



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**ANÁLISIS DE LAS
INTERACCIONES FÍSICAS
DE HMGB1 POR EL
SISTEMA DEL DOBLE
HÍBRIDO**

ANALYSIS OF THE PHYSICAL INTERACTIONS OF
HMGB1 BY THE TWO-HYBRID SYSTEM

ANA FEIJÓO BUJÁN
21 de Julio del 2016

TRABAJO FINAL DE GRADO

DIRIGIDO POR: MÓNICA LAMAS MACEIRAS Y AIDA BARRERO ALONSO

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

ABREVIATURAS

°C: Grados Centígrados

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

RNA: Ácido Ribonucleico

cDNA: Ácido Desoxirribonucleico complementario

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

g: Gramo

Kb: Kilobase

L: litro

M: Molar

mARN: Ácido ribonucleico mensajero

Mb: Megabase

µg: Microgramo

µl: Microlitro

mg: Miligramo

mL: Mililitro

nm: nanometros

OD₆₀₀: Absorbancia medida a 600nm

pb: pares de bases

rpm: Revoluciones por minuto

cfu: Unidad formadora de colonias

Dra. MÓNICA LAMAS MACEIRAS y AIDA BARREIRO ALONSO, Profesoras del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña,

INFORMAN:

Que el presente Trabajo Fin de Grado realizado por Ana Feijóo Buján ha sido realizado bajo nuestra dirección y, considerándolo finalizado, damos el Visto Bueno para su presentación al Tribunal Calificador.

A Coruña, 21 de Julio de 2016

Fdo.: Mónica Lamas Maceiras

Fdo.: Aida Barreiro Alonso

Alumno:

Fdo.: Ana Feijóo Buján

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

1. HMGB1	1
2. Cáncer de próstata	3
2.1. Relación de HMGB1 con el cáncer	4
3. Búsqueda de interacciones	6
3.1. Sistema doble híbrido	6
4. Librería de tejido de próstata tumoral	7
5. Objetivo	9

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas	10
2. Plásmidos	11
3. Medios de cultivo	11
4. Ensayo de doble híbrido	14
4.1. Ensayos fenotípicos de crecimiento en medios selectivos	14
5. Identificación de candidatos	15
5.1. Extracción del plásmido de levaduras	15
5.2. Transformación bacteriana	15
5.3. Extracción de plásmido de bacterias	16
5.4. Cuantificación de DNA	16
5.5. Secuenciación automática	16
5.6. Herramientas informáticas	16

RESULTADOS

1. Cálculos	17
2. Ensayos fenotípicos	18

DISCUSIÓN

CONCLUSIÓN/CONCLUSION

BIBLIOGRAFÍA

ANEXO 1

RESUMEN

El cáncer de próstata es el segundo cáncer más diagnosticado en los hombres a nivel mundial, siendo el primero tanto en Europa como en España. El estudio de las proteínas implicadas en este proceso es imprescindible para mejorar el diagnóstico y el tratamiento. HMGB1 es una proteína que ha sido relacionada con numerosos cánceres donde su función es diferente según el tipo de cáncer. Se ha sugerido que estas diferencias podrían deberse, al menos en parte a la interacción con distintas proteínas, por ello en este trabajo se han identificado, mediante la técnica del doble híbrido, nuevas proteínas que interaccionan con HMGB1 en células prostáticas tumorales, con el fin de poder realizar estudios posteriores para la identificación de posibles nuevos biomarcadores.

Palabras clave: HMGB1, doble híbrido, cáncer de próstata

ABSTRACT

Prostate cancer is the second most commonly diagnosed cancer in the world, being the first in Europe as in Spain. The study of the proteins which are involved in this process is essential to improve diagnosis and treatment. HMGB1 is a protein that has been linked to numerous cancers where its function is different depending on the type of cancer. It has been suggested that these differences could be due, in part, to the interaction with different proteins, so in this work have been identified, using the two-hybrid system, new proteins that interact with HMGB1 in tumor prostate cells, in order to carry out further studies for the identification of possible new biomarkers.

Keywords: HMGB1, two-hybrid system, prostate cancer

INTRODUCCIÓN

1. HMGB1

Es una proteína compuesta por 215 aminoácidos, con dos dominios de unión a DNA homólogos, cajas HMG (Caja A y Caja B) y un dominio C-terminal altamente negativo, que consiste en residuos continuados de glutamato y aspartato (Tang *et al.*, 2010). Las cajas HMG le permiten interactuar con el surco menor del DNA de una manera dependiente de estructura (Thomas y Travers, 2001).

