar nuevas regiones acotando del -210 al +50, en la **figura 1K**, que propone motivos diferentes a los anteriores, (Martínez-Partida, 2024). Es muy interesante observar que el motivo cian del nucleótido -91 al -44, conserva una estructura similar en ambas simulaciones.

Por otra parte, el grupo busca la caracterización de la región esencial de MDM2 para que interactúe con *Rb*, aún desconocida. Dicho trabajo se explora con el

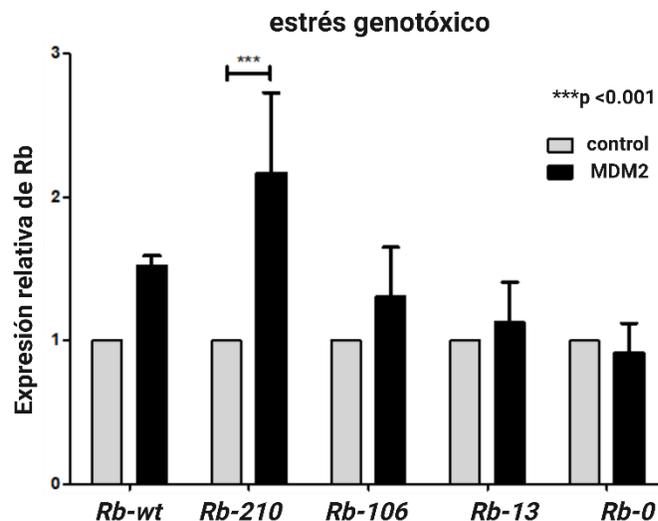
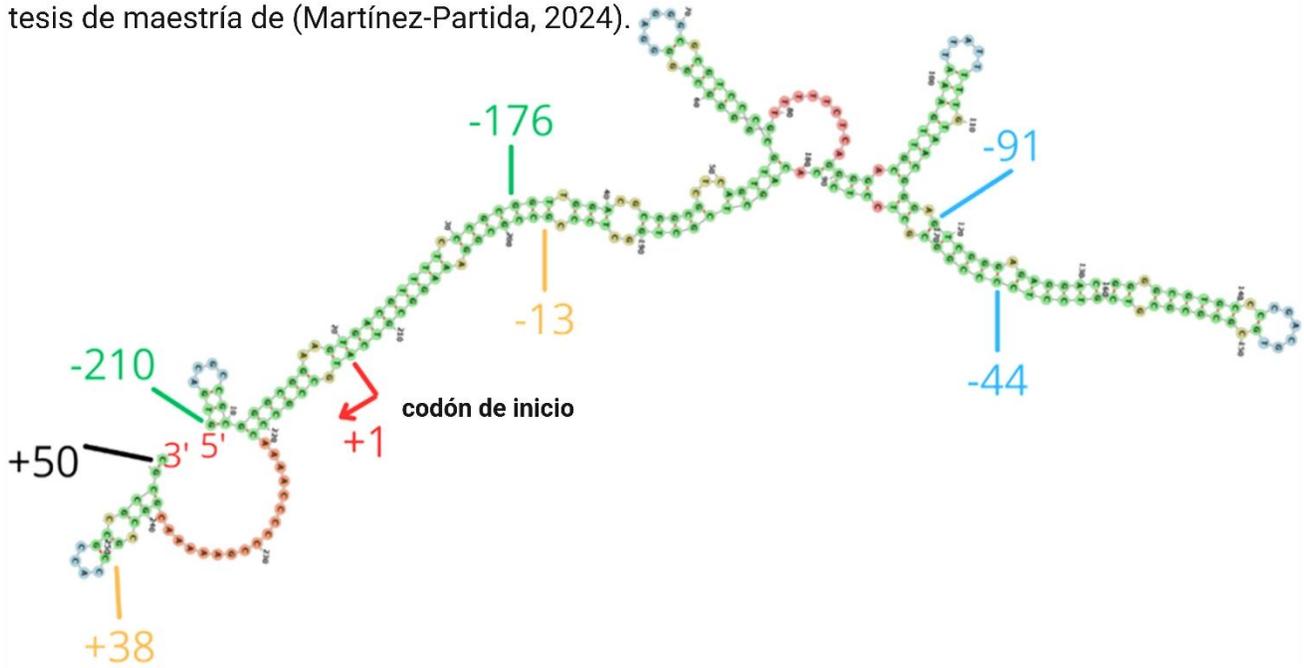


Figura 1 J. Expresión de construcciones de Rb en estrés genotóxico. Incremento estadísticamente significativo de *Rb-210* al agregar MDM2 en células H1299 *Rb* $-/-$ con estrés al DNA. Modificado de la tesis de maestría de (Martínez-Partida, 2024).

fraccionamiento de la proteína en sus dominios para utilizar técnicas como la proteólisis de lisis limitada, para determinar la región de interacción con RNA. Resultados aún no publicados del trabajo de doctorado de Rodríguez-Rodríguez A. U., preliminarmente indican la importancia del dominio N-terminal para aumentar la expresión de *Rb*.

Figura 1 K. Análisis de estructuras secundarias del -210 al +50 de Rb con MXfold2. Plegamiento secundario al eliminar 55 nt del 5', donde los motivos en verde, cian y amarillo de la **figura I** cambiaron, con los números y color se indica la extensión anterior. Modificado de la tesis de maestría de (Martínez-Partida, 2024).



II. CAPÍTULO 2

2.1 Justificación

El estudio propuesto se enfoca en el comportamiento que tiene la proteína MDM2 con los RNAs mensajeros de *p53* y *Rb*: ambos son compañeros de interacción de MDM2 durante estrés genotóxico; son supresores tumorales relevantes en el control del ciclo celular; utilizan el mecanismo de IRES para ser traducidos; así mismo esta proteína expone secciones diferentes de su superficie a cada uno ellos.

La pregunta que queremos resolver es ¿MDM2 genera una interacción simultánea con los mensajeros de *p53* y *Rb*, y es capaz de exportarlos del núcleo para que sean traducidos a proteínas al mismo tiempo? Para el estudio de cáncer y diseño de nuevos fármacos, esto podría ser muy relevante por su rol como protooncogén (gen que puede conducir al desarrollo del cáncer) (S. Wang et al., 2017) (Burgess et al., 2016).

Así mismo, este proyecto considera utilizar diversas técnicas de estudio de biomoléculas para su uso en ensayos *in vitro*, para ayudar a la comprensión de nuevas interacciones de MDM2 con significancia funcional de posibles complejos ribonucleoproteicos (RBPs) aún desconocidos en la célula.

2.2 Objetivos del trabajo

General:

Estudiar las interacciones de MDM2 con los RNAs de *p53* y *Rb* con una propuesta de inmovilización en sílice.

Específicos:

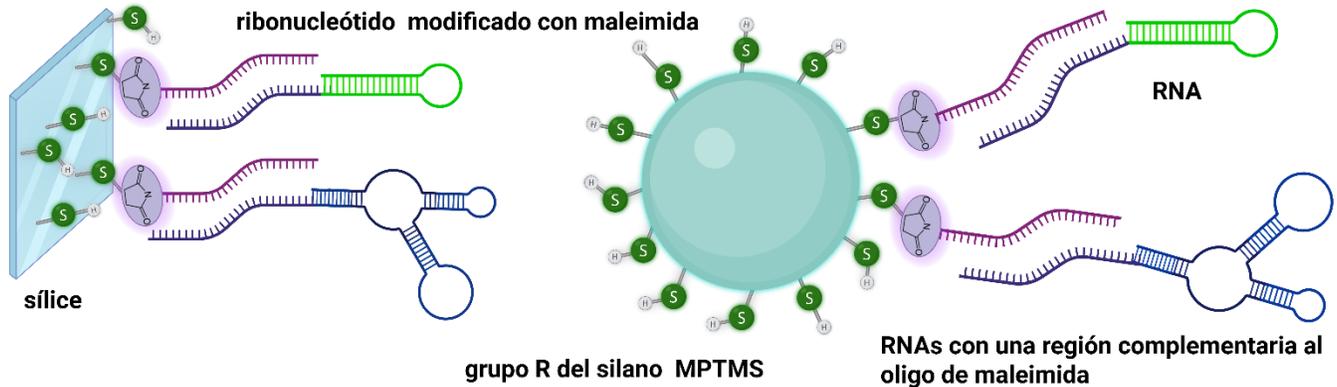
- estandarizar condiciones de silanización de partículas SiO₂,
- producción de proteínas recombinantes MDM2 y MDMX, y de RNAs *in vitro* (variantes y controles de *Rb* y *p53*) idóneos a las condiciones celulares,
- generar ensayos bioquímicos para conocer las condiciones de interacción de las biomoléculas.

2.3 Propuesta de trabajo

En la tesis de maestría (Contreras-Sánchez, 2021) se utilizó la ingeniería de superficies funcionalizadas como un método para detectar ácidos nucleicos. Esta prueba de detección de cadenas de nucleótidos tenía como objetivo proponer una manera de diagnóstico a enfermedades virales. En su modelo se usaron partículas de óxido de silicio (SiO₂), las cuales se silanizaron con deposición de vapor, específicamente con 3 *mercaptopropyl trimethoxysilane* (MPTMS). El silano se propuso para formar el enlace covalente con la molécula de maleimida, que se añadió como modificación a los extremos de oligonucleótidos específicos a la secuencia que se buscaba detectar.

Inspirado en el modelo planteado, proponemos un modelo similar de funcionalización de partículas, con silanos para hacer uso de modificaciones de RNAs

Figura 2 A. Sistemas de inmovilización en sílice. Con la deposición química de vapor se obtienen monocapas de silanos que por hidrólisis se unen a la superficie del SiO₂. En la figura se ejemplifica el MPTMS con su grupo tiol característico. En morado se muestra el oligo sintetizado con maleimida, afín a grupos tioles. Con esta unión se podrán inmovilizar secuencias de RNA, si hibridan con el oligo.



con maleimida, como forma de inmovilización de dichas cadenas en superficies de sílice. Este modelo se muestra en la **figura 2 A**.

La inmovilización la proponemos con un sistema de sondas con especificidad a los RNAs de interés con el fin de que con el mismo ribooligonucleótido, sea posible hibridar todos los RNAs de nuestro interés. Debido a que estas secuencias las tenemos en el vector pcDNA 3.1 y de así obtendremos los transcritos, se ideó un plan que

aproveche tal vector, que se muestra en la **figura 2 B**.

El vector pcDNA 3.1 contiene una región promotora T7, a partir de la que se genera el transcrito de interés, seguida del sitio múltiple de clonación. Las secuencias de nuestro interés se introdujeron al vector con la enzima de restricción *HindIII* (*p53* y *Rb*). Por lo que el diseño del oligonucleótido se apoyó de esta ventaja

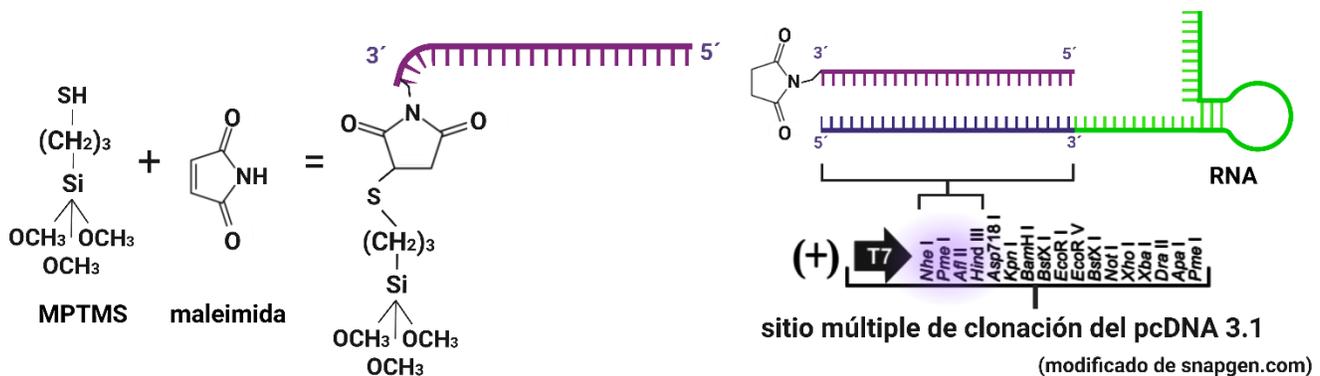


Figura 2 A. Enlace covalente entre SH y maleimida-ribonucleótido. Esquema de la reacción del grupo sulfhidriilo con la maleimida de los ribonucleótidos, con ejemplo de la orientación de la secuencia a hibridar común entre transcritos de secuencias insertadas en el vector pcDNA3.1.

III. CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Proteínas recombinantes

Para este proyecto necesitamos estudiar de forma individual proteínas, y la manera más sencilla de obtenerlas en gran cantidad y a bajo costo es con el uso de hospederos, como las bacterias. Específicamente *Escherichia coli* (*E. coli*) es de los organismos modelo genéticamente más estudiados y fáciles de utilizar: su tasa de división es de 20 minutos; necesita de medio barato; es más seguro que otros bichos; y necesita de temperaturas fáciles de manejar (Hayat et al., 2018).

La bioingeniería han logrado tener diversas cepas de *E. coli* con mecanismos mejorados para aumentar la producción de las proteínas como la disminución de sistemas proteolíticos para evitar que la proteína sintetizada y acumulada sea degradada, al eliminar el gen *OmpT*, encargado de hacer proteólisis al romperse la membrana o añadiendo *IS186* en el promotor del gen *Lon* para eliminar proteasas (Rosano et al., 2019).

BL21 (DE3) es una de las más famosas cepas utilizadas y está es donde nosotros transfectamos secuencias de nuestras proteínas de interés o incluso en la cepa *BL21 star* que tiene mejoras para la estabilidad del mRNA. (Z. X. Zhang et al., 2022)

En este trabajo se necesitó la versión fosforilada de MDM2 y MDMX, para obtener

así MDM2 S395D y MDMX S403D con el fin de estudiar la condición de estrés genotóxico de ambas proteínas. Así mismo también se produjo MDM2 silvestre (WT) y MDM2 S166D para estudiar el efecto de crecimiento celular normal de MDM2 como control negativo de nuestras interacciones con *p53* y *Rb* mensajeros (Gnanasundram et al., 2020).

Las mutantes fosfomiméticas son generadas por una mutagénesis sitio dirigida a aminoácidos que puedan fosforilarse, cambiando el codón de interés por un ácido aspártico (D) (o glutámico), debido a que este simula ser un residuo fosforilado, debido a su carga y tamaño, como se observa en la **figura 3 A**.

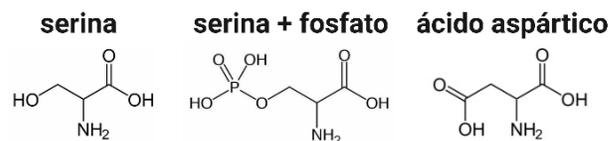


Figura 3 A. Fosfomimetización de aminoácido serina. El comportamiento de un ácido aspártico simula el residuo de serina al estar fosforilado.

3.1.1 Producción de proteínas recombinantes

La producción de proteínas lo realizamos con el vector *pet-28^a* (+) mostrado en la **figura 3 B**, donde las secuencias de interés se clonan. Este es de origen bacteriano diseñado para agregar una etiqueta de 6 histidinas (6xHis), contiene un sitio de trombina, para que posteriormente la etiqueta pueda retirarse (*pET-28a(+)* Vector Map And Sequence, s. f.).

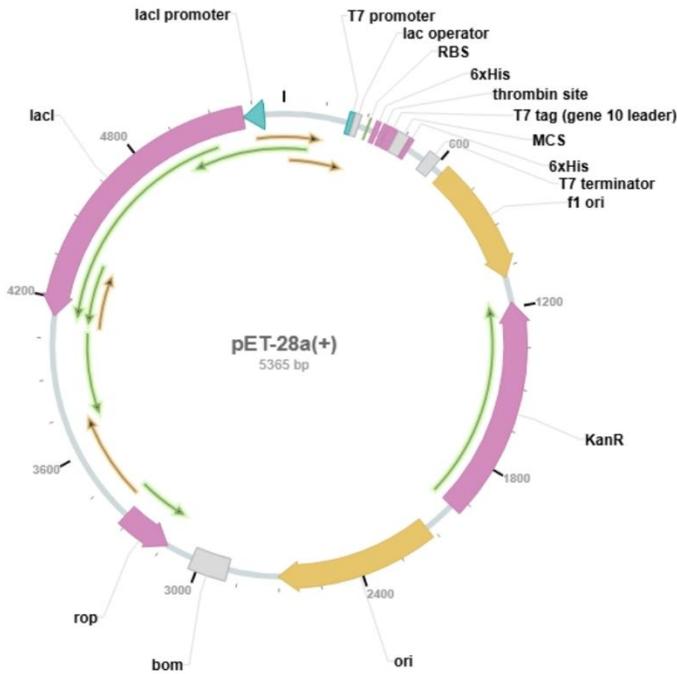


Figura 3 B. Mapa del vector pET-28a(+). Vector de 5,365 de pares de bases con promotor T7, operador *lac*, una secuencia de 6 histidinas y un casete de resistencia a kanamicina. Tomado de *novoprolabs.com*.

El vector se expresa con la T7 polimerasa, codificada por elementos lisógeno *DE3*, por ello su popularidad al utilizarse con la cepa *BL21 (DE3)* (Luís et al., 2025). La transcripción de la secuencia depende del represor *Lac*, que necesita de un inductor como la lactosa o su análoga alolactosa, para que unido al operador, reduzca su afinidad y permita que la polimerasa una al promotor y se transcriban las secuencias. El inductor utilizado generalmente es *1-isopropyl-β-D-thiogalactoside* (IPTG) descubierto en 1961, y al no ser un sustrato metabólico, se mantiene estable en el cultivo. Un anti-inductor es el *orthonitrophenyl-β-D-fucoside* (ONPF), que incrementa la afinidad del operador con el represor. (Lewis, 2005).

Debido a que MDM2 y MDMX son proteínas con dedos de zinc (*finger domain*), se utiliza sulfato de zinc como complemento en el medio 2XYT (*2X yeast extract-tryptone*) (Rousset-Roman et al., 2019), este se desarrolló para la propagación de bacteriófagos M13 y eliminar el riesgo de que se terminen los recursos para la bacteria, pero en general es un medio muy rico para la producción de proteínas y se ha reportado tiene mejor rendimiento que LB (*luria broth*). Ambos contienen NaCl, y proteína como fuente primaria de carbón. Un punto a favor de LB es que las bacterias tienen una fase de muerte menos severa, que al usar 2XYT. (Kram & Finkel, 2015). **Transformación:**

MATERIALES

Plásmido de interés, alícuota de bacterias competentes (*BL21* o *BL21 star*), hielo, incubadora a 42 °C (grados Celsius), medio LB, cajas de medio LB con antibiótico, microtubos de 1.5 ml (mililitros), incubadora con 200 rpm (revoluciones por minuto), centrifuga *mini-spin*, pipetas y puntas del rango de 1 µl (microlitro) a 1 ml, medio 2XYT, antibiótico correspondiente (kanamicina o ampicilina, según los casetes de resistencia), matraces para pre-cultivos y cultivos, IPTG 1M, espectrofotómetro para medir la densidad óptica (OD) a 600 nm de longitud de onda, mediante la turbidez de la muestra conocemos la concentración de bacterias.

MÉTODO

1. Se descongela por 20 min (minutos) 50 µl de células competentes y se

adiciona re-suspendiendo la mezcla, 1 μ l de plásmido, equivalente de 50 a 100 ng (nanogramo),

2. se incuba en hielo 30 min y posteriormente se da un choque térmico de 45 s (segundos) a 42 °C, y 2 min en hielo,
3. se adicionan 400 μ l de medio LB e incuba 1 h (hora) a 37 °C a 200 rpm,
4. se centrifuga a temperatura ambiente (TA) con un pulso a máxima velocidad en una centrífuga *mini-spin*. Y se decanta el sobrenadante (SN) dejando alrededor de 50 a 100 μ l,
5. sembrar homogéneamente con un asa de vidrio el *pellet* re suspendido en el SN (sobre nadante) en una caja de medio agar con antibiótico (para pet28a es utilizada la kanamicina, para pcDNA 3.1 ampicilina), con su debido control negativo,
6. incubar cajas de 12 a 16 h a 37 °C.

Pre-cultivos:

1. en caso de que tu control negativo esté limpio, inocula una colonia en 150 ml de medio 2XYT con 150 μ l de antibiótico correspondiente e incubar de 12 a 16 h a 37 °C y 200 rpm.