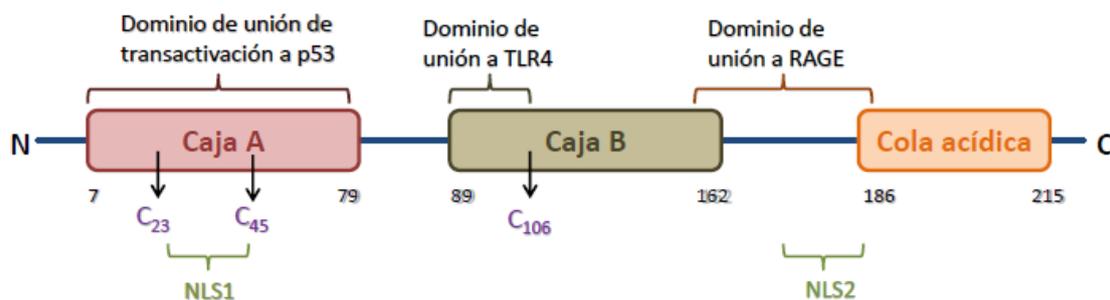


Figura 1: Estructura de HMGB1. C₂₃, C₄₅ y C₁₀₆, se corresponden con residuos de cisteína sensibles a redox. Importantes en la actividad de HMGB1 y puntos clave en ROS. NLS1 y NLS2 son señales de localización nuclear que controlan el transporte de HMGB1. Imagen obtenida de la web www.clincancerres.aacrjournals.org

La secuencia de esta proteína está altamente conservada entre especies. Se ha demostrado que HMGB1 se puede localizar en el núcleo, en el citoplasma o secretarse. Su localización y sus modificaciones post-traduccionales (acetilaciones, fosforilaciones u oxidaciones) están relacionadas con su función.

- ∞ En el núcleo participa en la replicación, recombinación, transcripción y reparación del DNA. Su unión al DNA facilita la unión de otras proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina (Bonaldi *et al.*, 2002) o de factores transcripcionales como p53 o Rag1 (Bianchi y Agresti, 2005), o actúa directamente como represor del proceso de transcripción, uniéndose a la

proteína TBP e inhibiendo el ensamblaje del complejo de reinicio de la transcripción.

- ∞ En el citosol está relacionada con la autofagia y la apoptosis, donde juega un papel importante como molécula de señalización extranuclear, que altera sus niveles durante los procesos de inflamación, diferenciación celular, migración y metástasis (Tang *et al.*, 2010).
- ∞ HMGB1 puede ser secretada por células del sistema inmunitario como monocitos y macrófagos, pero también por células dendríticas, células NK (*Natural Killer*) y células necróticas o alteradas durante el proceso de estrés oxidativo (Ellerman *et al.*, 2007). Una vez que HMGB1 se convierte en una molécula de señal extracelular, se une a numerosos receptores de superficie, principalmente a RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End products*) y a los TLRs (*Toll-Like Receptors*) (Barreiro-Alonso *et al.*, 2016). Estos últimos son importantes por el papel que desempeñan de defensa celular frente a infecciones, además nuevos estudios sugieren que están implicados en la homeostasia de los tejidos por regulación de respuestas inflamatorias y reparación de tejidos lesionados (Rakoff-Nahoum y Medzhitov, 2009).

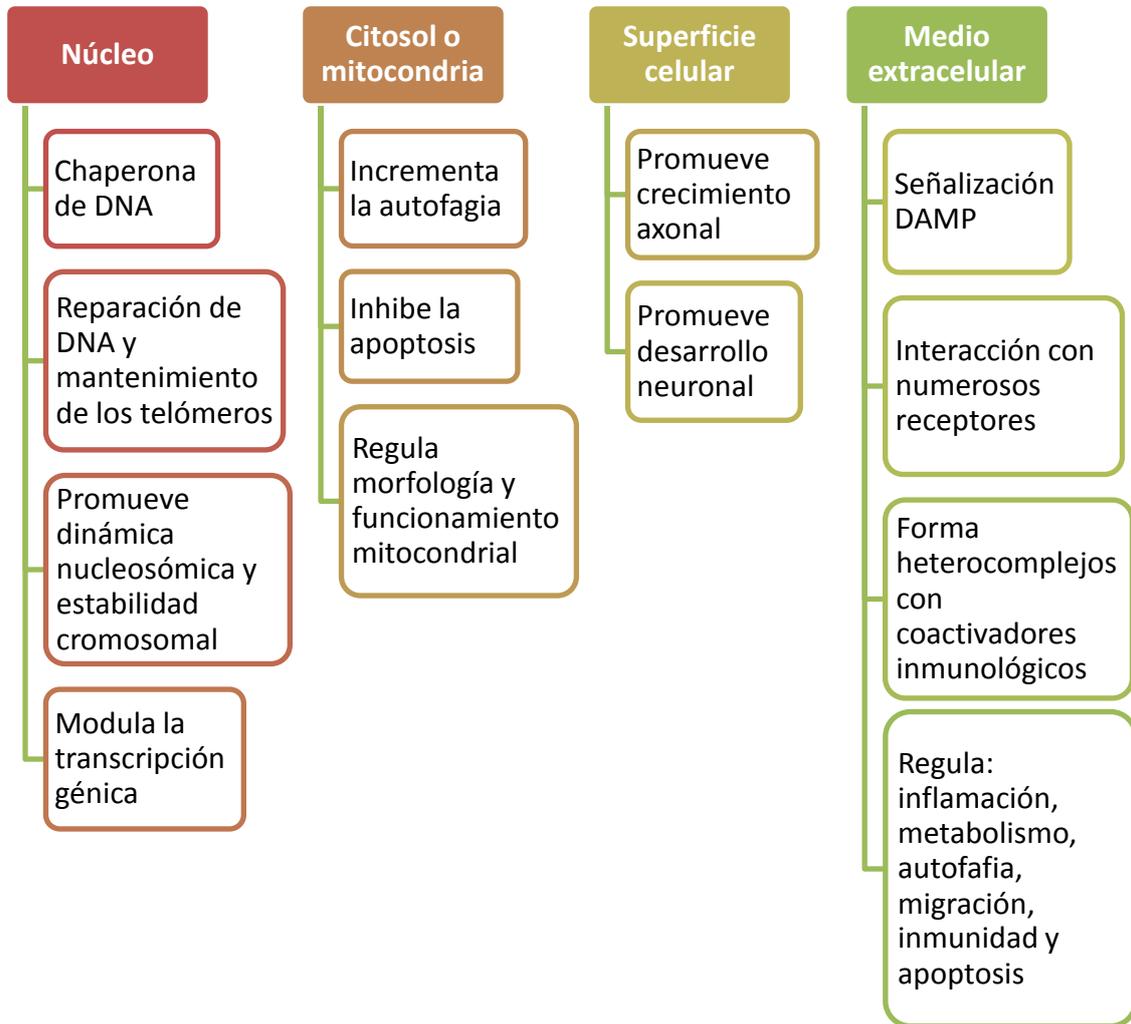


Figura 2: Las funciones HMGB1 dependen del estado redox y del compartimento celular en el que se encuentre HMGB1.

2. CÁNCER DE PRÓSTATA

La anatomía prostática humana muestra la siguiente distribución: epitelio central, epitelio de transición periuretral, zona periférica epitelial y estroma fibromuscular anterior. La mayoría de los cánceres de próstata tienen su origen en la zona periférica, mientras que la hiperplasia benigna prostática parte del epitelio de transición (Timms, 2008).

La próstata contiene un epitelio pseudoestratificado formado por tres tipos celulares: luminales, basales y neuroendocrinas (Scalken y Leenders, 2003). La mayoría de los

diagnósticos de este tipo de tumor se corresponden con adenocarcinomas acinares que se originan en la glándula prostática y expresan el receptor androgénico (Timms, 2008).

Se han determinado diferentes factores que tienen relación con el cáncer de próstata, propuestos por la *Asociación Española Contra el Cáncer, AECC*:

- ∞ Este tipo de cáncer presenta variaciones de incidencia según la zona del mundo. En Europa, son los escandinavos los que remiten una mayor incidencia en la enfermedad, en los países del sur, como España, la tasa de cáncer de próstata es más baja. Además es más frecuente, un 70%, en hombres afroamericanos que en hombres blancos americanos. Los individuos asiáticos o habitantes de las islas del Pacífico, son los que menor índice de mortalidad e incidencia presentan.
- ∞ Un 10% de los cánceres de próstata, se estima que tengan componente hereditario. Diferentes estudios han demostrado que, aquellos hombres que tengan familiares de primer grado afectados, presentan un riesgo dos veces superior de contraer la enfermedad.
- ∞ Afecta a varones con edad avanzada. El 75% de los casos son hombres mayores de 65 años.
- ∞ El inicio y progresión del tumor están relacionados con los andrógenos, fundamentalmente con la testosterona. Los niveles de esta hormona y su receptor influyen en el crecimiento y la propagación del tumor.
- ∞ Hay evidencias de que las dietas con elevado contenido en grasa aumentan el riesgo de este tipo de cáncer.