Cultivos:

1. se hacen cultivos de 500 ml en un matraz de 2.5 L (litro), con 500 μ l de antibiótico y 500 μ l de ZnSO₄ (sulfato de zinc) 0.1 M, la densidad óptica del cultivo tiene que ser de 0.2 y se le tiene que agregar lo necesario de pre-cultivo para ello, en algunas ocasiones de los 150 ml sobraré,

debido a que los pre-cultivos varían según la inoculación, cepa y el tiempo de crecimiento,

2. el cultivo (500 ml) se le monitorea la densidad óptica mientras crece a 200 rpm y 37 °C, su OD ideal es de 0.9 a 1.1,
3. se induce la proteína con una relación del volumen final de 1 L de cultivo por 500 μ l de IPTG 1M. El tiempo de inducción a 200 rpm a 37 °C es diferente para cada proteína, para MDM2 y MDMX es durante 3 h,
4. se centrifugan los *pellets* durante 15 min a 4 300 rpm a 4 °C, se tira SN y se congelan los pellets a -80 °C.

*Se recomienda tener *pellets* producto de 250 ml de medio (125 ml si el experimento requiere poca proteína), por lo que si centrifugaste en volúmenes de 500 ml, puedes dejar 100 ml del SN, dividirlo en 2 *falcon* de 50 ml y al obtener los pellets, se tira SN.

3.1.2. Purificación de proteínas recombinantes

La técnica de purificación de proteínas recombinantes mediante columna de afinidad, permite la captura de una proteína recombinante, del resto de proteínas celulares. En este caso, se necesita de una etiqueta de 6 histidinas al final de la secuencia de interés, que están dentro del vector pet28a, y se hace pasar por una columna afín a dicha etiqueta, como lo son las resinas con iones metálicos como Cobalto (Co²⁺) y Níquel (Ni²⁺), que unen las

proteínas específicas. Por competencia se eluyen con soluciones con concentraciones grandes de imidazol, la cual compite con la etiqueta por unir los metales.

Purificación de proteína:

MATERIALES

Reactivos: PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, inhibidor de proteasas de serina), DMSO (Dimetilsulfóxido), Tris A (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, ZnSO₄ 10 μM, glicerol 10 %, imidazol 40 mM), UREA 8 M, agua destilada, UREA 8 M con tritón (0.05X), 2-mercaptoetanol, Tris B (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, ZnSO₄ 10 μM, Imidazol 300 mM), *binding buffer*, etanol al 20 %, NaCl 0.5 M, EDTA 50 mM. NiSO₄, *Buffer binding* (Tris 50 mM, 150 mM, ZnSO₄ ,10 μM, pH 7.5). Las soluciones que participen en los lavados de columna se recomiendan refrigerar a 4 °C.

Equipo: sonicador, *rollermixer*, *vortexer*, pipetas, centrifuga, columnas, falcón, cápsulas para centrifugación y centricones.

MÉTODO

1. Descongelar por 30 min en hielo el *pellet* de proteína (estaba a - 80 °C),
2. añadir 10 ml de Tris con 200 μl de DMSO con 10 mg (miligramos) de PMSF, esta solución se hace al momento, debido a la vida media el inhibidor de proteasas y no se recomienda poner en hielo porque se congela fácilmente por el DMSO,
3. vortexea o re-suspende muestra para que se homogenice y deshaga el *pellet*, y sonica en hielo 12 intervalos de 20 s (130 Watt, 40 % Amp1, 20 k

Hertz) y 20 s de descanso en hielo, al finalizar toma 30 μl que serán la fracción total (F. T.) para el SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio),

4. centrifuga en cápsulas limpias, por 15 min a 10, 300 rpm, y tira el SN que contiene proteínas solubles, debido a que las MDM son proteínas insolubles que quedan dentro de cuerpos de inclusión, el *pellet* que las contiene se buscará solubilizar,
5. para solubilizar la proteína, agrega 5 ml de UREA 8 M, resuspende o vortexea la muestra para homogenizar lo mejor posible, e incuba en el *rollermixer* a 14 rpm y TA (de 20 a 27 °C se obtienen resultados similares), por 2 h, pueden ser unos minutos más sin problema,
6. lava la columna con 10 ml de agua, y después equilibra con 10 ml con UREA 8M,
*siempre al pasar una solución por la columna se estila antes de agregar la nueva solución, pero sin que quede seca por mucho tiempo,
7. centrifugar 15 min, a 4 °C a 10, 300 rpm, y el SN pásalo en la columna y recolecta 30 μl del SN que pasó por la columna, para que sea la fracción no unida (NU),
8. lava la columna con 10 ml de UREA 8M,
9. 10 ml de UREA + tritón,
10. 10 ml de UREA con 9 μl de 2-β-mercaptoetanol,

11. 10 ml de Tris A con 7 μ l de 2- β -mercaptoetanol,
12. eluye la proteína con 9 ml de *buffer* Tris B, toma 40 μ l de esta elución, para el gel,
*pueden ser de 5 a 9 ml, para lograr conseguir toda la proteína que haya quedado en la columna. En mi experiencia poner solo 5 ml deja aún proteína en la columna.

Concentración en centricones:

1. los 9 ml de proteína pura, se ponen en un centricon previamente lavado de 30 kDa, que son para proteínas mayores a este peso,
2. centrifuga 2, 400 rpm por 12 minutos (depende del tamaño de la proteína) o hasta que el volumen ronde los 200 a 500 μ l,

Cambio de buffer: debido a las ventajas que tiene tener la proteína en un *buffer* de unión, puede hacerse cambio del Tris B al *binding buffer*,

3. agrega 5 ml a la proteína concentrada de *binding buffer*, idealmente autoclaveado, para que este esté esterilizado, ideal para ensayos de estudio del RNA, hasta que quede de 200 a 500 μ l,
4. repite el paso 3 veces, buscando la dilución del Tris B que sea necesaria en cada caso.

Lavado de columna para guardarla:

1. pasar 10 ml de Tris B,
2. agregar 10 ml de agua,

3. tapar y agregar agua para que se mantenga húmeda mientras está a 4 °C.

Lavado de columna para usarla:

1. pasar el agua que contiene,
2. agregar 10 ml de agua,
3. agregar 10 ml de Tris B para asegurar no contener restos de proteínas,
4. agrega 10 ml de agua,
5. agregar el *buffer* con el que la equilibrarás.

*Recuerda no dejar secar la columna.

Regeneración de columna: esta es necesaria cuando se ha utilizado en más de 5 veces la columna o cuando cambias proteína a purificar, se logra haciendo pasar las siguientes soluciones:

1. 10 ml de agua,
2. 10 ml de NaCl 0.5 M,
3. 10 ml de agua,
4. 10 ml de EDTA 50 mM,
5. 10 ml de agua,
6. 5 ml de NiSO₄ (si quedara poca resina, se le puede agregar 1 o 2 ml de *His60 Ni Superflow Resin*),
7. 10 ml de agua,
8. 10 ml de Tris A o en caso de usarla al momento se equilibra con UREA 8M.

Equilibrio de centricones:

1. agregar 10 ml de agua y centrifuga 4, 300 rpm durante 10 min a 4°C,
2. agrega 10 ml de Tris B, centrifuga nuevamente,

Lavado de centricones para su almacenamiento a 4 °C:

1. agregar 10 ml de Tris B, centrifugar a 4, 300 rpm durante 10 min a 4 °C,
2. agregar 10 ml de agua y centrifugar,
3. agregar etanol al 20 % y centrifugar,
4. agregar etanol al 20 % dentro y fuera de la columna.

3.1.3 SDS-PAGE

Para verificar que la proteína producida haya sido purificada de la manera óptima, se puede corroborar al visualizar su migración en gel desnaturizante. El SDS-PAGE, se caracteriza por hacer separación de proteínas desnaturizadas (con calor y agentes que eliminan las estructuras secundarias y terciarias) en un tamiz de poli-acrilamida con SDS.

El SDS recubre con una carga negativa la superficie desnaturizada de las proteínas, para que la migración sea relacionada según su peso molecular lo más posible, aunque en ocasiones la carga proteica repercute levemente la migración.

Para la formación del gel, es necesario el APS (*ammonium persulfate*), un reactivo oxidante que al agregar TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina) libera radicales libres de sulfato, que apoya en la polimerización de la acrilamida-bisacrilamida.

SDS-PAGE:

MATERIALES

Reactivos: poli-acrilamida-bis 30 %, Tris-HCl 1 M pH 6.8, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, agua, SDS

10 %, APS, TEMED, etanol al 70 %, *buffer* de proteínas 5 X, marcador de peso *Blueray prestained* o marcador casero, *buffer* de corrida.

Equipo: *kit* de geles verticales (vidrio de 1.5 ml con su contraparte, esponja, soporte del vidrio), peine, cámara de electroforesis, fuente, pipetas, *termoblock* a 90 °C.

MÉTODO

Preparación del gel: receta es para un gel de poli-acrilamida tris/glicina al 8 %.

1. Agregar a un falcón 4.6 ml de agua, 2.7 ml de acrilamida 30 %, 2.5 ml de Tris 1 M pH 8.8, 0.1 ml de SDS 10 % y 0.1 ml de APS 10 %,
 2. antes de agregar 6 µl de TEMED y cargarlo en el gel, comprueba que al llenar de agua el montaje de vidrio no tenga derrames, también nivela el vidrio en una superficie plana,
 3. antes de agregar, mezcla sin hacer burbujas y vacía en el gel, dejando 1.5 cm (centrímetros) para la solución *stack* (donde se pondrá el peine), y rellena con etanol al 70 % para eliminar burbujas y evitar que entre suciedad,
 4. para la solución *stack* agrega a un falcón de 2.1 ml de agua, .5 ml de acrilamida 30 %, .38 ml de Tris 1.5 M pH 6.8, 30 µl de SDS 10 y 30 µl de APS,
 5. mezcla 3 µl de TEMED cuando ya haya polimerizado el gel (~15 min) y adiciónalo hasta llenar ensamble, ya

que sea eliminado totalmente el etanol,

6. coloca el peine en cuanto agregues el *stack*,
7. espera de 15 a 20 min para que se polimerice la acrilamida.

Preparación de proteínas: en el proceso de purificación se recolectan muestras que serán cargadas:

1. se agrega 5 X del *buffer* de proteínas, por ejemplo, a 40 μ l, agrega 8 μ l de *buffer*.
2. se re-suspende y centrifuga, para poner por 5 min a hervir a 90 ° C, y pasado este momento se pueden cargar las muestras o guardarse a 4 °C.

Electroforesis:

1. agregar 30 o menos μ l por muestra, y de acuerdo con la concentración del marcador agrega los μ l correspondientes para tener la referencia de los pesos en kDa (3 μ l si es comercial).
2. agregar el *buffer* de corrida hasta el tope de la cámara,
3. el voltaje y amperaje pueden variar, pero correrlo al menos 30 minutos de 80 a 100 V, es recomendado para que las proteínas pasen la región *stack* lo más iguales posible, posteriormente este puede subirse incluso a 120 V, y de esto dependerá el tiempo que el azul del *buffer* de proteínas salga del gel, el cual indicará que las proteínas más pequeñas están cerca de salirse también,

4. sacas el gel del montaje de vidrios, lo enjuagas con agua y agregas azul de *coomassie* por par de minutos, para calentarlo en el microondas por 40 s,
5. enjuagas con agua y pones otros 40 s en el microondas, con esto lograras ver de manera rápida el comportamiento de tus proteínas, pero es recomendado que incubes en el gel ON, para obtener un patrón más claro de cada uno de los carriles de tus proteínas, ya que, al pasar los días, el azul inespecífico desaparece del gel.

3.2 RNAs *in vitro*

La transcripción *in vitro* para producir RNAs usando la RNA polimerasa T7 (RNAP) es una estrategia muy utilizada, debido a que se pueden generar RNAs largos a no tan altos precios (Tianshuo Liu, 2023). El origen de la polimerasa es bacteriófago, por lo que necesita de un DNA con la región del promotor T7. Este está en diversos vectores como el pcDNA 3.1, que se utilizó para este proyecto y se muestra en la **figura 3 C**.

3.2.1 Producción de RNAs *in vitro*

MATERIALES

Reactivos: DNA puro y linealizado (templado), 10x *transcription buffer*, NTP mix (10 mM), *RNase out*, T7 RNAP, agua libre de nucleasas, *DNase I RNase free*, EDTA 0.5 M pH 8, acetato de sodio 3 M, fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), etanol al 99 %, al 70 % y cloroformo.

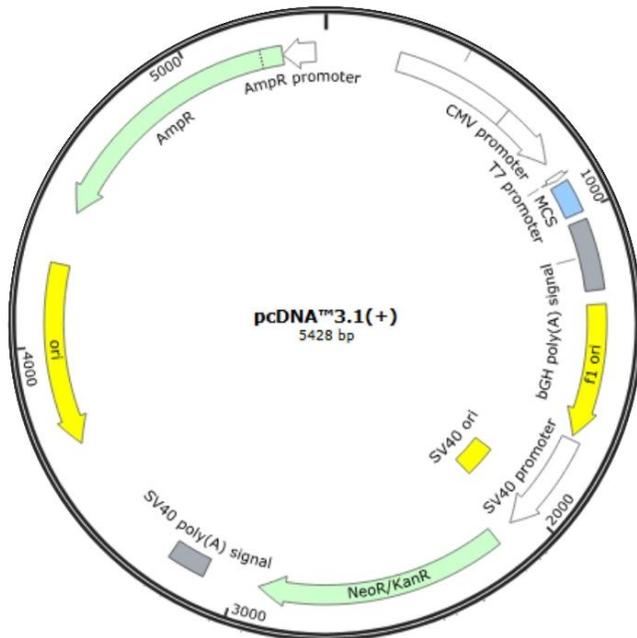


Figura 3 C. Mapa del vector pcDNA3.1(+). Vector de 5,428 pares de bases con promotor T7, promotor CMV de expresión en mamíferos, un amplio SMC (sitio múltiple de clonación) y un casete de resistencia a ampicilina. Editado de *snapgene.com*.

Equipo: incubadora a 37 y 65 °C, hielo, cooler, tubos tipo eppendorfs de 1.5 ml, pipetas, congelador a -80 °C o -20 °C (para conservar los RNAs).

MÉTODO

Producción de transcritos:

Descongelar agua libre de nucleasas, DNA linealizado, en hielo NTPs y el buffer. Las enzimas se mantienen en cooler hasta utilizarse.

1. Preparar reacción a temperatura ambiente (TA) en un tubo *ependorf*, de mayor a menor volumen:

10X transcription buffer	5 µl
NTP mix (10 mM) (2 mM finales)	10 µl
DNA linealizado	1 µg

RNA polimerasa T7 (30 u finales)	1.5 µl
RNase out (50 u finales)	1.25 µl
Agua libre de nucleasas	a 50 µl
Volumen total	50 µl

*se recomienda re-suspender al final o dar toques leves con los dedos como forma de mezclar la reacción,

2. incubar a 37 °C por 2 h con la enzima. Al finalizar este paso se puede congelar la muestra a -20 °C o continuar con los dos pasos siguientes,
3. para remover el DNA, agregar 2 µl (2 u) de *DNase I RNase free*, re-suspende e incuba durante 30 min,
4. para inhibir la *DNase I*, agrega 2 µl de EDTA pH 8.0 e incuba 65 °C por 10 min. Re-suspender muy leve y cuidadosamente la mezcla. Se necesita el EDTA como quelante para proteger el RNA de hidrolizarse a esa temperatura. Después de este paso se puede congelar a -20 °C o continuar con la purificación de los transcritos.

Purificación de transcritos:

1. a los 50 µl de reacción, agregar 85 µl de agua libre de nucleasas y 15 µl de acetato de sodio 3 M, mezclar agitando con la mano levente,
2. agregar en relación 1:1 de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), equivalente a 150 µl, mezclar con la mano y poner a centrifugar 5 min a 16, 000 gravedades (g),
3. extraer el SN con bastante cuidado de no tocar la interfase y ponerlo en otro tubo, agregar el doble del volumen de

- cloroformo (1:2), para centrifugar 5 min a 16,000 g nuevamente,
4. pasar SN en un tubo nuevo, para precipitar el RNA se utilizará 2 volúmenes de etanol (99 %), incubar por lo menos 1 h a -80 °C, posteriormente centrifugar a 16,000 g por 30 min,
 5. remueve el etanol al pipetear con el mayor cuidado de no llevarte el *pellet* de RNA,
 6. enjuaga el *pellet* con 500 µl de etanol al 70 % con el máximo cuidado de no llevártelo en la punta de la pipeta y centrifugar 15 min a 16,000 g,
 7. repite el paso 5 y posteriormente re-suspende el *pellet* con 26 µl de agua, se hacen 5 alícuotas, y el 1 µl, con 59 µl de agua, te permite cuantificarlo,
 8. el mantenimiento es a -20 °C o -80 °C.

3.2.2 Mini prep de DNA

Los *kits* de *mini prep* son una forma rápida de generar DNA de alta calidad a partir de un cultivo celular en *E. coli*. Estos tienen columnas cuyas membranas son de sílice, que les permite ser centrifugadas para tener DNA de longitudes variadas. El protocolo y *kit* utilizado fue de Jena Bioscience (GmbH, s. f.) El DNA obtenido puede servir como plásmido para transformar bacterias y producir las proteínas recombinantes, para generar DNA templado para PCRs, etc.

MATERIALES

Placa de agar con ampicilina, medio LB, *buffer* de lisis con indicador de pH, *buffer* de

neutralización, RNAsa A, *buffer* de activación, de lavado (*washing*) y de elución, columnas de unión, tubos de colecta de 2 ml, columnas de unión, etanol y tubos de 1.5 ml.

MÉTODO

Transformación bacteriana: se hace el uso de el mismo protocolo antes mencionado en la sección de producción de proteínas, pero con el plásmido, medio y antibióticos correspondientes. Los pre-cultivos para estos protocolos no son mayores a 20 ml.

Escoge una colonia de la placa de agar que se transformó. Inocula en esterilidad en 5 ml de medio LB con 5 µl de antibiótico (ampicilina) y genera un control negativo de tu pre-cultivo. Crece por 16 h a 37 °C a 200 (hasta 250) rpm. En caso de hacer el cultivo en un *falcon* de 15 ml, dejar la tapa levemente abierta, es necesario que el *falcon* o matraz sea 4 veces mayor al del volumen del pre-cultivo. Centrifuga a 4,300 rpm en una centrífuga por 15 minutos a 4 °C. Decanta el SN y remueve todo el medio posible.

1. Lisis celular: re-suspende el *pellet* con 300 µl de *buffer* de lisis pipeteado o vortexeando por 1 min,
2. neutralización: agrega 300 µl de *buffer* de neutralización (con RNAsa A) y mezcla suavemente al invertir el tubo de 4 a 6 veces (sin vortexear),
3. centrifuga a 10,000 rpm por 5 min a TA (temperatura ambiente) en una microcentrífuga,
4. el color de la muestra debe de brillar en amarillo indicando un pH de 7.5 e indica una unión de DNA óptima. Y se

- recomienda ajustar con acetato de sodio 3 M a pH 5 antes de continuar,
5. activación de la columna: poner una columna de unión en un tubo para colectar de 2 ml,
 6. agregar 100 µl de *buffer* de activación en la columna y centrifugar a 10, 000 rpm por 30 s en microcentrífuga. Descarta el líquido obtenido en el tubo para colectar,
 7. carga de columna: pon el SN por pipeteo o decante, obtenido en los pasos 3 y 4. Centrifuga a 10, 000 rpm por 30 s. Y descarta el líquido en el tubo de colecta,
 8. lavado de columna: pon la columna con el DNA cargado en un tubo de colecta. Y por 500 µl de *washing buffer* (que tiene etanol) a la columna de unión. Centrifuga por 30 s a 10, 000 rpm y descarta lo coleccionado en la cubeta,
 9. paso opcional: recomendado solo para DNA >200 bp (pares de bases) o más puro, se recomienda agregar 700 µl de *washing buffer* a la columna de unión, centrifugar 10 s a 10, 000 rpm, descartar lo de la cubeta y centrifugar 2 minutos para remover los residuos de *washing buffer*.
 10. elución: pon la columna de unión en un eppendorf de 1.5 ml, agrega de 30 a 50 µl de *buffer* de elución previamente calentado o agua dd (doble destilada) en el centro de la membrana de la columna, deja incubar 1 min a TA. Centrifuga a 10, 000 rpm por 1 min y eluye el DNA.

*realmente son 10, 000 g al centrifugae, en caso de poder, considéralo.

3.2.3 Digestión de DNA

Las enzimas de restricción reconocen de 6 a 8 bases consecutivas y son utilizadas para cortar de forma específica regiones de DNA. En este trabajo tenemos vectores de pcDNA 3.1 con diversas secciones de *Rb* y *p53* insertadas, cortar el DNA de forma específica, logrará que tengamos longitudes de transcritos específicos. Hicimos uso de la enzima *XhoI* y *XbaI*, ambas están justo en la región donde termina la secuencia de *p53-240* que nos interesa para hacer los ensayos. Aunque en un inicio se hizo también para *Rb*, posteriormente implementamos otra estrategia.

MATERIALES

Enzima de interés, DNA puro, *buffer* para las enzimas, agua libre de nucleasas, incubadora a 37 y 80 °C.