Aunque se ha sugerido que existe una relación entre la vasectomía, la actividad sexual o la hiperplasia benigna de próstata, no hay evidencias científicas que lo avalen.

2.2. RELACIÓN DE HMGB1 CON EL CÁNCER

Las características del cancer, comprenden, al menos, seis alteraciones fisiológicas celulares (Figura 3) que se adquieren durante el desarrollo de tumores humanos, que

han sido asociadas, de una u otra forma, con niveles de abundancia y localización de HMGB1 (Hanahan y Weinberg, 2000). En la mayoría de los cánceres estudiados se han encontrado niveles altos de esta proteína y con un grado de acetilación mayor que el detectado en células sanas (Alexandrova y Beltchev, 1987).

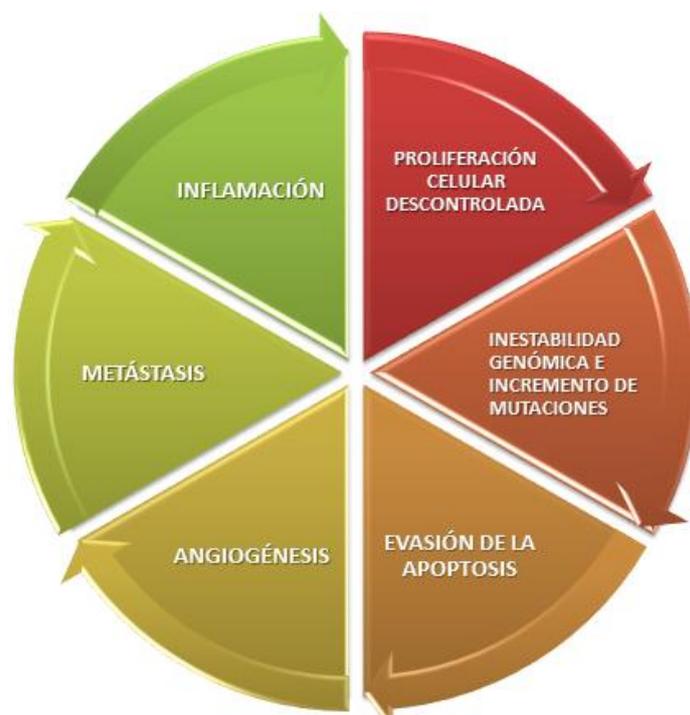


Figura 3: Alteraciones fisiológicas que se adquieren durante el desarrollo del tumor

HMGB1 tiene dos vías de actuación que están en proceso de estudio, por un lado se ha visto que está implicado en progresión de diferentes tipos de cáncer mientras que por otro, juega un papel antitumoral.

En el primer caso, contribuye al desarrollo de la enfermedad, en el que tienen lugar las alteraciones descritas, que implican la progresión tumoral, la angiogénesis y la metástasis. Esto ocurre por ejemplo en los cánceres de próstata, ovario o colon (Ellerman *et al.*, 2007).

Por otro lado en el cáncer de pulmón se ha descrito un funcionamiento diferente, en el que promueve la apoptosis o muerte celular programada, evita la proliferación celular

y la formación de metástasis e incluso favorece la recuperación celular (Ellerman *et al.*, 2007).

En cualquiera de estos dos casos tiene especial importancia el receptor RAGE. El complejo HMGB1-RAGE determina la activación y reclutamiento de leucocitos en células endoteliales y la sobreexpresión de estos componentes ha sido observada en la progresión del cáncer, la invasión de los tejidos y metástasis (cáncer de próstata, ovario o colon), por lo que el bloqueo de la ruta suprime el crecimiento tumoral y el avance del tumor. Sin embargo en el cáncer de pulmón se ha observado unos datos completamente diferentes, se han detectado niveles realmente bajos de HMGB1-RAGE (Bartling *et al.*, 2005) lo que da idea de la complejidad del funcionamiento de HMGB1.

3. BÚSQUEDA DE INTERACCIONES

Como se ha comentado, HMGB1 posee funciones distintas en los diferentes tipos de cáncer y se ha sugerido que estas diferencias podrían deberse, al menos en parte a la interacción con distintas proteínas, por ello es importante identificar aquellas proteínas que interaccionan con HMGB1. Este trabajo se ha centrado en el cáncer de próstata para observar lo que está ocurriendo a nivel celular y poder determinar nuevos biomarcadores y tratamientos que sean menos invasivos y más específicos.

3.1. SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO

El sistema del doble híbrido es una técnica sencilla y efectiva empleada en biología molecular para poder testar interacciones físicas entre proteínas usando levaduras. El principio del doble híbrido se basa en que dos proteínas que se expresan de forma separada, una el cebo (*bait*) y otra la presa (*prey*), se fusionan con el dominio de unión a DNA del factor transcripcional Gal4 y el dominio de activación de Gal4, respectivamente. Cuando hay una interacción física entre las proteínas presa y cebo, la funcionalidad de Gal4 se restituye y provoca la transcripción de varios genes reporteros independientes (James *et al.*, 1996).

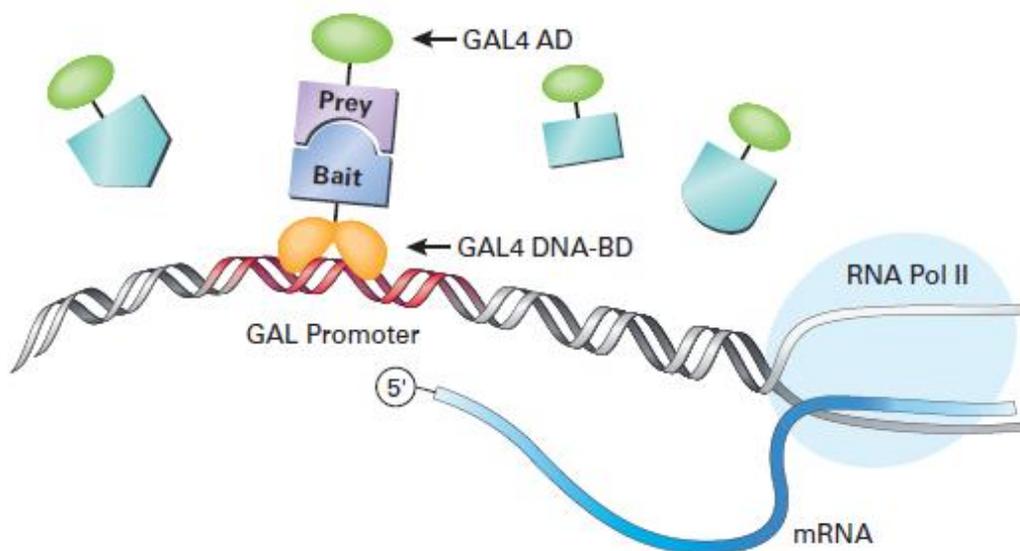


Figura 4: Principio del mecanismo del doble híbrido. *Gold yeast two hybrid*, Clontech.

4. LIBRERÍA DE TEJIDO DE PRÓSTATA TUMORAL

La librería empleada fue construida por el personal del laboratorio de bioquímica y biología celular de la universidad de A Coruña, utilizando *Make your own Mate and Plate™ Library System* de Clontech Laboratories Inc y RNA total de tejido de próstata tumoral obtenido del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía. El RNA total se empleó como molde para sintetizar el cDNA por medio de retrotranscripción, empleando la transcriptasa inversa MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*). Esta transcriptasa inversa añade en el extremo 3' de la secuencia del cDNA que sintetiza, tres desoxicitidinas que permitirán su unión, por complementariedad de bases, con un oligo-modificado *SMART III* que facilitará a los fragmentos generados unirse por recombinación, al vector pGADKT7-Rec. La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Y187 fue transformada con el plásmido pGADT7-Rec linealizado y el cDNA. Gracias al proceso de recombinación, los distintos fragmentos de cDNA se clonaron en el vector, generando distintos plásmidos circulares. La transformación se sembró en al menos 150 placas y todos los clones obtenidos se levantaron y se mezclaron en un único cultivo, de aproximadamente 120 ml. Los cálculos de la eficiencia de la librería realizados mostraron que esta incluía 2,45 millones de clones.