MÉTODO

1. Hacer la siguiente reacción a TA:

Buffer de la enzima 10X	4 µl
Enzima	1 µl
DNA	2 µg
Agua libre de nucleasas	completar 40 µl
Volumen total	40 µl

*Para la enzima *XhoI*, se puede agregar hasta 8 µg de DNA (purificado de manera casera) y se mostró tener la misma eficiencia.

*Hay 13 nt desde la región del primer nucleótido transcrito después del promotor T7 hasta la enzima de restricción con la que se insertó la secuencia en el vector, en este caso pcDNA 3.1. Las diferentes secuencias de *Rb* y *p53* fueron insertadas con *HindIII*, por ello que coincida el número de nt del sitio múltiple de clonación.

2. Poner a digerir 16 h a 37 °C,
3. inhibir actividad extra de la enzima a 65 u 80 °C por 20 min, según la enzima, revisar la **tabla 3.1**,
4. una forma de confirmar la linearización es cargando parte de la muestra en un gel de agarosa. En caso de que haya más de una banda, significa que tu vector tiene más de una vez esa región de corte. Si está linealizado, no es necesario que cortes banda y purifiques, sino puedes utilizar el DNA digerido y purificarlo directamente.

En caso de que tengas más de una banda y sepas la longitud de los fragmentos y el de interés. Puede cortar banda y purificarla. La longitud específica de los DNA lineares que se buscan transcribir se muestra en la **tabla 3.1**, dicha longitud considera a partir del promotor T7 hasta la región que corta la enzima.

Electroforesis de gel de agarosa:

MATERIALES

Buffer TAE 1X, agarosa, cámara de electroforesis para gel de agarosa, bromuro de etidio (BrEt), matraz de 100 ml, vaso de precipitado de 100 ml, microondas, marcador de 1 000 pares de bases (1kb).

MÉTODO

1. Para un gel de agarosa 1X, se taran 40 ml de *buffer* TAE 1X en un vaso de precipitado, y agergan 0.4 g (gramos) de agarosa para mezclar vigorosamente en un matraz,
2. colocar en microondas por 20 s, sacas con guante protector de calor y meneas vigorosamente,
3. repetir paso 2 inmediatamente, y dejar reposar por unos minutos hasta que se atempere,
4. colocar 3.5 µl (10 mg/ml), de bromuro de etidio (BrEt), menear vigorosamente y colocar en un molde previamente nivelado, con peine donde sea capaz colocar 50 µl de muestra (peine de 8 pozos), dejar polimerizar por 20 minutos,
5. quitar peine, colocar gel en la cámara, colocar 5 µl de marcador de 1kb, y las muestras de interés,

Tabla 3.1 Enzimas y buffers para cada vector					
DNA	Enzima	Tamaño	Buffer	T° para inhibir	Sitio de corte
<i>p53 240 pcDNA</i>	<i>XhoI</i>	265 nt	2.1/3.1	65 °C	C/TCGAG
<i>p53 240 pcDNA</i>	<i>Xba</i>	271nt	r2.1	65 °C	T/CTAGA
<i>p53 wt pcDNA</i>	<i>SspI</i>	1002 nt	r2.1	65 °C	AAT/ATT
<i>L22L pcDNA</i>	<i>SspI</i>	1002 nt	r2.1	65 °C	AAT/ATT
<i>Rb 0 pcDNA</i>	<i>EcoRV</i>	555 nt	r3.1	80 °C	GAT/ATC
<i>Rb wt pCMV</i>	<i>EcoRV</i>	827 nt	r3.1	80 °C	GAT/ATC

6. dejar correr el gel por 20 min a 80 V (volts) y 335 - 360 A (amperes). Pasado ese tiempo puedes revisar el DNA bajo luz UV y si es necesario más tiempo para tener los fragmentos separados, puedes hacerlo,
7. esterilizar con etanol una navaja para cortar el fragmento del gel de interés y pasarlo a un microtubo de 1.5 ml.

Ahora tienes listo el fragmento de interés, para purificar se utiliza un *kit* como el antes comentado, con algunas variaciones. O puedes hacer uso del método de purificación casero:

Purificación por kit Jena de bioscience:

1. se pesan las bandas cortadas y se pone una relación 1:2 de isopropanol y 1:3 de *binding buffer*, por esto, el número de bandas por tubo es importante, y lo colocas a 60 °C, el tiempo necesario hasta que el volumen sea totalmente líquido,
2. agregar 100 µl de buffer de activación en la columna (puesta en una cubeta de colecta) y centrifugar a 10,000 rpm por 30 s en microcentrífuga. Descarta el líquido obtenido en el tubo para colectar,
3. carga de columna: poner 700 µl del tubo del paso 1 y centrifuga a 10,000 rpm por 30 s. Descarta el líquido en el tubo de colecta,
4. repite el paso 3 hasta lograr cargar todo el tubo del paso 1,
5. lavado de columna: pon la columna con el DNA cargado en un tubo de colecta. Y por 700 µl de *washing buffer*

a la columna de unión. Centrifuga por 30 s a 10,000 rpm y descarta lo colectado en la cubeta,

6. descartar lo de la cubeta y centrifugar 2 min para remover los residuos de *washing buffer*,
7. elución: pon la columna de unión en un *ependorf* de 1.5 ml, agrega de 20 µl de *buffer* de elución calentado levemente o agua dd (doble destilada) en el centro de la membrana de la columna, deja incubar 1 min a TA. Centrifuga a 10,000 rpm por 90 s y eluye el DNA.

Purificación por método casero:

1. remojar algodón estéril en buffer TAE 0.5 X auto-claveado,
2. hacer un hoyo con una aguja en el fondo de un microtubo de 600 µl,
3. exprimir el algodón lo mejor posible, y comprimirlo en el tubo perforado, hasta un ¼ de su volumen total,
4. colocar el microtubo de 600 µl en uno de 1.5 ml y agregar las bandas de agarosa sobre el algodón,
5. centrifugar a TA 5 min,

*Entre mayor sea el tiempo, es posible que logre salirse la agarosa y disminuir la pureza de la muestra, pero solo así se logran tener cantidades mayores de DNA, debido a que originalmente se obtienen alrededor de 100 µl de DNA, se recomienda hacer una nueva purificación con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, por lo que aumentar las centrifugaciones o el tiempo, ya no es tan relevante. Si utilizas solo 5 min de centrifugación esa muestra puede alcanzar

una pureza de 1.7 en el radio 260/280, lo que puede ser útil al hacer secuenciaciones.

*Debido a que el interés en este caso es tener la mayor cantidad de DNA, se hizo el paso 6:

6. repetir el paso 5, agregando 50 µl de TAE 0.5 X cada vez, y agregar un nuevo tubo de 1.5 ml de ser necesario,
7. purificar con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico.

La purificación es parecida a la de transcritos, pero está combinado con el protocolo de *thermofisher.com*, para englobar así ambos:

Purificación por fenol:cloroformo:alcohol isoamílico:

1. agregar 1:1 de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar con vórtex por 20 s y poner a centrifugar 5 min a 16,000 g a TA o a 4 °C,
2. extraer el SN con bastante cuidado de no tocar la interfase y ponerlo en otro tubo, agregar el doble del volumen de cloroformo (1:2), para centrifugar 5 min a 16,000 g nuevamente,
3. extraer el SN con bastante cuidado de no tocar la interfase y ponerlo en otro tubo, agrega 0.5 X de acetato de sodio 3M y 2.5 X de etanol absoluto y deja reposar a -20 °C toda la noche o 1 h a -80 °C,
4. centrifugar 30 min a 16,000 g a 4 °C,
5. remueve el etanol al pipetear con el mayor cuidado de no llevarte el *pellet* de DNA,

6. enjuaga el *pellet* con 500 µl de etanol al 70 % con el máximo cuidado de no llevártelo en la punta de la pipeta y centrifugar 15 min a 16,000 g,
7. deja secar el *pellet* protegido de contaminación,
8. re suspender en 20 µl de agua.

*Los 15 min de centrifugación final se recomiendan en caso de si se deshizo o movió el *pellet* cuando se enjuagó, si quedó intacto puede disminuir el tiempo de centrifugación.

3.2.4 Amplificación de DNA por PCR

Para conseguir transcritos más cortos y debido a que teníamos cantidades reducidas del pCMV de *Rb*, así como teníamos bandas desconocidas en las digestiones, cambiamos de estrategia implementando PCR para todas las secuencias de *Rb*. El oligo *forward* incluía levantar el T7 y la reverse el +210 de *Rb*, la secuencia específica de cada uno se muestra en la **tabla 3.2**, con estos oligos puedes DNAs que te generen transcritos *Rb wt* de 507 nt y *Rb-0* de 248 nt. El programa del termociclador se muestra en la **figura 3 D**.

Tabla 3.2	Oligonucleótidos F y R
<i>Forward T7</i>	TAATACGACTCACTATAGGG
<i>Reverse 210</i>	CCCAAGTTAACCAAGCTCTCTCTG

Receta para la PCR:

Buffer Pfu 10X	5 µl
Buffer Pfu 10X	5.0 µl
DMSO	2.5 µl

DNA 75* ng/μl	1.0 μl
dNTP 10 mM	1.0 μl
Oligo F 10 μM	1.0 μl
Oligo R 10 μM	1.0 μl
Pfu	0.5 μl
Agua	38.0 μl

*se logra perfecto de los 75 a 150 ng.

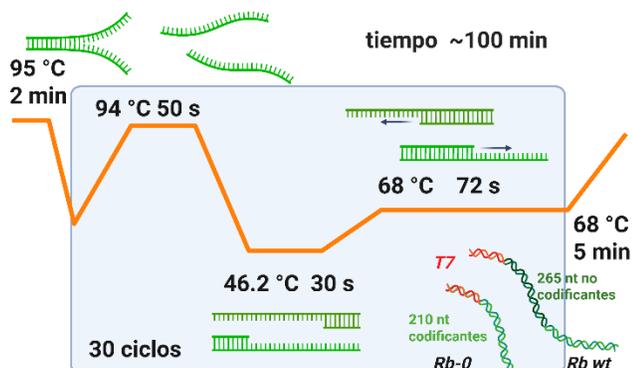


Figura 3 D. Programa de temperaturas para amplicones de Rb. Los amplicones de *Rb wt* y *Rb-0* se obtienen con el mismo par de oligos, pero con diferentes templados, ya sea *Rb wt* pCMV o *Rb-0* pcDNA 3.1.

Respecto a la temperatura de hibridación o *melting* (T_m) es de 43 °C, se calculó con el calculador de Neb (*tcalculator.neb*). Y se propusieron 45, 50, 55 y 60 °C. Fueron exitosos 45 y 50 °C, y posteriormente con otro gradiente se encontró que la T_m ideal es 46.2 °C. El tiempo de elongación depende de la longitud de tus amplicones y el rendimiento de la polimerasa, la nuestra une en 2 min al menos 1 kb, por lo que se propusieron 72 s para unir 600 nt, considerando un exceso, ya que *Rb wt* linear es de 527 nt.

3.3 Mutagénesis sitio dirigida

En este trabajo teníamos 3 versiones de la secuencia de *p53* en el vector pcDNA 3.1: *p53 FL (full length) wt*, la región completa de 1,179 nt codificantes de *p53*; *p53 FL L22L*, la versión completa con la mutación sinónima en el codón 22 ([CUA / CUG]) (Oscier et al., 2002) que generalmente se usa como control negativo de la interacción con MDM2; y por último *p53 240 wt*, una versión con 6 nt de 5' y 240 nt codificantes. Dicha secuencia se considera la longitud mínima para que una fracción del IRES de *p53* forme la plataforma que contiene la horquilla de unión con MDM2 (Malbert-Colas et al., 2014).

Debido a las facilidades de tener una versión L22L para el vector *p53 240*, se propuso generar una mutagénesis sitio dirigida al codón 22.

Las mutagénesis sitio dirigida es una técnica propuesta por Michael Smith en el 78 para insertar mutaciones puntuales en una región de DNA específico, en la actualidad se utilizan un par de oligos con la mutación insertada, que harán que cuando se amplifiquen el templado, este contenga dicha modificación. Una manera de eliminar el DNA original es con la enzima *DpnI*, conocida por localizar sitios metilados y digerirlos, por lo que es necesario un templado generado en bacterias.

3.3.1 Diseño de oligonucleótidos con la mutación

El diseño de los oligos consistió en considerar probar pares de alrededor de más de 40 nt que abarcaran la mutación de forma céntrica, y para que el % de GC no fuese tan bajo. Más detalles sobre estos oligos, está en el **Anexo 7.2**. El par utilizado se muestra en la **tabla 3.3**.

Tabla 3.3 Oligos para la mutagénesis L22L	
p53 L22L F	GAGTCAGGAAACATTTTCAGAC CTGT GGAAC TACTTCCTGAAAACAACG
p53 L22L R	CGTTGTTTTCAGGAAGTAGTTTCCAC CAG GTCT GAAAATGTTTCCTGACTC

Receta para la PCR:

Buffer pfu 10X	5.0 µl
DNA 30 ng/µl	1.6 µl
dNTP 10 mM	1.0 µl
Oligo F	1.0 µl
Oligo R	1.0 µl
pfu	1.0 µl
Agua	39.4 µl

*Algunas veces se utiliza DMSO en PCR con oligos con un % grande de GCs, este caso no lo se recomienda debido que este % es bajo, y a parte, no se recomienda si se usará *DpnI*.

Para calcular los minutos de amplificación, se tomó el peso de ~ 5.4 kb más los ~ 0.25 kb de p53 y restando parte del SMC, se obtuvieron ~ 5.5 kb, que necesitan 11 min aproximadamente, se eligió dejarlo en 12 minutos totales de elongación. El programa utilizado para esta PCR se muestra en la **figura 3 E**.

A pesar de que la T_m teórica son 62 °C, el gradiente realizado involucró un rango de 53 a 65 °C. Posteriormente se hace una electroforesis de agarosa 1 X, para revisar la

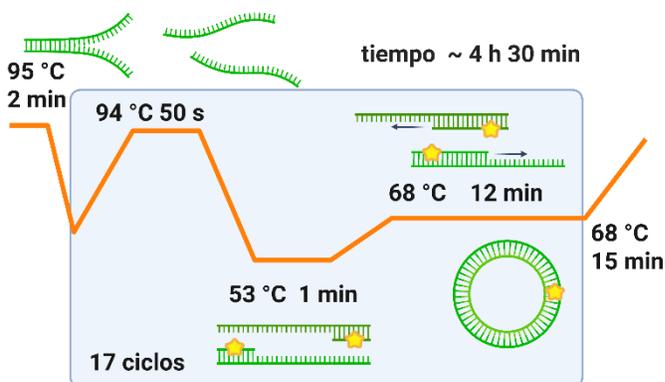


Figura 3 E. Programa de temperaturas para mutagénesis L22L. De las T_m utilizadas en los gradientes utilizados todas amplificaron, pero solo la de 53 °C obtuvo la mutante al secuenciarse. Las estrellas amarillas representan la mutación en los oligos.

la amplificación con 5 µl de reacción y solo para los amplicones exitosos se continúa con el protocolo.

Digestión de DNA metilado:

1. se toman 30 µl de reacción de PCR y 2 µl de agua,
2. se agrega 3.65 µl de *buffer r.CutSmart* y 1 µl de *DpnI*,
3. se re-suspende la muestra y se incuba por 16 h a 37 °C.
4. se inactiva la enzima por 20 min a 80 °C.

Transformación de la reacción:

Se hace el protocolo **3.1.1** de transformación bacteriana pero con las siguientes distinciones: las cepas utilizadas pueden ser *TOP10* o *DH5a*. Debido a que *p53* está en pcDNA 3.1 se utiliza como antibiótico la ampicilina. La cantidad de la digestión que se transforma son 15 µl. El resto del protocolo es igual. Es necesario que también se ponga una placa como control negativo.

En caso de que haya colonias, se continúa con la inoculación para hacer una mini prep como en la técnica **3.2.2** o el protocolo casero al final de **3.2.3** El DNA obtenido se envía a secuenciar.

3.3.2 Secuenciación

Los servicios de secuenciación los pedimos en el Laboratorio nacional de biotecnología agrícola, médica y ambiental (LANBAMA) del Instituto potosino de investigación científica y tecnológica (IPICYT), la técnica que emplean es Sanger (equipo AB 3130) y tecnología capilar. En su página de internet tienen los formularios de las condiciones de tu muestra (De Investigación Científica y Tecnológica, s. f.). La concentración recomendada por lo general son 50 ng/ μ l en un volumen mayor a 20 μ l. El DNA que obtengas lo puedes purificar con protocolos caseros, ya sea de una mini prep o de una banda de agarosa.

3.4 ELISAS (enzyme-linked immunoabsorbent assay)

Los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas son una técnica semi-cuantitativa para estudiar las interacciones de las proteínas *in vitro*.

En este proyecto nos interesa cuantificar las interacciones de estas con RNA, por lo que utilizamos la versión de ELISA-RNA que consta de una placa que se funcionaliza con estreptavidina, en la cual se le agrega complejos de RNA

biotinilado y proteína recombinante al ponerlos interaccionar previamente, para que el RNA se inmovilice en la placa, se lava y la proteína que logre ser detectada con un anticuerpo conjugado a HRP (*horseradish peroxidase*), generará una reacción de quimioluminiscencia si está en contacto con sustrato como el conjunto ECL (*enhanced chemiluminescence*) como se muestra en la **figura 3 F**.

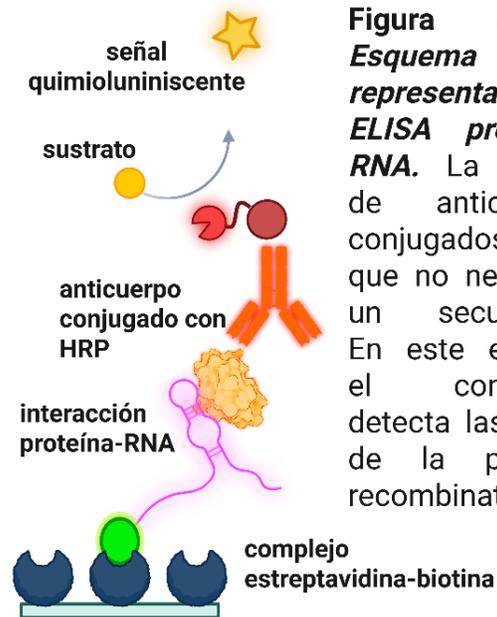


Figura 3 F.
Esquema representativo de ELISA proteína-RNA. La ventaja de anticuerpos conjugados es que no necesitan un secundario. En este ejemplo el conjugado detecta las 6xHis de la proteína recombinante.

3.4.1 Biotinilación de RNA

La biotinilación de RNA es muy común cuando se busca inmovilizarlo en superficies con estreptavidina, el complejo biotina-estreptavidina tiene una afinidad muy grande con una constante de disociación del orden de 10^{-14} . *Pierce RNA 3' End Biotinylation Kit* utiliza a la enzima RNA ligasa T4 para unir al nucleótido del extremo 3' una citidina (bis)fosfato biotinilada que tiene en su

ribosa un fosfato 3', 5' para la ligación (*Pierce™ RNA 3' End Biotinylation Kit 20 Reactions | Buy Online | Thermo Scientific™*, s. f.).

El kit está optimizado para 50 pmol de RNA purificado. Es recomendable trabajar en condiciones libres de nucleasas. De preferencia en campana con uso de cubrebocas.

MATERIALES

Reactivos: *Pierce RNA 3' End Biotinylation Kit* (Thermo SCIENTIFIC 20160): T4 RNA ligasa (20,000 U/ml), *buffer* (10X) de la ligasa T4 RNA, inhibidor de RNAsa (40 U/μl), agua libre de nucleasas, DMSO, PEG 30%, *biotinylated cytidine (Bis) Phosphate* (1 mM) y glicógeno. También 50 pmol del RNA, cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), NaCl 5 M, etanol al 70 % y absoluto.

Equipos: incubadora a 16 °C, centrífuga, termociclador, y congelador a -20 o -80 °C.

MÉTODO

Procedimiento para la ligación del RNA:

1. descongela el DMSO a TA, el PEG 30 % a 37 °C de 5 a 10 min (hasta estar soluble), el resto de los componentes descongelarlos en hielo. La enzima utilizarla en *cooler*,
2. transfiere el RNA (50 pmol) en ~25 % de DMSO a un tubo de PCR y en el termociclador calienta a 85 °C por 2 min, después buscar la forma de que disminuya la temperatura lentamente (en un lapso de 3 min) hasta estar a TA.

*Sugerimos hacer un programa en el termociclador, el programa utilizado: 85 °C 2 min, 70 °C 10 s, 60 °C 10 s, 40 °C 10 s, 25 °C y lo deajo ahí el tiempo necesario hasta necesitarlo en paso 3. Aunque el protocolo de la empresa sugiere que cualquier RNA se ponga en hielo después de los 85 °C.

RNA	50 pmol	----
DMSO	25 %	1.25 μl
Agua	----	----
Total	concentración	5.0 μl

Determinación la concentración del RNA purificado de μg (con A260/280) a pmol:

$(\mu\text{g} \times 10^{-6}) (1 \times 10^{12} \text{ pmol/mol}) / (330 \text{ g/mol}) (\# \text{ bases}) = \text{pmol ácido nucleicos}$

3. prepara la reacción de ligación en orden, la adición de PEG necesariamente es lo último y la mezcla de la solución se hace con una punta nueva (se re-suspende levemente). Cuando inicies el paso 2, inmediatamente haz la reacción, para que el RNA al estar listo, lo incorpores en la reacción. La receta completa es la siguiente:

4. incuba la reacción a 16 °C ON

Agua	3.0 μl	----
Buffer 10X 4T	3.0 μl	1 X
RNase inhibitor (40 U)	1.0 μl	1.33 U/μl
RNA (50 pmol)	5.0 μl	1.67 μM
biotinylated C (1 nmol)	1.0 μl	33.3 μM
T4 RNA ligase (40 U)	2.0 μl	1.33 U/μl
30 % PEG	15. μl	15 %
Final	30 μl	concentración

(*overnight*, 16 h),

5. agrega 70 μl de agua libre de nucleasas.

Extracción de la enzima:

1. agrega 100 μl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Mezclar por inmersión y da vórtex 2 s,
2. centrifuga por 3 min a 16, 000 x g. El SN (fase acuosa) transferirlo a un tubo nuevo.
3. agrega 10 μl de NaCl 5 M, 1 μl de glucógeno y 300 μl de etanol frío al 100 %. Precipita al menos por 1 h a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ o ON a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,
4. centrifuga por 15 min a 16, 000 x g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sin molestar *pellet* elimina el SN,
5. lava el *pellet* con 300 μl de etanol frío al 70 % (re-suspende muy cuidadosamente). Centrifuga como en el paso 4,
6. elimina el etanol sin mover el *pellet*. Dejar evaporar el resto del etanol en un área esterilizada y sin corrientes de aire,
7. re-suspende el *pellet* en 100 μl de agua libre de nucleasas (depende del uso posterior y concentración pmol/ μl que busques). En este caso los 100 μl es para que en cada 1 μl haya 0.5 pmol. Para su posterior uso, conviene hacer alícuotas de 10 y que estas sean lo menos posible descongeladas.

3.4.2 Ensayo ELISA proteína-RNA

Tomado de (Illana & Farhaeus, 2012) con algunas especificaciones

MATERIALES

Reactivos: proteína recombinante (con etiqueta de 6 histidinas), RNA biotinilado, estreptavidina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en 0.1 M de NaHO_3), PBS 1 X con BSA al 3 % y 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptavidina, PBS-T (PBS 1X y 0.1 % de Tween 20), *binding buffer* (Tris 50mM pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.02 mg/ml *yeast tRNA*, 0.2 mg/ml BSA, 100 U/ml de *RNase out*, agua, anticuerpo en PBS 1 X 1:1000 (6X His conjugado con HRP), mezcla 1:1 de ECL1 y ECL2 de *Pierce ECL western*, placa de 96 pozos blanca.

Equipos: centrifuga con rotor para placas, espectrofotómetro VE-6000T, termociclador.

MÉTODO

Procedimiento:

1. cubre cada pozo con 40 μl de la estreptavidina 16 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, cubre con *parafilm* para evitar que se evapore la solución,
2. lava los pozos 6 veces con PBS 1 X (el primer y último lavado con 100 μl y los 4 intermedios con 50 μl),

*cada que elimines solución de los pozos, se tiene que voltear la placa en un recipiente de manera fuerte, para vaciar el líquido evitando ser invasivos con la superficie,

3. agrega 40 $\mu\text{l}/\text{pozo}$ de PBS con BSA e incuba 16 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$,
4. mezcla en tubos de PCR 0.5 pmol de RNA y la cantidad de proteína en el *buffer* de unión,

*para facilitar su uso hice un *stock* de *buffer* donde sean necesarios solo 30 μ l y se tengan 20 μ l disponibles para las diferentes concentraciones de proteína y RNA, estos 20 μ l también pueden utilizarse en caso de modificar el *buffer* necesario. Al agregar las biomoléculas, procura re-suspende 1 o 2 veces uniformemente en cada condición, deja en incubación 30 min a 37 °C,

5. 5 min antes de concluir el paso anterior, lava 4 veces con PBS-T, la primera y última con 100 μ l y la 2 y 3 con 50 μ l, para poder agregar los 50 μ l del paso 4 y tapa con *parafilm*,

6. incuba 1 h a TA,

7. repasa el paso 2, y agrega 40 μ l de anticuerpo 1:1000 conjugado, e incuba 1 h a TA en meneo, cubre con *parafilm*,

8. repite paso 2,

9. agrega 50 μ l de la mezcla 1:1 de ECL1 y ECL2,

10. centrifuga placa a 4, 300 rpm por 2 minutos para eliminar burbujas para leer en el espectrofotómetro,

*hay una alternativa con el reactivo Ultra TMB Elisa para leer ELISAs (REF 34028 de thermoscientific), de manera colorimétrica, su uso y la prueba de dicha solución no logró realizarse, pero es recomendado para no depender de equipos que miden quimioluminiscencia.

3.5 EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*)

La técnica se basa en la movilidad en un gel que tienen biomoléculas como el DNA o RNA cuando se unen a una proteína, y como su migración depende de esta interacción. En este tipo de tamices, se busca que se tengan condiciones no desnaturizantes, para que la proteína y su estructura no tenga afectaciones. Respecto a esta técnica, es

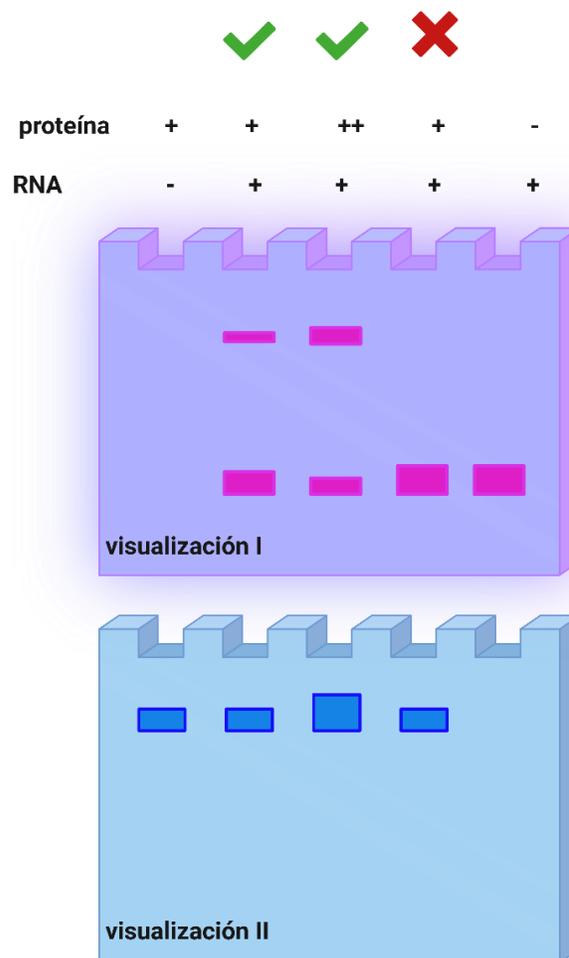


Figura 3 G. Migración de un EMSA proteína-RNA. La visualización I es un ejemplo para visualizar el RNA y la II es para cuando se observan las proteínas. Las felchas indican si hay interacción con RNA-proteína. El primer y último carril muestra la migración de las moléculas individuales.

una manera visual y más sencilla de observar interacciones de RNA. Un ejemplo de esta técnica se expone en la **figura 3 G.**

En el trabajo de tesis de licenciatura de (Martínez-Morales 2025), se exploró la estandarización de esta técnica en geles horizontales de agarosa de 40 ml en *buffer* TAE 1 X con la interacción de proteínas (200 ng), DNA, y su tinción con *coomassie* y BrEt.

Basado en este trabajo, y con el apoyo de Amely Apaseo, estudiante que desarrolló su verano de investigación en Libyc, propusimos el uso de migración de geles horizontales de 10 ml de agarosa en *buffer* TBE, que mejora su tinción, tiempo y manera de visualizarlo.

MATERIALES

Reactivos: proteína recombinante en *buffer* de unión, RNA, *binding buffer* (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, ZnSO₄ 10 µM, pH 7.5), solución fijadora (metanol 50 %, ácido acético glacial 7%), TBE 1 X, agarosa, *RNAse out*, EDTA 50 mM, BrEt 10 µg/ml, agua y *coomasie* diluido 1:5, 1:10 en solución fijadora, *RNAseZAP*, glicerol, *buffer* para RNA 5 X y hielo.

Equipo: cámara de electroforesis para geles de poliacrilamida, así como equipo de vidrios, peines, agitador, termociclador, visualizador de luz UV, autoclave, tubos de PCR, pipetas y puntas.

MÉTODO

Este protocolo necesita que en todo momento se utilice *RNAseZap* en las superficies en las que estará en contacto el RNA, así como el uso de campana estéril para RNA y uso de elementos personales como cubrebocas.

Preparación del gel 1.2 X:

1. se pesan 144 mg de agarosa y diluyen en 12 ml de TBE 1 X, que serán calentados por 20 s en el microondas, se menea la mezcla, y vuelven a calentar hasta llegar al punto de ebullición, necesario para que la agarosa posteriormente pueda polimerizar,
2. se deja atemperar 1 a 2 minutos, para poner en el par de vidrios, previamente colocados en la esponja, en cuando sean agregados, pon el peine sin dejar burbujas, ya que polimeriza muy rápido,

Preparación de muestras:

1. agrega en tubos de PCR proteína en *buffer* de unión, haz el experimento considerando que todas las condiciones tendrán el volumen final igual, independientemente de las concentraciones de RNA, proteína u otros *buffers*,
2. agrega EDTA para que en el volumen de interacción de la proteína y RNA haya 1 µM de este,
3. agrega 1 µl de *RNAse out* por condición,
4. agrega el RNA re-suspendiendo en la muestra, este puede tener un plegamiento previo, como lo es elevar la temperatura a 65 °C por 2 min, y bajar la temperatura a 50 por 10 s, 40 °C 10 s, 30 °C 10 s y luego poner a 4 °C o en hielo,
5. poner a 37 °C de 30 min para permitir la interacción,

Para establecer unión de moléculas que sirvan de conexión entre el vidrio como material inorgánico y un orgánico como las biomoléculas, se han usado en gran medida los silanos, que establecen fuertes enlaces covalentes (Yong et al., 2014) (Idris et al., 2020). Los silanos órgano-funcionales, son híbridos compuestos de sílice que con sus grupos hidrolizables se une al vidrio, y un sustituyente orgánico, que se busca tenga cierta funcionalidad para su unión con algún polímero orgánico (Al-Saadi & Singh Raman, 2022). Además, los silanos tienen un peso molecular bajo, por lo que son muy volátiles (Lu, 2013). Un ejemplo se muestra en la **figura 3 I**, donde se muestra un silano interaccionado con una superficie de sílice.

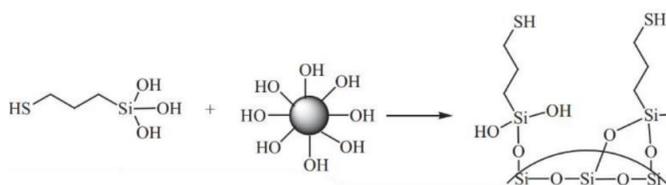


Figura 3 I. Esquema de interacción entre MPTMS y la sílice. Al exponer sitios silanoles el vidrio puede unir silanos, formando enlaces siloxanos. Imagen tomada de Wu et al., 2014.

3.6.1 Lavado de partículas de SiO₂

MATERIALES

Reactivos: *silicion dioxide powder* (SiO₂. 99.5 %, 1 μm, *US Research Nanomaterials, Inc*), agua destilada, alcohol del 96 %, SDS al 10 %.

Equipos: vortexer, baño ultrasónico, centrífuga (Heraeus Megafuge 8), incubadora para secar a 65 °C, báscula analítica (*Analytical series*, ACUARIS

INSTRUMENTS), pipetas y puntas de 10, 200 y 1000 μl, jeringa de 15 ml, tubos falcón de 15 y 50 ml, *ependorfs* de 1.5 ml, sistema generador de plasma de baja presión, centrífuga con rotor para falcón de 15 ml (HERMLE Z 216 MK).

MÉTODO

Lavado de partículas: se pesa lo equivalente a 1 g de partículas de sílice, de 1080 nm de diámetro. Se colocan en un falcón de 15 ml, los cuales se diluyen con 9 ml de agua y 1 ml de SDS 10 %. Estos se pasan en 2 rondas de 5 min en vórtex y 5 min de sonicación. Posteriormente se centrifuga 15 min a 3500 rpm y después se decanta el líquido, dicho proceso de lavado con SDS se hace 3 veces. Enjuague con etanol del 96 %: se colocan 10 ml en las partículas, se dan 2 rondas de 5 min en vórtex y 5 min sonicando, después de las rondas, se centrifuga a 3500 rpm 15 min y se decanta el etanol al finalizar, se repite 3 veces el ciclo de enjuague con etanol. Para secar las partículas se esparcen en el falcón y se dejan en un horno incubación a 65 °C toda la noche.

Al estar totalmente secas, se pesan las necesarias y se llevan 2 minutos en generación de plasma por la máquina productora de ozono, esta es una buena forma de limpiar las partículas debido a que el plasma elimina los enlaces orgánicos que la superficie tiene, en este caso se colocan en un recipiente de vidrio con tapa, se prepara la máquina, y se coloca las partículas en contacto con el plasma 90 segundos, dichos tiempos fueron propuestos en trabajos anteriores

(Contreras-Sánchez, 2021), debido a que las partículas son tan pequeñas, al liberar el vacío tiene que hacerse de forma muy lenta. Al concluir con este paso, se debe continuar con la deposición inmediatamente y protegiendo de que no se contaminen con el ambiente las partículas.

3.6.2 Deposición de vapor química de MPTMS

La deposición química de vapor (CVD) es una alternativa práctica para crear mono capas de organosilanos. En esta deposición de sistema cerrado, la superficie del blanco se pone en una cámara de vacío con un recipiente conteniendo una cantidad del organosilano líquido. Este es vaporizado y logra condensarse en las superficies, incluida la destino. Hay ventajas que tiene esta técnica al compararla con deposición líquida, estas son que disminuye los de agregados en la superficie, control de la humedad en dicho proceso así como que no son necesarios disolventes (Pick et al., 2015).

El silano MPTMS o (3-mercaptopropyl) tri- methoxysilane contiene grupos metoxi interaccionando con el átomo de silicio, que le permiten unirse por hidrólisis al vidrio, así como también como lo indica su nombre, un grupo R que contiene un grupo tiol (-SH), un esquema de su estructura se observa en la **figura 3 J**. Por otra parte, APTES (3-aminopropyltriethoxysilane) contiene un área reactiva con tres grupos etoxi (CH₃O) que covalentemente se une a las superficies, y en el otro extremo de la cadena lineal contiene

un grupo amino, protonado en soluciones acuosas (pK_A = 9.6) (Ito et al., 2011). Por lo que una superficie cubierta presentará una carga positiva, **figura 3 J**.

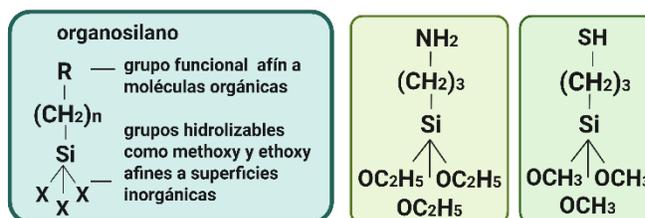


Figura 3 J. Estructura básica de un silano. Ejemplos APTES y MPTMS. APTES con su grupo NH₂ se muestra en oliva y MPTMS con su grupo SH está en verde.

MATERIALES

Equipos: incubadora para secar a 65 °C, bomba y cámara de vacío, dispositivo que rota para funcionalizar confluentemente hecho en el laboratorio (Romero-Rangel (2022), báscula analítica (*Analytical series*, ACUARIS INSTRUMENTS), pipetas y puntas de 200 µl, portaobjetos, *ependorfs* de 1.5 ml.

Reactivos: *silicion dioxide powder* previamente lavadas, MPTMS (SIGMA ALDRICH), APTES (SIGMA ALDRICH, 440140).

MÉTODO

Deposición de fase vapor: se pesan 50 mg de partículas lavadas y expuestas al *Plasma Cleaner*, inmediatamente se colocan 20 µl de cada uno de los silanos cerca del dispositivo de rotación en un portaobjeto, y se ponen las partículas en el centro de la máquina, se enciende el dispositivo para que roten y giren

las estas constantemente por 2 h (Contreras-Sánchez, 2021), así mismo se cierra y enciende la cámara de vacío, esta se recomienda estar en una campana de extracción para más comodidad del entorno de trabajo.

Para este experimento, se propusieron 2 condiciones: partículas con 20 μl de MPTMS y partículas con 20 μl de APTES (como control negativo). Al finalizar las 2 horas se coloca en un *ependorf* y posteriormente se deja en incubación 2 h o incluso lo equivalente a 16 h a 65 °C, al terminar el tiempo se sella y puede guardarse por grandes lapsos de tiempo sin afectación alguna.

3.6.3 Test de Ellman

En 1959 Ellman logró sintetizar DTNB (5,5'-*dithio-bis*-(2-nitrobenzoic acid)), que al interaccionar con un grupo sulfhídrico, puede conseguir reaccionar y formar TNB (2-nitro-5-thiobenzoic acid) (Ellman, 1959), **figura 3 K**. TNB en solventes del rango de 7.6 a 8.6 de pH, tiene un coeficiente molar de extinción que logra ser visiblemente amarillo a 412 nm. Siendo la colorimetría de dicho compuesto, lo que hace el uso de este reactivo una forma de cuantificar grupos tioles, si se estima a partir de una curva estándar de cisteínas (*Thiol-reactive probes, Ellmans's reagent, 2024*). Este mecanismo fue elegido para evaluar la funcionalización del silano MPTMS. Así mismo se eligió el silano APTES como control negativo de esta prueba.

Se hizo uso del protocolo para cuantificar tioles por parte de ThermoSCIENTIFIC. Dicho protocolo recomienda hacer una curva de cisteínas con muestras de 0 a 1.5 mM, de 0.25 a 0.25. El protocolo para las soluciones desconocidas se tiene estandarizado para espectrofotómetros que miden en cubetas del rango de 3 ml. Debido a que para este trabajo se decidieron optimizar las soluciones para probarlo en espectrofotómetro lector de placas tipo Elisa de 96 pozos, se eligió la cantidad de 150 μl para cada pozo, y cada muestra tuvo un triplicado, por lo que en total se necesitan 450 μl de cada mezcla a evaluar. Por comodidad, se prepararon 560 μl de cada uno (debido a que se tiene que centrifugar la muestra con SiO_2 y así evitar tocar ese *pellet* al tomar las muestras). El protocolo original muestra un volumen total de 2.8 ml, en este se preparó un quinto de la receta original.

La solución de Ellman se puede hacer en varios rangos de pH, a mayor valor, más

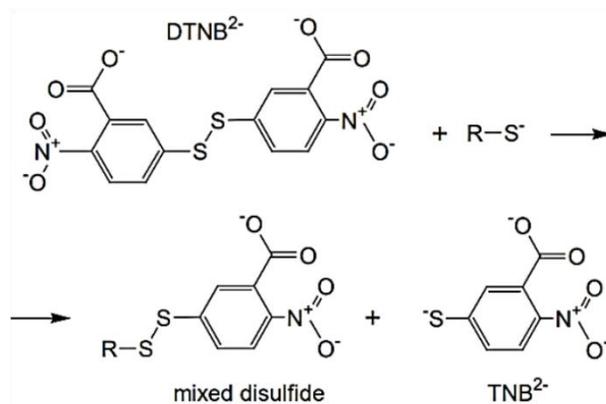


Figura 3 K. Reducción de reactivo Ellman. Esquema tomado de *Thiol-reactive probes, Ellmans's reagent, 2024*, donde se identifican los productos del contacto entre SH y DTNB.

puede haber más pérdida de estabilidad, a pH 8 es de 5 % dentro de 48 h y en pH de 7 no hay pérdida en 7 semanas. Se pesan 4 mg de DTNB para diluirlo en 1 ml del *buffer* de reacción a pH 7, este se debe proteger de la luz en todo momento, así como se recomienda una refrigeración de 0 a 5 °C para su conservación estable de incluso hasta medio año (SigmaAldrich.com, producto D8130).

MATERIALES

Equipos: vortexer, baño ultrasónico, centrífuga (Heraeus Megafuge 8), báscula analítica (*Analytical series*, ACUARIS INSTRUMENTS), pipetas y puntas de 10, 200 y 1000 µl, jeringa de 15 ml, portaobjetos, tubos falcón de 15 y 50 ml, *ependorfs* de 1.5 ml, sistema generador de plasma de baja presión, potenciómetro, centrífuga con rotor para *ependorf* (HERMLE Z 216 MK), SpectraMax ABS (MOLECULAR DEVICES) con lector de cajas de 96 pozos.

Reactivos: *silicion dioxide powder* silanizadas, agua destilada, hidróxido de sodio RA (lenteja), *Phosphate buffered saline* (SIGMA ALDRICH P4417-100TAB), L-Cisteína-HCl-H₂O (Thermo SCIENTIFIC 44889), DTNB (SIGMA ALDRICH D8130), EDTA (SIGMA-ALDRICH PCode 102326221), *buffer* de reacción (0.1 M de fosfatos de sodio, pH 8, con 1 mM de EDTA), *buffer* de reacción a pH 7.

Preparación de soluciones: alícuota de PBS con tampón de fosfatos a 1 M, se obtiene con 1 pastilla de 2 g (P4417) de *Phosphate buffered saline*, por 20 ml, debido a que la reconstitución de una pastilla según

la empresa produce 0.01 M de fosfato (este también incluye cloruro de potasio 0.0027 M y cloruro de sodio 0.137 M con pH de 7.4). Se toman 2 ml y se lleva a pH de 7, mientras que el resto a pH 8. La alícuota de EDTA a 0.5 M se pesa 1.4612 g de EDTA (292.24 g/mol), en 10 ml de PBS previamente preparado, para que se logre disolver es fundamental que se utilice las hojuelas de hidróxido de sodio necesarias, después puede ajustarse el pH a 8. Para la preparación del *buffer* de reacción, en 49.9 ml del PBS (fosfatos 0.1 M) se mezclan 100 µl de EDTA 0.5 M, para que finalice con EDTA 1 mM.

MÉTODO

Curva de cisteínas: para esta se necesita de cada muestra poner 500 µl de *buffer* de reacción, 50 µl de cada una de los mini stocks de cys (cisteínas) de 0 a 1.5 mM. Los 10 µl restantes, corresponden al reactivo de Ellman, cuya adición tiene que ser al final, ya que todas las muestras estén listas y al añadirlo, se contarán 15 min de reacción. Se obtuvieron buenos resultados con vortexear unos segundos para asegurar homogenizar la actividad del reactivo.

Para la alícuota de cisteína a 50 mM, se pesan 8.78 mg de L-cysteine-HCl-H₂O (175.6 g/mol) en 1 ml de *buffer* de reacción, se vortexea lo mejor posible para tener la solución lo mejor diluida previo a tomar de esta, para generar otra alícuota a menor molaridad. Para preparar las soluciones de cisteínas y lograr obtener de cada una 150 µl, las cantidades a partir de esta alícuota son las siguientes: para cys 1.5 mM se toman 15.75 µl de cys 50 mM, y se rellena con

509.25 μl de *buffer* de reacción; para cys 1.25 mM se necesitan 375 μl de la cys anterior con 75 μl de *buffer* de reacción; para cys 1.0 mM se necesitan de 300 μl de la anterior con 75 μl de *buffer* de reacción; para 0.75 mM se necesita de 225 mM de la anterior con 75 μl de *buffer* de reacción; para 0.50 mM se necesitan de 150 μl de la anterior con 75 μl de *buffer* de reacción; y para 0.25 mM se toman 75 μl de la solución anterior y 75 μl de *buffer* de reacción. Para la alícuota de cys 0.0 mM se tendrá el *buffer* de reacción solo. Como recordatorio, se recomienda el vórtex continuo para homogenizar cada una de las soluciones.

Preparación de las disoluciones de SiO₂: se genera alícuota de estas en *buffer* de reacción de 50 mg/ml, por lo que se pesan 15 mg de partículas y diluyen en 300 μl de *buffer* de reacción. Esta es una cantidad que logra disolverse, pero está en el límite donde si no se sónica o se le da vórtex, puede asentarse heterogéneamente.

Análisis de espectrofotómetro: el objetivo de esta metodología es evaluar que tantas moléculas de silanos se adhieren a partículas de SiO₂, MPTMS contiene un grupo SH, que puede reaccionar con el compuesto DTNB y su número se podrá estimar con una curva de cisteínas, por lo que se siguió el mismo cálculo de Héctor en su trabajo: estimar la superficie de una partícula de 1080 nm de diámetro y cuantos MPTMS cubren esa superficie si cada uno tiene un área de interacción de 0.287 nm². Para recubrir un nm² son necesarios 2.1 a 4.2 moléculas de silano en promedio (3.4 de MPTMS). Al conocer dicha cantidad total de

MPTMS por partícula, y su equivalente en moles de SH, podemos obtener el número de partículas (según su peso) necesarias para tener concentraciones mM específicas. Con lo anterior tenemos que una partícula puede tener 2.52×10^{17} moles de SH. Para 1mM de SH serán necesarios 68 mg de estas partículas (Contreras-Sánchez, 2021).

Para conocer la cantidad real de la funcionalización de MPTMS de estas partículas se hizo de 0 a 70 mg (1 mM en 68 mg), y cubrir el rango lineal que nos da la curva de cisteínas. De acuerdo con el dato transpuesto obtenido al revisar la absorbancia de las muestras, se podrá hacer una estimación de la eficiencia de recubrimiento y cantidad de SH en esos mg, por lo que para 70 mg no debemos obtener una concentración mayor equivalente a más de 1 mM.

Para las soluciones desconocidas de las partículas silanizadas, debido a que las alícuotas más cómodas obtenidas fueron de 100 mg/ml (con riesgo de asentarse rápido), se buscó introducir los mg necesarios para cada reacción, pero no en la versión de 50 μl como las cisteínas, sino en 100 μl , por lo que del *buffer* de reacción que se puso para estas fue 450 μl . Los mg/ml que se propusieron evaluar para cada muestra de silanización desconocida, fueron de 0, 14, 28, 42, 56 y 70 mg/ml. La razón de esto es que debido a que la curva de cisteínas funciona en el rango de 0 a 1.5 mM, por lo que como se comentó antes, las muestras desconocidas se hicieron en el mismo rango. Cuando se añade el reactivo de Ellman se da vórtex y deja reposar 15 min, justo al terminar se

centrifuga 10 minutos a 3500 rpm, para que la sílice no afecte la absorbancia de cada muestra.

El reactivo puede observarse con una longitud de onda de 409.5, 412 y 421 nm. En este trabajo se midieron las tres, logrando identificar que no se obtienen datos significativamente diferentes, por lo que para los datos finales solo se consideró la de 412 nm. Para cada pocillo en la caja de 96 pozos, se pusieron 150 μ l de cada una de las muestras preparadas.

Para la regresión lineal de la curva de cisteínas se utilizó *GraphPad Prism 8*, así como también para la interpolación de la absorbancia de las muestras desconocidas de SiO₂ para obtener la concentración de tioles aproximado, respecto a la recta. Los datos introducidos fueron obtenidos de 19 muestras: 7 soluciones de cisteínas y 6 concentraciones de cada una las 2 silanizaciones. Debido al triplicado de las anteriores los datos examinados fueron 57 soluciones totales a las cuales se les midió su absorbancia a 412 nm.

IV. CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 Silanización de MPTMS evaluado con test de Ellman

Para obtener los datos de la silanización se necesita hacer una regresión lineal con cisteínas. La curva obtenida se muestra en la **figura 4 A**, que con su R^2 de 0.99 habla bien de la calidad de la recta para interpolar las concentraciones desconocidas.

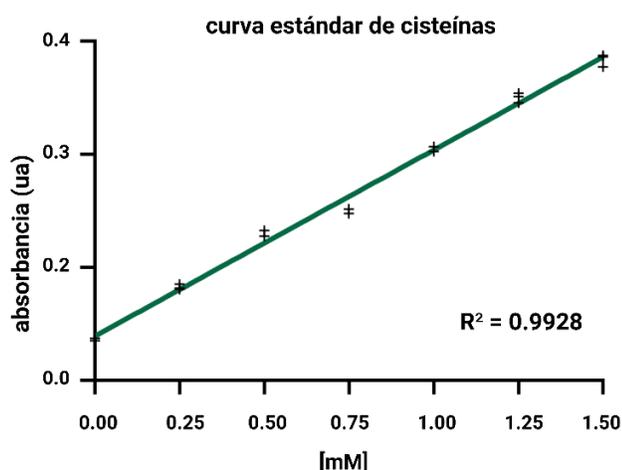


Figura 4 A. Regresión lineal de cisteínas. La curva se obtuvo con un triplicado de mediciones, señales como +. El gráfico se realizó con GraphPad Prism.

El resultado de la interpolación según la curva estándar para las mediciones de la silanización se muestra en la **figura 4 B**. El comportamiento que se obtuvo de las concentraciones de grupos SH arrojó que efectivamente las partículas con MPTMS tienen presencia de grupos tioles en distintas concentraciones, y que en el control negativo, las partículas funcionalizadas con APTES, presentan datos cercanos al cero. El

uso del APTES, solo fue para tener un control negativo de la funcionalización con MPTMS.

Teóricamente la solución de 68 mg/ml de SiO_2 es capaz de unir 1.0 mM de SH, por lo que este recubrimiento no fue tan alto, resultando en un 40 % de lo ideal. A pesar de ello es suficiente bueno si el fin es trabajar con RNA y así evitar impedimentos estéricos.

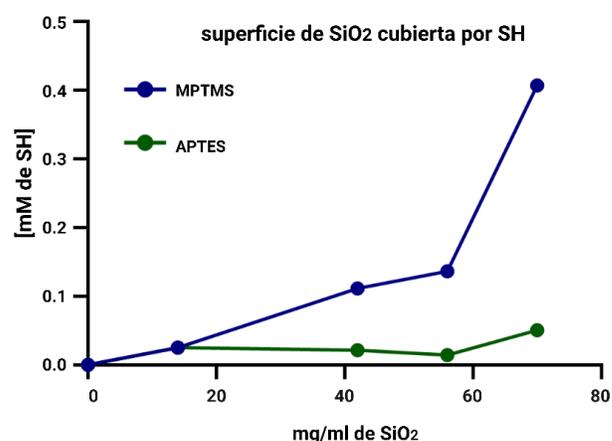


Figura 4 B. Mediciones de la silanización de MPTMS y su control. La interpolación de datos con la regresión lineal de cisteínas, obtuvo que el máximo de superficie cubierta equivale al ~ 40 % del teórico posible. Así como una ausencia de grupos SH en la silanización con APTES. El gráfico se realizó con GraphPad Prism.

4.2 Electroforesis de DNA

Para conseguir DNA linealizado de las construcciones de *p53* se digirieron los vectores con enzimas de restricción. La primera electroforesis de la **figura 4 C** muestra la digestión de la secuencia *p53-240* con la enzima *XhoI*. Para *p53 FL* se obtuvieron dos bandas, mostradas en la electroforesis II de la **figura 4 C**, ya que *SspI*

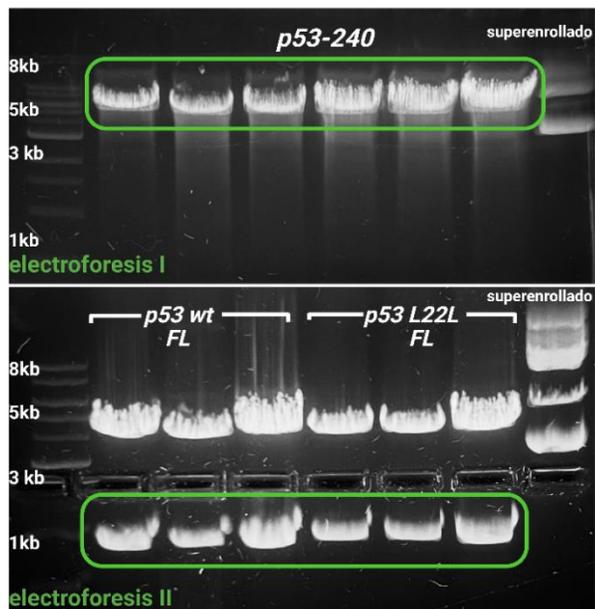


Figura 4 C. Linearización de p53 con enzimas de restricción. En la electroforesis I se muestra en verde la secuencia linearizada de *p53-240* con la enzima *XhoI*. En la electroforesis II, se observan los *p53 FL* digeridos con *SspI*, la región más corta (en verde) contiene el promotor *T7*.

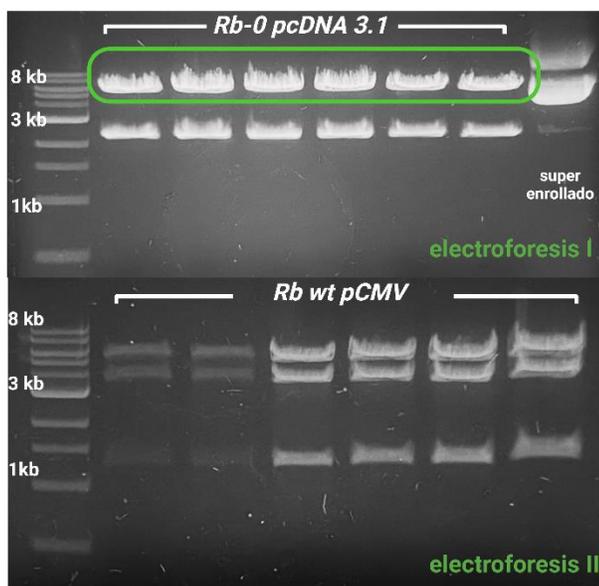


Figura 4 D. Linearización de Rb con *EcoRV*. En la electroforesis I se muestra en verde la secuencia linearizada de *Rb-0* con la enzima *EcoRV*. En la electroforesis II se observan 3 linearizaciones y debido a que en la literatura no está un tercer sitio de corte reportado para en esta construcción, no identificamos la secuencia con el promotor *T7*.

tiene dos sitios de corte en esa secuencia, las bandas de interés con el promotor *T7* son las más cortas y estas regiones fueron purificadas. Con las regiones digeridas se obtuvo el DNA lineal para generar RNA de *p53 240 wt*, *p53 FL wt* y *p53 FL L22L*.

En el caso de *Rb*, se propuso utilizar el sitio reportado *EcoRV*, en la **figura 4 D** se ve en la región verde la sección de interés para *Rb-0*. Cuando se hizo para *Rb wt*, en la electroforesis II, se muestran 3 bandas, a pesar de no haber reportados 3 sitios de corte, por ello se utilizó la PCR para los *Rb*.

La electroforesis del gradiente de temperatura de hibridación (T_m) de los oligonucleótidos se muestra en la **figura 4 E**. Las amplificaciones de *Rb-0* y *Rb wt* se muestran en la electroforesis II. La diferencia en amplicones, es debido a que *Rb wt* tiene

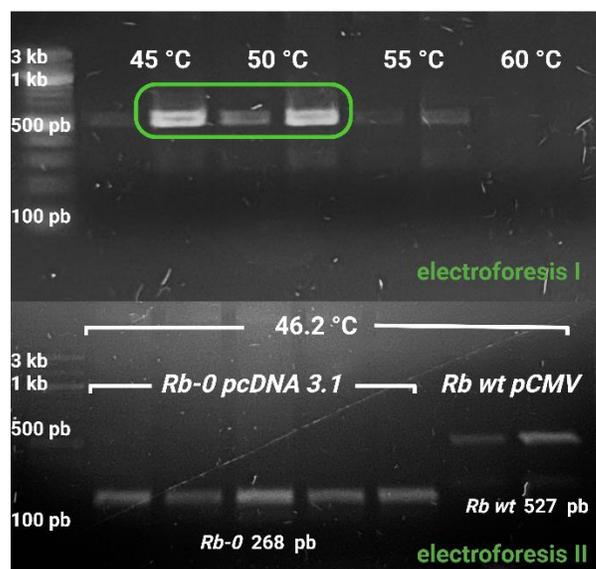


Figura 4 E. Electroforesis de la amplificación de Rb por PCR. En la electroforesis I se muestra en gradiente de los oligos con *Rb-wt pCMV* como templado. En la electroforesis II se tiene la amplificación de *Rb-0* y *Rb wt* con la T_m de 46.2 °C, seleccionada por un mejor resultado, estas bandas se cortaron y purificaron.

527 nt y *Rb-0* 268 nt. Como RNA *Rb wt* tiene una longitud de 507 nt y *Rb-0* de 248 nt ya que el promotor T7 no se transcribe.

4.3 Secuenciación de las construcciones de *p53* y *Rb*.

La secuenciación de las construcciones utilizadas desde la región del promotor T7 al inicio de cada secuencia del DNA de interés, son las siguientes:

p53 240:

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGC
TTACTGCCATG

Rb-0:

TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAG
CTTATG

Rb wt:

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGC
TTCGATCGTCGACTCTAGAGGATCCCCCGG
GCCCGGGAGCCTCGCGGACGTGACGCCGC
GGGCGGAAGTGACGTTTTCCCGCGGTTGGA
CGCGGCGCTCAGTTGCCGGGCGGGGAGG
GCGCGTCCGGTTTTTCTCAGGGGACGTTGA
AATTATTTTTGTAACGGGAGTCGGGAGAGG
ACGGGGCGTGCCCCGACGTGCGCGCGCGTC
GTCCTCCCCGGCGCTCCTCCACAGCTCGCT
GGCTCCCCGCCGCGAAAGGCGTCATG

La sección naranja es el promotor T7, en verde está el SMC, en azul la región 5'UTR y en morado el codón de inicio ATG. Debido a que los *Rb* y *p53* se clonaron con la enzima *HindIII* (su sitio está subrayado), En *Rb wt* se observa que dicha región está en azul, ya que forma parte de su 5'UTR naturalmente.

La región reportada por (*snappgene.com*) como sección del promotor T7 al SMC hasta la región de *HindIII* de pcDNA 3.1 es:

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTG
GCTAGCGTTTAAACTTAAGCTT

Hay 22 nt del SMC ausentes en las construcciones que usamos a la reportada en la literatura. Esta fue la razón por la que se redireccionó el proyecto, cada RNA tendría solo 12 nt comunes y no los 34 que contemplamos para el diseño del oligo con maleimida. Con el sistema de inmovilización en silanos buscábamos que a partir de un solo oligonucleótido se hibridaran distintos RNAs generados a partir de su clonación en pcDNA 3.1 (un vector ampliamente utilizado en la investigación biológica), por lo que 12 nt serían un enlace débil.

Aunque para otros proyectos creemos que puede ser útil que cada oligonucleótido de maleimida sea para secuencias específicas, que incluso contengan región del RNA.

4.5 Resultados de la mutagénesis sitio dirigida

El experimento de la mutagénesis sitio dirigida del vector *p53-240*, se realizó exitosamente a partir de generar una PCR con T_m a 53 °C, la electroforesis de las diferentes PCRs está en la **figura 4 E**.

En la **figura 4 G** está la comparación de *p53-240 wt* y *p53-240 L22L* mutado exitosamente. En el segundo carril se ve un cambio de CTA (leucina) a CTG (leucina), el cual corresponde a la mutante sinónima buscada. Así mismo se muestra el cromatograma de dicha región.

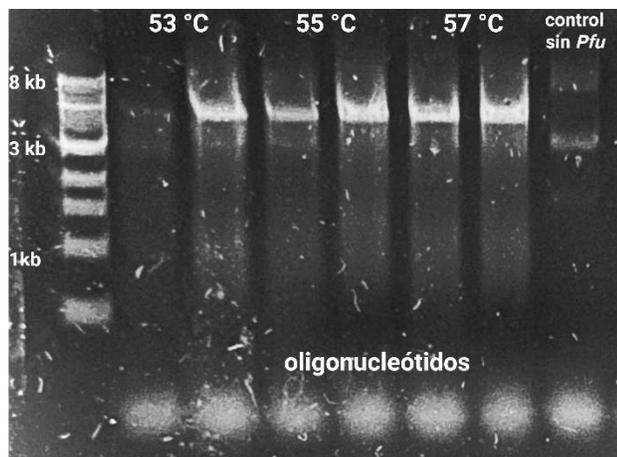


Figura 4 F. *Electroforesis de la PCR para la mutagénesis de p53*. En la electroforesis se cargó una mínima cantidad de reacción. Al resto se le agregó *DpnI* para degradar el templado y se trasformó para generar *mini-preps* y secuenciar.

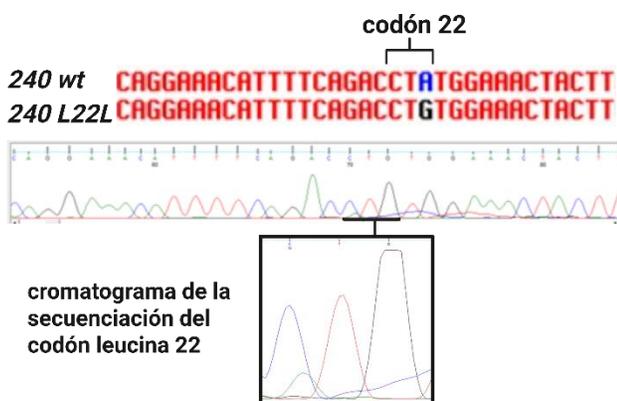


Figura 4 G. *Multialing y cromatograma de la secuenciación de p53*. Los resultados de la secuenciación de las construcciones de *p53* corroboraron que solo la PCR a 53 °C de Tm resultó en la mutagénesis del codón 22. La región que se muestra es del codón 16 al 26.

4.4 Purificación de proteínas MDM2, MDM2 S166D, S395D y MDMX S403D

La purificación de las proteínas recombinantes se logró gracias a los protocolos utilizados en el grupo de investigación, es por ello que las proteínas se obtuvieron con esta pureza, como observa

en la figura 4 H, donde se muestran las diferentes fracciones en un gel de SDS-PAGE y la proteína pura y concentrada, aproximadamente de 80 a 100 kDa.

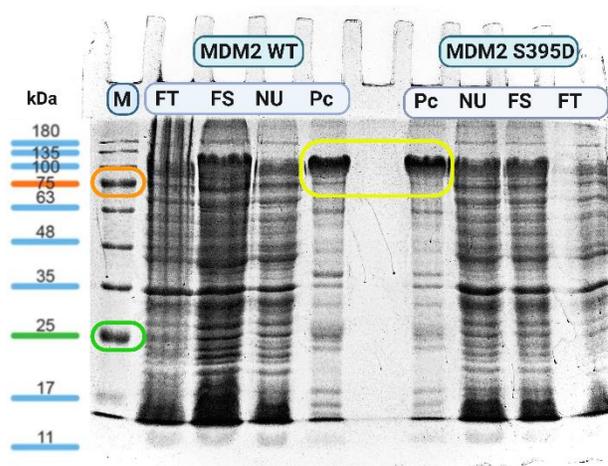


Figura 4 H. *SDS-PAGE de la purificación de MDM2 wt y S395D*. Migración de muestras del proceso de purificación de las proteínas en gel tris-glicina 8 % al ser teñido con *coomassie*. FT: fracción total. FS: fracción soluble. NU: no unida en la columna. Pc: proteína concentrada. M: marcador blueray con referencia de pesos tomada de genedirex.com. En amarillo se señalan las proteínas de interés.

Con el análisis de los resultados anteriores, se implementó en el resto de purificaciones con un lavado extra figura 4 I, J y K. En las diferentes versiones de MDM2 la pureza de la proteína fue notoria, comparada con la figura 4 H, pero MDMX de la figura 4 J con el mismo lavado extra no mostró un patrón así de limpio.

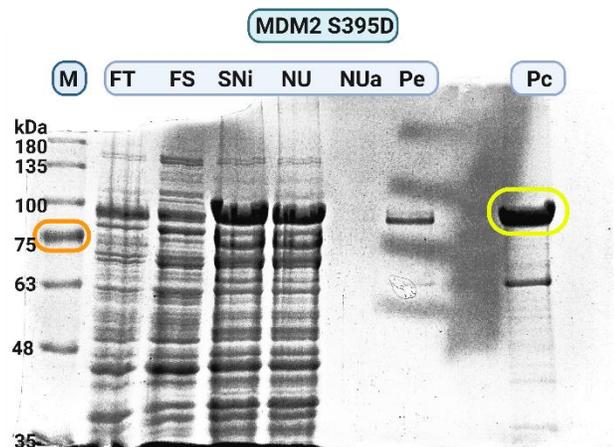


Figura 4 I. SDS-PAGE de la purificación de MDM2 S395D. Migración de muestras del proceso de purificación de la proteína en gel tris-glicine 8 % al ser teñido con *coomassie*. FT: fracción total. FS: fracción soluble. SNI: sobrenadante insoluble. NU: no unida en la columna. NUa: no unida previo a eluir. Pe: proteína eluida. Pc: proteína concentrada. M: marcador blueray. En amarillo se señala la proteína de interés.

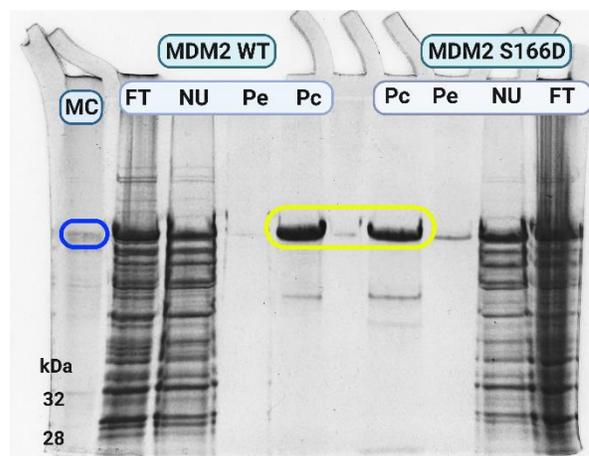


Figura 4 K. SDS-PAGE de la purificación de MDM2 wt y S166D. Migración de muestras del proceso de purificación de las proteínas en gel tris-glicine 8 % al ser teñido con *coomassie*. FT: fracción total. NU: no unida en la columna. Pe: proteína eluida. Pc: proteína concentrada. MC: marcador casero, en azul se identifica la migración esperada de MDM2. En amarillo se señalan las proteínas de interés.

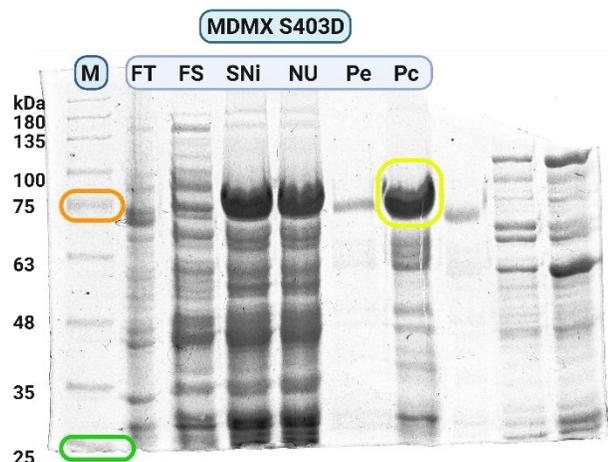


Figura 4 J. SDS-PAGE de la purificación de MDMX S403D. Migración de muestras del proceso de purificación de la proteína en gel tris-glicine 8 % al ser teñido con *coomassie*. FT: fracción total. FS: fracción soluble. SNI: sobrenadante insoluble. NU: no unida en la columna. Pe: proteína eluida. Pc: proteína concentrada. M: marcador blueray. En amarillo se señala la proteína de interés. Los últimos carriles no son de interés.

4.5 Resultados del ensayo ELISA

Las ELISAs proteína-RNA son ensayos complicados y muy sensibles, su resultado depende de que cada uno de los pasos haya sido correctamente ejecutado. Desafortunadamente no se tienen controles para evaluar cada uno hasta la lectura final.

En la **figura 4 L** se muestra un gráfico del comportamiento de los RNAs *p53*, *Rb wt* y *Rb-0* con la proteína MDM2 WT, así como un RNA *random*, como control negativo. En este experimento los valores del eje Y muestran la absorbancia medida por el espectrofotómetro, la cual, cuanto más grande sea, mayor complejo proteína-RNA se detecta. En el eje X, se observan las cantidades molares de la proteína agregada a los 0.5 pico moles de RNA de cada condición. En la **figura 4 M** está el

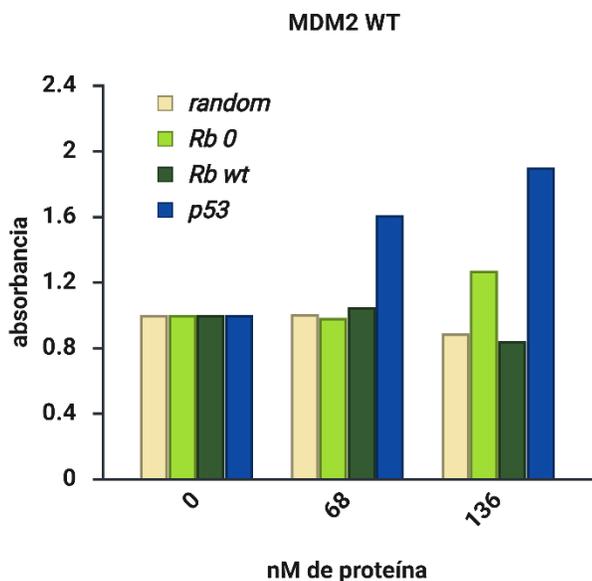


Figura 4 L. ELISA proteína-RNA de MDM2 WT. El eje X muestra las concentraciones de proteína que se agregaron a 0.5 pmoles de las 4 secuencias de RNA. El eje Y la inmunoabsorbancia, esta depende de la proteína que interaccionó con cada RNA. Los valores de la placa se dividieron entre controles de cada condición sin RNA. Los resultados se normalizaron para graficarse en Biorender.

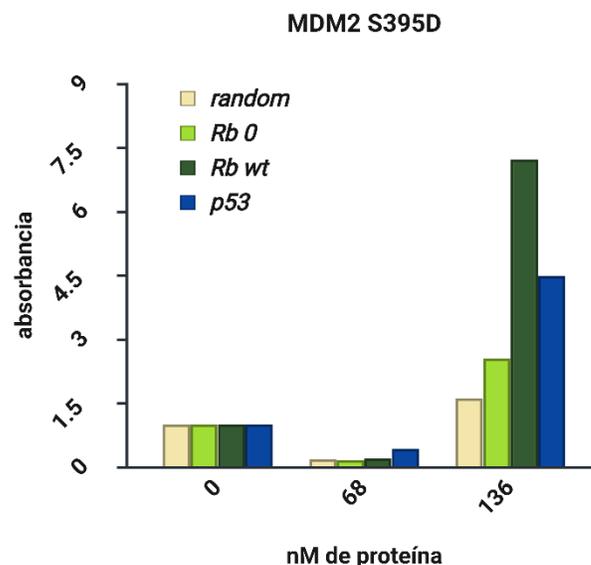


Figura 4 M. ELISA proteína-RNA de MDM2 S395D. El eje X muestra las concentraciones de proteína que se agregaron a 0.5 pmoles de las 4 secuencias de RNA. El eje Y la inmunoabsorbancia, esta depende de la proteína que interaccionó con cada RNA. Los valores de la placa se dividieron entre controles de cada condición sin RNA. Los resultados se normalizaron para graficarse en Biorender.

experimento con la proteína fosfomimética MDM2 S395D, que simula el comportamiento de daño genotóxico de MDM2.

En conjunto ambas gráficas demuestran que la interacción con el RNA de *p53*, depende de que la proteína tenga una mimetización de la fosforilación en la serina 395, como ha sido reportado en la literatura. De esta misma forma, se ve una interacción aún mayor con *Rb wt*, cuya longitud de 507 nt muestra ser suficiente para unir la proteína. *Rb-0* carece de interacción con MDM2 S395D, como en trabajos anteriores también se había reportado, lo que corrobora su uso como control negativo de la interacción, de

hecho, sus valores son similares al random, donde con ambas proteínas no muestra interaccionar.

3.7 Avances del EMSA

Las mejoras logradas con las EMSAs se ven en las siguientes figuras, donde los detalles específicos están en la descripción de cada una: primero, la **figura 4 N** muestra la presencia de 200 μg de proteína casi indistinguibles en un gel de 40 ml.

En la **figura 4 Ñ** se muestra un gel de 10 ml, donde se consideró la migración de cantidades menores de proteína, al ser un gel delgado se observan 50 μg de proteína muy fácilmente. En los últimos carriles del

gel está el comportamiento de proteína en agua, en *buffer* de RNA y con EDTA, en la segunda condición hubo un cambio donde la proteína bajó más.

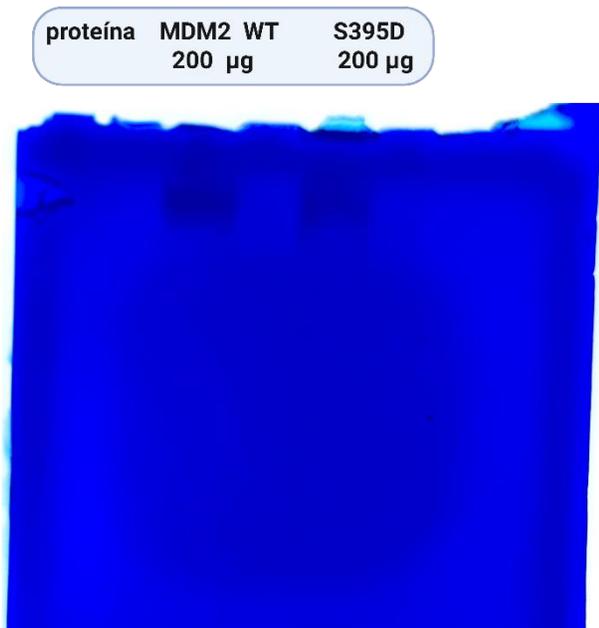


Figura 4 N. Electroforesis de MDM2 en agarosa TAE 1 X. Gel horizontal de 40 ml. La electroforesis se hizo por 20 minutos, 80 V. Se tiñó 16 h con *coomassie* y se lavó con solución fijadora por más de 24 h.

En la **figura 4 O** se muestra la tinción de *coomassie* alternativa a la técnica inicial, esta nueva forma de teñir el gel resultó en la mejora de tiempos y la visualización de proteína en cantidades mínimas en geles incluso de 1 cm de grosor. El estado desgastado del gel es irrelevante, ya que originalmente se utilizó para un experimento donde sobraron espacios.

En la **figura 4 P** está el comportamiento de la EMSA de MDM2-Rb. La migración de la proteína se observa en la

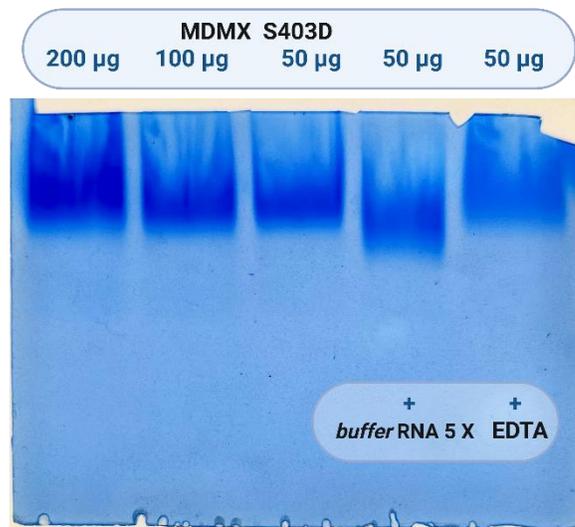


Figura 4 Ñ. Gradiente de MDMX en agarosa TAE 1 X. Gel de 10 ml. Electroforesis vertical de 30 min en agarosa TAE 1 X, 80 V. Se fijó 20 min, se tiñó 1 hora en una dilución de *coomassie* 1:5. Se dejó lavado 16 h en 1:10 de *coomassie*. En los dos últimos carriles se agregaron 10 µl EDTA 0.5 M y *buffer* de RNA 5 X.

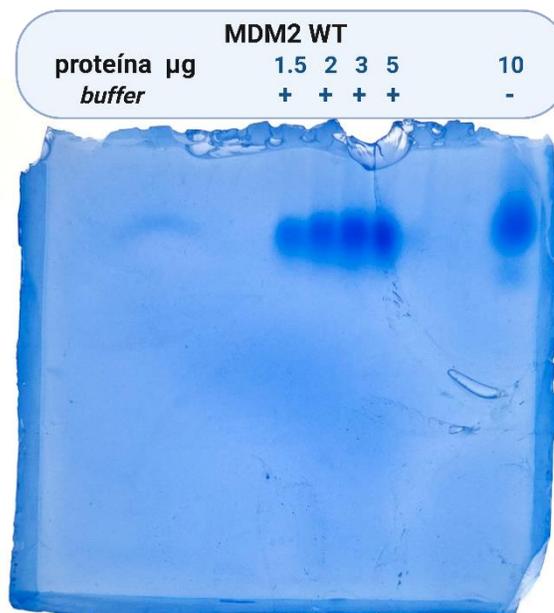


Figura 4 O. Cantidades pequeñas de proteína con nueva tinción. Gel horizontal de 40 ml. Electroforesis de 40 min en agarosa TAE 1.2 X, 100 V. Se fijó por 40 min, se tiñó 16 horas en una dilución de *coomassie* 1:10. Este gel no se lavó. A excepción del último, se les agregó *buffer* de RNA 5 X a todos.

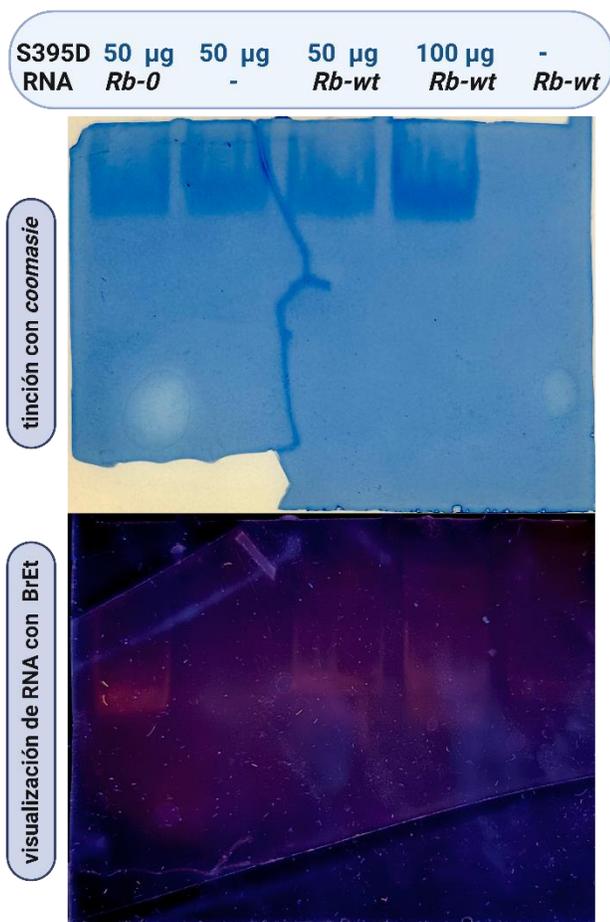


Figura 4 P. EMSA de la interacción de MDM2 con *Rb*. Gel vertical de agarosa 1.2x en TBE 1 X. Electroforesis de 35 min. Las muestras se pusieron a interactuar durante 30 min a 37 °C en *binding buffer*.

tinción superior. El comportamiento de *Rb wt* y *Rb-0* se visualiza al intercalarles BrEt y exponerlos a luz UV.

En la **figura 4 Q** se tiene una edición de color y contraste, para localizar las diferencias de manera más clara.

Finalmente, en la **figura 4 R** está un traslape para percibir la localización de la proteína (turquesa) y el RNA (en rojo). En el carril 5 se observa la migración individual de *Rb-wt* (507 nt), que muestra una posición

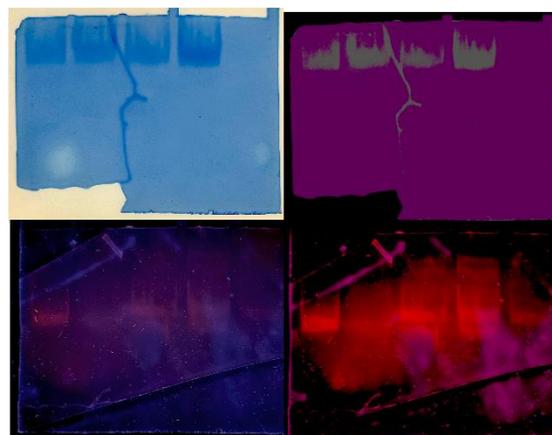


Figura 4 Q. Mejora en el contraste del EMSA. La tinción con BrEt fue muy sutil, por lo que previo a un *merge* de las visualizaciones se propuso contrastar los colores para facilitar distinguir el comportamiento.

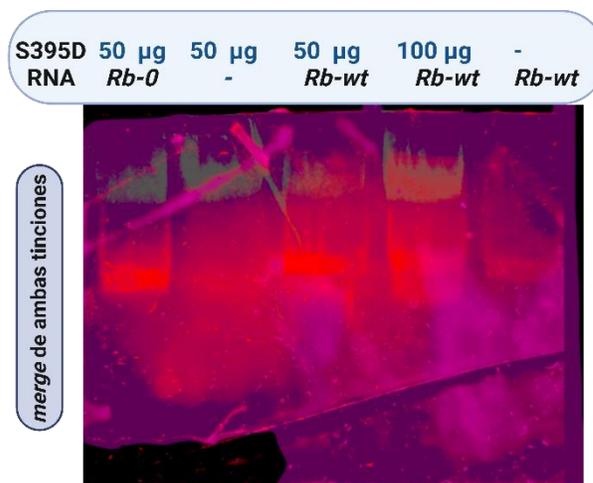


Figura 4 R. Merge del EMSA de MDM2 S395D y *Rb wt*. Cambio de migración de *Rb wt* al estar con la proteína. *Rb-0* no interacciona en dicha condición. Los controles de proteína y RNA determina la migración individual de cada uno.

más alta que la banda de *Rb-0* (carril 1) que mide 248 nt.

El carril 2 es el control donde solo hay proteína y por lo tanto no se muestra la presencia de ninguna banda roja. En el carril 3 se añadieron MDM2 y *Rb-wt*. En el 4

también, pero con el doble de MDM2. En ambas condiciones se percibe una diferencia en la visualización del RNA, mostrando que coincide en la migración de la proteína, más notable en el carril 4. El carril 1 y 3, difieren en que *Rb-0* no contiene 265 nt de la región no codificante 5', que sí tiene *Rb wt*. Solo por esta diferencia la interacción *Rb-MDM2 in vitro* logra ser exitosa.

El resultado de este EMSA y la ELISA de la **figura 4 M** coinciden con el comportamiento de estas interacciones. Estos resultados son los primeros acercamientos *in vitro* sobre el estudio de regiones cortas de *Rb*, con el fin de conocer su región mínima de interacción que tiene con MDM2, específicamente en su versión fosforilada en la serina 395.

V. CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

El desarrollo de este trabajo involucró bastantes metodologías que podrían mejorarse e implementarse con otros fines:

Funcionalización de superficies: la silanización realizada en este trabajo optimizó el uso de volúmenes varias veces más pequeños para el *test* de Ellman, pero con un menor rendimiento. Respecto a los silanos utilizados, también se abren diferentes discusiones como la preferencia y comportamiento de la deposición química de estos, que no ha sido completamente abordada en la literatura, a pesar de ser dos silanos con amplias aplicaciones. Las herramientas exploradas en las tesis de maestría (Contreras-Sánchez, 2021) y licenciatura (Romero-Rangel, 2022), son ideales para investigar más a fondo dicha conducta.

Inmovilización en sílice de RNAs: aunque este trabajo no implementó los oligoribonucleótidos con maleimida, es posible que se puedan diseñar para hibridar cada RNA específicamente, aunque se sacrifique la practicidad buscada inicialmente. Así mismo estudiar las interacciones entre biomoléculas con el uso de videomicroscopía debe seguir explorándose, ya que en el estudio de la formación de complejos ribonucleoproteicos podría tener una solución alternativa aquí. En los **Anexos 7.1** se proponen 3 estrategias con dicho fin.

ELISA proteína-RNA: esta técnica es una de las más recurridas al estudiar interacciones en diferentes concentraciones o la competencia entre biomoléculas. Es muy sensible, pero económicamente costosa, por lo que abordar problemáticas con exploraciones más flexibles es necesario.

EMSA: esta técnica al no utilizar radiación es difícil de estandarizar, específicamente en este trabajo costó la visualización del RNA con BrEt. A pesar de ello es una técnica para estudiar interacciones de una forma visualmente sencilla, así como más barata que las ELISAs. El estudio de los dominios de MDM2 para esta interacción puede estudiarse con el RNA de *Rb wt* (507 nt), una longitud más adecuada que el RNA completo de 3,049 nt (5' + codificantes), pero no tan corta que dificulte su uso.

CONCLUSIONES

Se optimizó la evaluación de la deposición química de silanos con el *test* de Ellman.

Se mejoró la técnica EMSA para visualizar las interacciones de proteína-RNA, específicamente la tinción de las proteínas con azul de *coomassie*.

Se estudió con 2 técnicas *in vitro* (ELISA y EMSA) que la fosfoproteína MDM2 S395D y los 507 nt iniciales de *Rb* interactúan específicamente. Se corroboró con ambas la importancia de la región 5'UTR de *Rb* debido al uso del control negativo de dicha interacción: *Rb-0* (248 nt).

REFERENCIAS

- Ahuja, H. G., Testa, M. P., & Cline, M. J. (1990). Variation in the protein coding region of the human p53 gene. *Oncogene*, *5*(9), 1409–1410.
- Al-Saadi, S., & Singh Raman, R. K. (2022). Silane Coatings for Corrosion and Microbiologically Influenced Corrosion Resistance of Mild Steel: A Review. *Materials*, *15*(21). <https://doi.org/10.3390/ma15217809>
- Bista, M., Petrovich, M., & Fersht, A. R. (2013). MDMX contains an autoinhibitory sequence element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(44), 17814–17819. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317398110>
- Błaszczuk, L., & Ciesiolka, J. (2011). Secondary structure and the role in translation initiation of the 5'-terminal region of p53 mRNA. *Biochemistry*, *50*(33), 7080–7092. <https://doi.org/10.1021/bi200659b>
- Burgess, A., Chia, K. M., Haupt, S., Thomas, D., Haupt, Y., & Lim, E. (2016). Clinical overview of MDM2/X-targeted therapies. *Frontiers in Oncology*, *6*(JAN), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00007>
- Cahilly-Snyder, L., Yang-Feng, T., Francke, U., & George, D. L. (1987). Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, *13*(3), 235–244. <https://doi.org/10.1007/BF01535205>
- Candeias, M. M., Malbert-Colas, L., Powell, D. J., Daskalogianni, C., Maslon, M. M., Naski, N., Bourougaa, K., Calvo, F., & Fähræus, R. (2008). p53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. *Nature Cell Biology*, *10*(9), 1098–1105. <https://doi.org/10.1038/ncb1770>
- Chartier, P. (2014). La superficie del vidrio: bases para la investigación industrial. *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, *53*(2), 475–484.
- Chapter 2 Thiol-Reactive Probes. (2010). En *Molecular Probes™ Handbook A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies 11th Edition* (2010) (11a ed.). Life Technologies.
- Chen, D., Zhang, Z., Li, M., Wang, W., Li, Y., Rayburn, E. R., Hill, D. L., Wang, H., & Zhang, R. (2007). Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: Binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene*, *26*(35), 5029–5037. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210327>
- Chen, S., Wang, L., Malbert-Colas, L., Karakostis, K., Olivares-Illana, V., Vadivel Gnanasundram, S., & Fähræus, R. (2025). The p53 mRNA exhibits riboswitch-like features under DNA damage conditions. *Science*, *28*(10). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2025.113555>
- Chibaya, L., Karim, B., Zhang, H., & Jones, S. N. (2021). Mdm2 phosphorylation by Akt regulates the p53 response to oxidative stress to promote cell proliferation and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(4), 1–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003193118>
- Chinnam, M., & Goodrich, D. W. (2011). RB1, Development, and Cancer. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 94, Issue C). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380916-2.00005-X>
- Contreras Sánchez (2021). *Prueba de Concepto de Fenómenos de Superficie para Detección de Ácidos Nucleicos* [Tesis de maestría inédita]. Instituto de Física, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Dai, M.-S., Zeng, S. X., Jin, Y., Sun, X.-X., David, L., & Lu, H. (2004). Ribosomal Protein L23 Activates p53 by Inhibiting MDM2 Function in Response to Ribosomal Perturbation but Not to Translation Inhibition. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(17), 7654–7668. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.17.7654-7668.2004>
- De Investigación Científica y Tecnológica, I. P. (s. f.). *Servicios de LANBAMA del IPICYT, San Luis Potosí, México*. https://cee.ipicyt.edu.mx/Lanbama/lanbama_servicios.php
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, *82*(1), 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)

- Fåhreaus, R., & Olivares-Illana, V. (2014). MDM2's social network. *Oncogene*, 33(35), 4365–4376. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.410>
- Fakharzadeh, S. S., Trusko, S. P., & George, D. L. (1991). Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *The EMBO Journal*, 10(6), 1565–1569. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07676.x>
- Finlay, C. A. (1993). The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth. *Molecular and Cellular Biology*, 13(1), 301–306. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.1.301>
- Gajjar, M., Candeias, M. M., Malbert-Colas, L., Mazars, A., Fujita, J., Olivares-Illana, V., & Fåhreaus, R. (2012). The p53 mRNA-Mdm2 interaction controls mdm2 nuclear trafficking and is required for p53 activation following dna damage. *Cancer Cell*, 21(1), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.016>
- GmbH, J. B. (s. f.). *Plasmid Mini-Prep Kit - Column Kit, Plasmid DNA - Column Kit - Jena Bioscience*. Jena Bioscience GmbH. <https://www.jenabioscience.com/molecular-biology/rna-dna-preparation-cleanup/plasmid-dna-column-kit/pp-204-plasmid-mini-prep-kit-column-kit>
- Gnanasundram, S. V., Malbert-Colas, L., Chen, S., Fusée, L., Daskalogianni, C., Muller, P., Salomao, N., & Fåhreaus, R. (2020). MDM2's dual mRNA binding domains co-ordinate its oncogenic and tumour suppressor activities. *Nucleic Acids Research*, 48(12), 6775–6787. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa431>
- Goodrich, D. W., Wang, N. P., Qian, Y. W., Lee, E. Y. H. P., & Lee, W. H. (1991). The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell*, 67(2), 293–302. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90181-W](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90181-W)
- Gu, L., Zhang, H., He, J., Li, J., Huang, M., & Zhou, M. (2012). MDM2 regulates MYCN mRNA stabilization and translation in human neuroblastoma cells. *Oncogene*, 31(11), 1342–1353. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.343>
- Gu, Lubing, Zhu, N., Zhang, H., Durden, D. L., Feng, Y., & Zhou, M. (2009). Regulation of XIAP Translation and Induction by MDM2 following Irradiation. *Cancer Cell*, 15(5), 363–375. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.002>
- Hara, M. R., Kovacs, J. J., Whalen, E. J., Rajagopal, S., Strachan, R. T., Grant, W., Towers, A. J., Williams, B., Lam, C. M., Xiao, K., Shenoy, S. K., Gregory, S. G., Ahn, S., Duckett, D. R., & Lefkowitz, R. J. (2011). A stress response pathway regulates DNA damage through β 2- adrenoreceptors and β -arrestin-1. *Nature*, 477(7364), 349–353. <https://doi.org/10.1038/nature10368>
- Hayat, S. M. G., Farahani, N., Golichenari, B., & Sahebkar, A. (2018). Recombinant Protein Expression in Escherichia coli (E.coli): What We Need to Know. *Current Pharmaceutical Design*, 24(6), 718–725. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180131121940>
- Hayes, V. M., Bleeker, W., Verlind, E., Timmer, T., Karrenbeld, A., Plukker, J. T., Marx, M. P., Hofstra, R. M., & Buys, C. H. (1999). Comprehensive TP53-denaturing gradient gel electrophoresis mutation detection assay also applicable to archival paraffin-embedded tissue. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*, 8(1), 2–10. <https://doi.org/10.1097/00019606-199903000-00002>
- Hernández-Monge, J., Rousset-Roman, A. B., Medina-Medina, I., & Olivares-Illana, V. (2016). Dual function of MDM2 and MDMX toward the tumor suppressors p53 and RB. *Genes and Cancer*, 7(9–10), 278–287. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.120>
- Hernandez-Monge, J., Martínez-Sánchez, M., Rousset-Roman, A., Medina-Medina, I., & Olivares-Illana, V. (2021). MDM2 regulates RB levels during genotoxic stress. *EMBO Reports*, 22(1), 1–13. <https://doi.org/10.15252/embr.202050615>
- Hinds, P. W., Finlay, C. A., Quartin, R. S., Baker, S. J., Fearon, E. R., Vogelstein, B., & Levine, A. J. (1990). Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 1(12), 571–580.

- <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/protooncogen>
- Huang, K. Y., Su, M. G., Kao, H. J., Hsieh, Y. C., Jhong, J. H., Cheng, K. H., Huang, H. Da, & Lee, T. Y. (2016). dbPTM 2016: 10-year anniversary of a resource for post-translational modification of proteins. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D435–D446. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1240>
- Idris, A., Man, Z., Maulud, A. S., Bustam, M. A., Mannan, H. A., & Ahmed, I. (2020). Investigation on particle properties and extent of functionalization of silica nanoparticles. *Applied Surface Science*, *506*, 144978. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144978>
- Illana, V., & Farhaeus, R. (2012). Protein-RNA ELISA Assay. *Bio-Protocol*, *2*(17), 19–21. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.257>
- Ito, S., Nishi, M., Kanamori, K., Nakanishi, K., Kurahashi, T., Matsubara, S., Shimotsuma, Y., Miura, K., & Hirao, K. (2011). (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane-derived porous gel monolith via thioacetal reaction-assisted sol-gel route. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, *18*(SYMPOSIUM 2A). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/18/3/032003>
- James, A. E. C. (1995). Promoter-Dependent Photocross-Linking of Tna Acidic.Pdf. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, *270*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.270.23.13674>
- Jim Xiao, Z. X. (1995). 375694a0.Pdf. *LETTERS TO NATURE*, *375*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/375694a0>
- Jones, S. N., Roe, A. E., Donehower, L. A., & Bradley, A. (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. In *Nature* (Vol. 378, Issue 6553, pp. 206–208). <https://doi.org/10.1038/378206a0>
- Jung, C. H., Kim, J., Park, J. K., Hwang, S. G., Moon, S. K., Kim, W. J., & Um, H. D. (2013). Mdm2 increases cellular invasiveness by binding to and stabilizing the Slug mRNA. *Cancer Letters*, *335*(2), 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.035>
- Karakostis, K., Malbert-Colas, L., Thermou, A., Vojtesek, B., & Fähræus, R. (2024). The DNA damage sensor ATM kinase interacts with the p53 mRNA and guides the DNA damage response pathway. *Molecular Cancer*, *23*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12943-024-01933-z>
- Karim Romero Rangel (2022). *Desarrollo de un dispositivo para la funcionalización de micropartículas con organosilanos en fase vapor* [Tesis de licenciatura inédita]. Instituto de Física, Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Kawai, H., Lopez-Pajares, V., Kim, M. M., Wiederschain, D., & Yuan, Z. M. (2007). RING domain-mediated interaction is a requirement for MDM2's E3 ligase activity. *Cancer Research*, *67*(13), 6026–6030. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1313>
- Khan, D., Sharathchandra, A., Ponnuswamy, A., Grover, R., & Das, S. (2013). Effect of a natural mutation in the 5' untranslated region on the translational control of p53 mRNA. *Oncogene*, *32*(35), 4148–4159. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.422>
- Kram, K. E., & Finkel, S. E. (2015). Rich medium composition affects Escherichia coli survival, glycation, and mutation frequency during long-term batch culture. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(13), 4442–4450. <https://doi.org/10.1128/AEM.00722-15>
- Lee, J. M., Hammarén, H. M., Savitski, M. M., & Baek, S. H. (2023). Control of protein stability by post-translational modifications. *Nature Communications*, *14*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-35795-8>
- Lewis, M. (2005). The lac repressor. *Comptes Rendus - Biologies*, *328*(6 SPEC. ISS.), 521–548. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2005.04.004>
- Lin, W., Yan, Y., Huang, Q., & Zheng, D. (2024). MDMX in Cancer: A Partner of p53 and a p53-Independent Effector. *Biologics: Targets and Therapy*, *18*(January), 61–78. <https://doi.org/10.2147/BTT.S436629>
- Lohrum, M. A. E., Ludwig, R. L., Kubbutat, M. H. G., Hanlon, M., & Vousden, K. H. (2003). Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell*, *3*(6), 577–587. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00134-](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00134-)

X

- Lu, H. T. (2013). Synthesis and characterization of amino-functionalized silica nanoparticles. *Colloid Journal*, 75(3), 311–318. <https://doi.org/10.1134/S1061933X13030125>
- Liu, T., Patel, S., & Pyle, A. M. (2023). Making RNA: Using T7 RNA polymerase to produce high yields of RNA from DNA templates. *Methods in enzymology*, 691, 185–207. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2023.06.002>
- Luís, I. M., Parada, M., Vicente, J. B., & Abreu, I. A. (2025). pET28g: A Golden Gate-compatible pET vector for protein expression in *Escherichia coli*, validated by production of functional human ACE2. *Plos One*, 20(7 July), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0327341>
- Malbert-Colas, L., Ponnuswamy, A., Olivares-Illana, V., Tournillon, A. S., Naski, N., & Fähræus, R. (2014). HDMX Folds the Nascent p53 mRNA following Activation by the ATM Kinase. *Molecular Cell*, 54(3), 500–511. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.035>
- Marechal, V., Elenbaas, B., Piette, J., Nicolas, J. C., & Levine, A. J. (1994). The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 14(11), 7414–7420. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.11.7414>
- Martínez-Morales, M. G. (2025). *Estandarización de la técnica de EMSA para el estudio de la interacción entre el supresor tumoral p53 y el promotor de ARF* [Tesis de licenciatura inédita]. Instituto de Física, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Martínez-Partida, A. M. (2023). *Estudio bioquímico de la interacción entre la oncoproteína MDM2 y el mRNA de Rb* [Tesis de licenciatura inédita]. Instituto de Física, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Martínez-Partida, A. M. (2024). *Análisis de la unión entre la proteína MDM2 y el mRNA de Rb* [Tesis de maestría inédita]. Instituto de Física, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Martínez-Sánchez, M., Hernandez-Monge, J., Rangel, M., & Olivares-Illana, V. (2022). Retinoblastoma: from discovery to clinical management. *FEBS Journal*, 289(15), 4371–4382. <https://doi.org/10.1111/febs.16035>
- Ma, W., Ma, B., Ma, J., & Zhu, R. (2023). RB1 5UTR contains an IRES related to cell cycle control and cancer progression. *Gene*, 887, 147724. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147724>
- Maya, R., Balass, M., Kim, S. T., Shkedy, D., Martínez Leal, J. F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., Kastan, M. B., Katzir, E., & Oren, M. (2001). ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: Role in p53 activation by DNA damage. *Genes and Development*, 15(9), 1067–1077. <https://doi.org/10.1101/gad.886901>
- Medina-Medina, I., García-Beltrán, P., de la Mora-de la Mora, I., Oria-Hernández, J., Millot, G., Fähræus, R., Reyes-Vivas, H., Sampedro, J. G., & Olivares-Illana, V. (2016). Allosteric Interactions by p53 mRNA Govern HDM2 E3 Ubiquitin Ligase Specificity under Different Conditions. *Molecular and Cellular Biology*, 36(16), 2195–2205. <https://doi.org/10.1128/mcb.00113-16>
- Medina-Medina, I., Martínez-Sánchez, M., Hernández-Monge, J., Fähræus, R., Muller, P., & Olivares-Illana, V. (2018). p53 promotes its own polyubiquitination by enhancing the HDM2 and HDMX interaction. *Protein Science*, 27(5), 976–986. <https://doi.org/10.1002/pro.3405>
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., & Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69(7), 1237–1245. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90644-R](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90644-R)
- Ofir-Rosenfeld, Y., Boggs, K., Michael, D., Kastan, M. B., & Oren, M. (2008). Mdm2 Regulates p53 mRNA Translation through Inhibitory Interactions with Ribosomal Protein L26. *Molecular Cell*, 32(2), 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.08.031>
- Okamoto, K., Kashima, K., Pereg, Y., Ishida, M., Yamazaki, S., Nota, A., Teunisse, A., Migliorini, D., Kitabayashi, I., Marine, J.-C., Prives, C., Shiloh, Y., Jochemsen, A. G., & Taya, Y. (2005). DNA Damage-Induced Phosphorylation of MdmX at Serine 367 Activates p53 by Targeting MdmX for Mdm2-Dependent Degradation. *Molecular and*

Cellular Biology, 25(21), 9608–9620.
<https://doi.org/10.1128/mcb.25.21.9608-9620.2005>

Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L., & Vogelstein, B. (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*, 358(6381), 80–83.
<https://doi.org/10.1038/358080a0>

Oscier, D. G., Gardiner, A. C., Mould, S. J., Glide, S., Davis, Z. A., Ibbotson, R. E., Corcoran, M. M., Chapman, R. M., Thomas, P. W., Adrian Copplestone, J., Orchard, J. A., & Hamblin, T. J. (2002). Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: Clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood*, 100(4), 1177–1184.
https://doi.org/10.1182/blood.v100.4.1177.h81602001177_1177_1184

Peña-Balderas, A. M., Martínez-Sánchez, M., Olmos-Sánchez, I., Calderón-González, K., Moctezuma-Dávila, M., Rangel-Charqueño, M., Hernández-Monge, J., & Olivares-Illana, V. (2025). Analysis of pathogenic variants in retinoblastoma reveals a potential gain of function mutation. *Genes and Cancer*, 16, 1–15.
<https://doi.org/10.18632/genesandcancer.239>

pET-28a(+) vector map and sequence. (s. f.).
<https://www.novoprolabs.com/vector/V11005>

Pick, C., Argento, C., Drazer, G., & Frechette, J. (2015). Micropatterned Charge Heterogeneities via Vapor Deposition of Aminosilanes. *Langmuir*, 31(39), 10725–10733.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b02771>

Pierce™ RNA 3' End Biotinylation Kit 20 Reactions | Buy online | Thermo Scientific™. (s. f.).
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/20160>

Product Information Sheet - D8130. (2024). Sigma Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/414/707/d8130pis.pdf>

Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science*, 28(8), 1412–1422.

<https://doi.org/10.1002/pro.3668>

Rousset-Roman, A., Reboloso-Gómez, Y., & Olivares-Illana, V. (2019). Expression and purification of the recombinant full-length retinoblastoma protein and characterisation of its interaction with the oncoprotein HDM2. *Protein Expression and Purification*, 162, 62–66.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.05.011>

Sdek, P., Ying, H., Chang, D. L. F., Qiu, W., Zheng, H., Touitou, R., Allday, M. J., & Jim Xiao, Z. X. (2005). MDM2 promotes proteasome-dependent ubiquitin-independent degradation of retinoblastoma protein. *Molecular Cell*, 20(5), 699–708.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.017>

Sonenberg, N., & Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes. *Cell*, 136(4), 731–745.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.042.Regulation>

Stracker, T. H., Roig, I., Knobel, P. A., & Marjanović, M. (2013). The ATM signaling network in development and disease. *Frontiers in Genetics*, 4(MAR), 1–19.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00037>

Sun, X. X., DeVine, T., Challagundla, K. B., & Dai, M. S. (2011). Interplay between ribosomal protein S27a and MDM2 protein in p53 activation in response to ribosomal stress. *Journal of Biological Chemistry*, 286(26), 22730–22741.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.223651>

Sun, Y., Klauzinska, M., Lake, R. J., Lee, J. M., Santopietro, S., Raafat, A., Salomon, D., Callahan, R., & Artavanis-Tsakonas, S. (2011). Trp53 regulates Notch 4 signaling through Mdm2. *Journal of Cell Science*, 124(7), 1067–1076.
<https://doi.org/10.1242/jcs.068965>

Swiatkowska, A., Dutkiewicz, M., Janecki, D. M., Ciesiołka, J., Zydowicz-Machtel, P., & Szpotkowska, J. (2019). Translational control in p53 expression: The role of 5'-terminal region of p53 mRNA. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21).
<https://doi.org/10.3390/ijms20215382>

Swiatkowska, A., Zydowicz, P., Sroka, J., & Ciesiołka, J. (2016). The role of the 5' terminal region of p53 mRNA in the p53 gene expression. *Acta Biochimica Polonica*, 63(4), 645–651.

https://doi.org/10.18388/abp.2016_1342

- Szpotkowska, J., Swiatkowska, A., & Ciesiołka, J. (2019). Length and secondary structure of the 5' non-coding regions of mouse p53 mRNA transcripts - mouse as a model organism for p53 gene expression studies. *RNA Biology*, *16*(1), 25–41. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1556084>
- Uchida, C., Miwa, S., Kitagawa, K., Hattori, T., Isobe, T., Otani, S., Oda, T., Sugimura, H., Kamijo, T., Ookawa, K., Yasuda, H., & Kitagawa, M. (2005). Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *EMBO Journal*, *24*(1), 160–169. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600486>
- Uldrijan, S., Pannekoek, W. J., & Vousden, K. H. (2007). An essential function of the extreme C-terminus of MDM2 can be provided by MDMX. *EMBO Journal*, *26*(1), 102–112. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601469>
- User Guide: Ellman's Reagent.* (2024). Thermo Fisher Scientific. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011216_Ellmans_Reag_UG.pdf
- Wang, S. P., Wang, W. L., Chang, Y. L., Wu, C. T., Chao, Y. C., Kao, S. H., Yuan, A., Lin, C. W., Yang, S. C., Chan, W. K., Li, K. C., Hong, T. M., & Yang, P. C. (2009). p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nature Cell Biology*, *11*(6), 694–704. <https://doi.org/10.1038/ncb1875>
- Wang, S., Zhao, Y., Aguilar, A., Bernard, D., & Yang, C. Y. (2017). Targeting the MDM2-p53 protein-protein interaction for new cancer therapy: Progress and challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026245>
- Wilkinson, K. A., Gorelick, R. J., Vasa, S. M., Guex, N., Rein, A., Mathews, D. H., Giddings, M. C., & Weeks, K. M. (2008). High-throughput SHAPE analysis reveals structures in HIV-1 genomic RNA strongly conserved across distinct biological states. *PLoS Biology*, *6*(4), 883–899. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060096>
- Wu, J., Ling, L., Xie, J., Ma, G., & Wang, B. (2014). Surface modification of nanosilica with 3-mercaptopropyl trimethoxysilane: Experimental and theoretical study on the surface interaction. *Chemical Physics Letters*, *591*, 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2013.11.043>
- Xiong, J., Li, J., Yang, Q., Wang, J., Su, T., & Zhou, S. (2017). Gossypol has anti-cancer effects by dual-targeting MDM2 and VEGF in human breast cancer. *Breast Cancer Research*, *19*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0818-5>
- Yang, D. Q., Halaby, M. J., & Zhang, Y. (2006). The identification of an internal ribosomal entry site in the 5'-untranslated region of p53 mRNA provides a novel mechanism for the regulation of its translation following DNA damage. *Oncogene*, *25*(33), 4613–4619. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209483>
- Yang, Y., & Wang, Z. (2019). IRES-mediated cap-independent translation, a path leading to hidden proteome. *Journal of Molecular Cell Biology*, *11*(10), 911–919. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz091>
- Yong, W. Y. D., Zhang, Z., Cristobal, G., & Chin, W. S. (2014). One-pot synthesis of surface functionalized spherical silica particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *460*, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.03.039>
- Zhang, Q., Xiao, H., Chai, S. C., Hoang, Q. Q., & Lu, H. (2011). Hydrophilic residues are crucial for ribosomal protein L11 (RPL11) interaction with zinc finger domain of MDM2 and p53 protein activation. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(44), 38264–38274. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.277012>
- Zhang, Z. X., Nong, F. T., Wang, Y. Z., Yan, C. X., Gu, Y., Song, P., & Sun, X. M. (2022). Strategies for efficient production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: alleviating the host burden and enhancing protein activity. *Microbial Cell Factories*, *21*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01917-y>
- Zhou, X., Hao, Q., Liao, J., Zhang, Q., & Lu, H. (2013). Ribosomal protein S14 unties the MDM2-p53 loop upon ribosomal stress. *Oncogene*, *32*(3), 388–396. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.63>
- Zhou, Y., Nakajima, R., Shirasawa, M., Fikriyanti, M., Zhao, L., Iwanaga, R., Bradford, A. P., Kurayoshi, K., Araki, K., & Ohtani, K. (2023). Expanding Roles of the E2F-RB-p53 Pathway in Tumor

Suppression. *Biology*, 12(12).
<https://doi.org/10.3390/biology12121511>

ANEXOS

7.1 PERSPECTIVAS

Los trabajos que exploran pruebas concepto comúnmente se enfrentan a problemas que redireccionan en diversas ocasiones el objetivo o la metodología.

En el Laboratorio Nacional de la ingeniería de la materia fuera de equilibrio (Lanimfe) queremos utilizar la funcionalización de superficies inorgánicas para proponer inmovilización de biomoléculas con diversas aplicaciones.

Por otra parte, en el Laboratorio de Interacciones biomoleculares y cáncer (Libyc) queremos investigar si MDM2 forma un complejo con los RNAs de *Rb* y *p53*, por lo que en esta tesis, priorizamos la búsqueda de la metodologías alternativas con dicho objetivo, aún siendo conscientes que los silanos y el vidrio de Lanimfe en un futuro pueden ser utilizados para fines similares.

Con el objetivo de encontrar formas de visualizar las uniones proteína-RNA con estrategias de microscopía, decidimos iniciar con la exploración conceptual de partículas y moléculas fluorescentes que se disponían en el Laboratorio de Biofísica molecular y Laboratorio de Materia activa y microfluídica aplicada, así como herramientas e ideas de Libyc y Lanimfe.

1.1.1 1ª estrategia

La propuesta consta de localizar *clusters* de complejos con el uso partículas de

poliestireno con fluorescencia verde, recubiertas de estreptavidina, que unan un RNA biotinilado, que específicamente reconozca una proteína de interés. Si dicha proteína se pone en dos familias de partículas con RNAs distintos, la presencia de *clusters* demostrará que la proteína puede ser capaz de interactuar con ambos simultáneamente. La **figura 7 A** muestra el esquema de como teóricamente puede funcionar la idea.

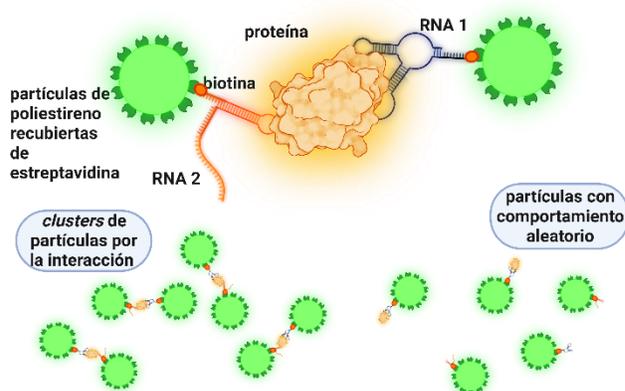


Figura 7 A. Estrategia alternativa 1. Partículas de 2 μm de diámetro (streptavidin fluoresbrite YG Microspheres). La biotinilación se puede obtener con *Pierce RNA 3' End Biotinylation Kit*. La evaluación de esta estrategia puede ser con videomicroscopía y la medición de cluster con la Ecuación de Carothers.

1.1.2 2ª estrategia

Esta consta de utilizar las partículas de poliestireno antes mencionadas para unir solo uno de los RNAs biotinilados (el de *Rb*), para ponerlo a interactuar con la proteína de interés, y que este complejo posteriormente se ponga a interactuar con la longitud mínima de región de interacción de *p53* con MDM2, que consta de 39 ribonucleótidos (+45 al +83), esta

región en la literatura se conoce como BOX-I o *stem loop II*, por su posición en la plataforma de *p53* para interactuar con MDM2 (S. Chen et al., 2025).

Uno de nuestros oligos, es esta región sintetizada por la empresa Oligo T4, con la particularidad de que en su extremo contiene un grupo tiol (SH). Los grupos SH se caracterizan por poder formar enlaces covalentes con moléculas como maleimida, por lo que idealmente queremos usar el fluoróforo Alexa que la tenga (Maleimida C5 Alexa Fluor 488) o una alternativa que posiblemente también podría o no unirlo (Alexa fluor SDP ester 488).

De ser posible esta estrategia podría observar con videomicroscopía de forma algo diferente que con la estrategia 1, ya que se tendría que observar cómo se comporta dicho oligo-Alexa y que formaciones podrías lograr con las partículas de poliestireno, ambos complejos con una emisión fluorescente muy parecida. Y en base a esto, y controles podría haber diversas maneras de interpretarlo. En la **figura 7 B** se muestra el esquema de la propuesta.

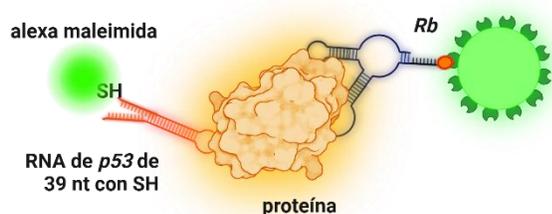


Figura 7 B. Estrategia alternativa 2. El oligoribonucleótido de *p53* es la horquilla que conforma la región mínima que interacciona con MDM2. Debido al amplio número de moléculas que pueden formar enlaces con el grupo tiol, se puede trabajar con otras opciones, así también buscando una distinción en colores.

Recientemente se exploró que el *BOX-I* tiene funciones similares a las de *riboswitch*, donde la presencia de esta región induce la plataforma idónea en *p53* para que interaccione MDM2, de una forma equivalente a la función de MDMX como chaperona. La interacción *p53*-MDM2-*BOX-I* es ahora un comportamiento por abordar muy interesante, y este tipo de sistemas podría ayudar a visualizar las interacciones y complejos que rigen entre sí a *p53* y *BOX-I*, así como con las proteínas MDM2 y MDMX.

1.1.3 3ª estrategia

En este también proponemos usar las partículas con poliestireno recubiertas de estreptavidina uniendo uno de los RNAs biotinilado, como las estrategias previas, pero siendo la distinción que el otro RNA se haya unido a estreptavidina fluorescente azul, como lo es la *streptavidin blue conjugated*. En la **figura 7 C** se muestra dicho

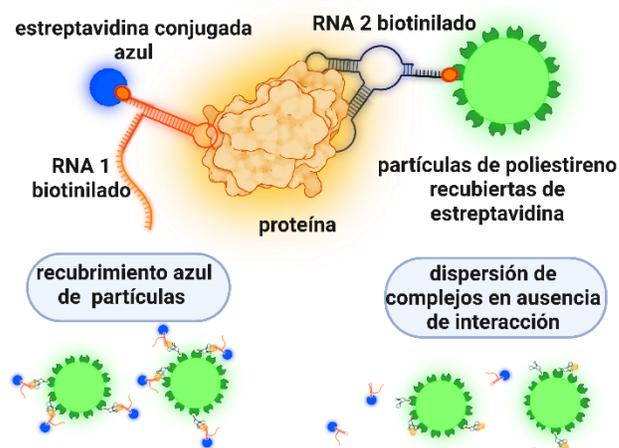


Figura 7 C. Estrategia alternativa 3. La estreptavidina fluorescente puede apoyar en la segunda inmovilización, donde el recubrimiento de las partículas de poliestireno, se daría si está la interacción RNA-proteína-RNA.

esquema, en el cual se logra percibir que la interpretación de la interacción simultánea consistirá en el recubrimiento de partículas verdes de un color azul y no del acercamiento entre partículas verdes.

7.2 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Oligos para la mutagénesis: el diseño de los oligos incluyó contemplar la región a mutar y se eligió una longitud de 42 pb. Esta longitud larga fue debido a que esta es una región con alta cantidad de timinas y adeninas. En la **tabla 7.1 y 7.2** se muestra en color naranja el codón 22, en rojo el nucleótido mutado.

Tabla 7.1 Mutagénesis L22L (CTA a CTG)	
p53 L22L F	GAGTCAGGAAACATTTTCAGACCTGTGGAAAC TACTTCTGAAAACAACG
p53 L22L R	CGTTGTTTTCAGGAAGTAGTTTCCA CAGGTCT GAAAATGTTTCTGACTC

Tabla 7.2 Oligos de mutagénesis L22L a p53	
p53 L22L F	CAGGAAACATTTTCAGACCTGTGG AAACTACTTCTGAAAAC
p53 L22L R	GTTTTCAGGAAGTAGTTTCCA CAGG TCTGAAAATGTTTCTG

Oligo con maleimida: el RNA-maleimida no se mandó pedir, esto iba a realizarse cuando conociéramos algunas condiciones importantes para las interacciones, en este lapso mandamos secuenciar el SMC, y carecemos de 22 nt que habíamos contemplado en el oligonucleótido de la **tabla 7.3**. Por lo que, aunque se pueden diseñar oligos de ese largo, específicos para las secuencias, la propuesta original

buscaba que a partir de un solo un oligonucleótido, se pudieran inmovilizar cualquier secuencia insertada en pcDNA 3.1.

Tabla 7.3 Sistema de inmovilización	
RNA- maleimide	GCUUAAGUUUAAACGCUAGCCAGC UUGGGUCUCCC –MALEIMIDE

Oligos para subclonación de Rb: este par de oligo se diseñó para insertar la secuencia de *Rb wt* en pcDNA 3.1, debido a que antes de tener secuenciados los SMC, creíamos diferían estas en pcDNA 3.1 y pCMV (vector donde está *Rb*), debido a que ahora sabemos en esa región es similar en ambos, y que dicha sección ya no es relevante para los ensayos bioquímicos realizados, ya no fue una necesidad conseguir la clonación del inserto en el vector e incluso no se menciona dicha técnica en la metodología.

Aun así se han hecho los primeros intentos para realizar dicho experimento, para que en un futuro *Rb wt* en pcDNA 3.1, pueda ser usado por miembros del grupo para ensayos en líneas celulares. Los oligos se muestran en la **tabla 7.4** y su T_m experimental fue 46.5 °C. En naranja se muestra la sección que corresponde a las enzimas de restricción *HindIII* y *XhoI*. Las GGG y CCC iniciales se insertaron para fortalecer la unión del oligo.

Tabla 7.4 Inserción de Rb wt en pcDNA 3.1	
Rb-wt F-265	CCCAGCTTCGATCGTCTGACTCTAGAGGATC
Rb-wt R- <i>XhoI</i>	GGGCTCGAGTCATTTCTCTTCTTGTGAGGT ATC

Oligos para reducir la longitud mínima de la región 5'UTR de *Rb*: este diseño nació a partir de contribuir con una estrategia de recortar la longitud del RNA mensajero de *Rb* que interaccione con MDM2, hasta ahora los estudios de este tipo, involucraban disminuir la distancia de sus extremos 5'UTR, pero ahora también como vimos en la ELISA, *Rb-wt* interactúa con MDM2 con un tamaño de 507 nt (del -265 al +235). Este se produjo con *Rb* pCMV y los siguientes oligos de la **tabla 7.5**.

Tabla 7.5 Oligonucleótidos F y R	
Forward T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Reverse 210	CCCAAGTTAACCAAGCTCTCTCTG

Por lo que con solo *Rb* pCMV y los nuevos diseños, de la **tabla 7.6**, podemos explorar el comportamiento experimental *in vitro* de diferentes longitudes, como por ejemplo las tres 3 secuencias si usamos *Rb* -27 Rvs, +46 Rvs y -91 Rvs, con el promotor T7. Que equivaldrían a secuencia de 238 nt (del -265 al -27), de 311 nt (del -265 al +46) y la de 174 nt (del -265 al -91). Así mismo con el *Rb* -161 fwd y la combinación de los anteriores reversos, se pueden conseguir 3 diferentes: uno de 134 nt (del -161 al -27), otro de 207 nt (-161 al +46) y el de 70 nt (-161 al -91).

Tabla 7.6	Oligos para tener longitudes mínimas de <i>Rb</i>
Rb -161 Fwd	TAATACGACTCACTATAGGGGTTGCCGGGCGG GGGAGGGCGCGTCCG
Rb -27 Rvs	GAGCTGTGGAGGAGCGCCGGGAGGACGACG CG
Rb +46 Rvs	CAGCGGCGGCGGTGG
Rb -91 Rvs	CGACTCCCGTTACAAAAATAATTC

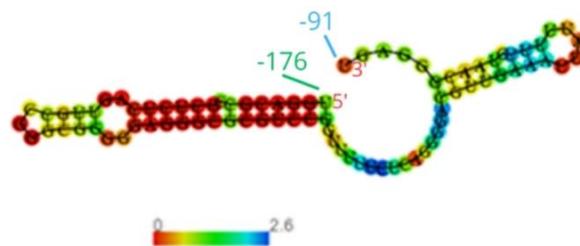


Figura 7 D. Entropía posicional del nt -176 al -91, con RNAfold 2.0. Con este análisis se abordó estudiar de forma más acotada la región del -210 al -106, específicamente no mostraba estructuras en la **figura 1 I**. La horquilla del -96 al -117 parece conservarse como la exploración de la **figura 1 K**. Imagen tomada de Martínez-Partida, 2024.

Para el diseño y elección de dichos oligonucleótidos, se tomó en cuenta el trabajo (Martínez-Partida, 2024), **figura 7 D** y **1 K**. Este trabajo hace más fácil diseñar oligos que contemplen las posibles horquillas responsables de la interacción con MDM2.

Oligos para tener el RNA de E2F1: el mensajero de *E2F1* es un control positivo de interacción de la proteína MDM2 en condiciones de crecimiento celular, y hasta ahora no tenemos dicha secuencia en pcDNA 3.1, por lo que estos oligos nacieron de la idea de extraer RNA de células humanas, y este pueda levantarse con el par de oligos de la **tabla 7.7**. Solo que debido a que aún no se ha reportado en la literatura la región mínima de interacción de este mensajero, los dos pares, fueron planeados para amplificar la secuencia del RNA en dos partes; la primera, equivale del -120 al +595, y el segundo, del +611 al 1305.

Está la posibilidad de utilizar y producir los RNAs de *E2F1* para poner a interaccionar con la proteína MDM2 WT recombinante o su versión fosfomimética S166D, que simula el comportamiento de la fosforilación 166 presente en MDM2 cuando hay un crecimiento celular normal (Gnanasundram et al., 2020).

Tabla 7.7 Oligos para tener secuencias lineares de E2F1	
E2F1 - 120F	TAATACGACTCACTATAGGGACTTTGCAGGCAGCGG CGGCCGGG
E2F1+595 R	CGCCCACTGTGGTGTGGCTGCCAGCCAC
E2F1+611 F	TAATACGACTCACTATAGGGTTGACCCAGGACCTC CGACAGC
E2F1+130 5R	CCAGGGGGGTGAGGTCCCAAGTCACAGTC