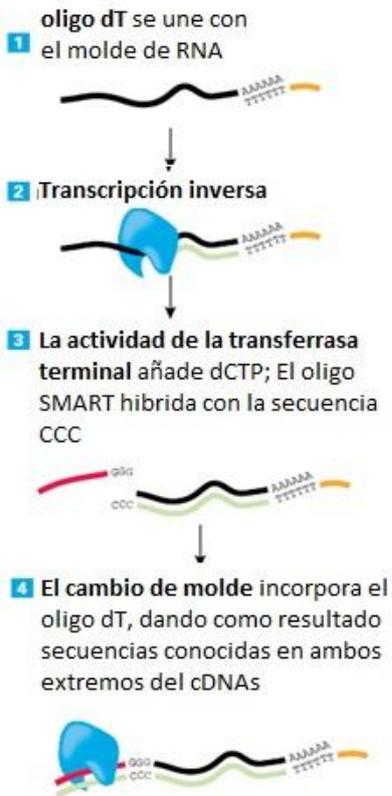


Figura 5: Síntesis de cDNA con el mecanismo SMART™, Make Your Own “Mate & PLate™” Library System User Manual. Clontech

5. OBJETIVO

Identificación de proteínas que interactúan con HMGB1 en células humanas procedentes de tejidos de próstata tumorales (Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía), con el fin de ampliar el conocimiento de los mecanismos de acción de esta proteína en relación con el cáncer de próstata.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS

Para llevar a cabo los experimentos del doble híbrido, se utilizan dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, el organismo modelo de las levaduras en biología molecular:

Tabla 1: Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. *Make Your Own "Mate & Plate"™*. Clontech

Genotipo		Transformación	
Cepa	Genotipo	Reporteros	Marcadores
Y187 Harper et al., 1993	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>met-</i> , <i>URA3::GAL1_{UAS}-Gal1_{TATA}-LacZ</i> <i>MEL1</i>	<i>MEL1</i> , <i>LacZ</i>	<i>trp1</i> , <i>leu2</i>
Y2Hgold	<i>MATα</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS::GAL1_{UAS}-Gal1_{TATA}-His3</i> , <i>GAL2_{UAS}-Gal2_{TATA}-Ade2</i> <i>URA3::MEL1_{UAS}-Mel1_{TATA}</i> <i>AUR1-C MEL1</i>	<i>ADE2</i> , <i>HIS3</i> , <i>MEL1</i> , <i>AbA^r</i>	<i>trp1</i> , <i>leu2</i>

Para la propagación y selección de plásmidos, se emplea la línea de la bacteria *Escherichia coli* **XL1-BLUE**, con genotipo: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [*F'**proAB* *lacI_q* *ZDM15*, *TN10* (*Tet*)] (*Stratagene*).

2. PLÁSMIDOS

Los plásmidos son moléculas circulares de DNA de doble cadena, son extracromosomales y se replican de forma independiente al mismo. Entre las propiedades de los plásmidos que favorecen su uso como vectores de clonación se incluyen: (1) su pequeño tamaño; (2) su naturaleza circular hace que el DNA sea más estable durante la extracción; (3) su origen de replicación independientemente del control directo de la replicación del cromosoma bacteriano; (4) su múltiple número de copias, de manera que se aumenta la eficiencia de extracción del DNA plasmídico; y (5) la presencia de marcadores seleccionables que hacen posible la detección y selección de las bacterias que contienen los plásmidos.

En este trabajo se han empleado los siguientes plásmidos:

- **pGBKT7HMGB1**: La línea de la levadura en la que introducimos este vector es Y2Hgold. En el lugar mcs (*multi cloning size*), está clonado HMGB1. (Aida Barreiro, datos sin publicar).
- **pGADT7-Rec**: La línea de levadura en la que introducimos este vector es Y187 y se empleó para la construcción de la librería de cDNA próstata tumoral.

Los esquemas de los plásmidos se adjuntan en el ANEXO I.

3. MEDIOS DE CULTIVO

Medios para levaduras

YPD: medio rico, empleado para el cultivo de levaduras. Composición:

- ∞ Dextrosa 2%
- ∞ Bacto peptona 2%
- ∞ Extracto de levaduras 1%

YPDA: medio rico, empleado para el cultivo de levaduras. Igual composición que el **YPD**, pero a mayores se le adiciona adenina hemisulfato a una concentración final de 120 µg/mL

2xYPDA: medio YPDA con el doble de concentración de todos sus componentes

0,5xYPDA: medio YPDA con la mitad concentración de todos sus componentes

CM: es un medio sintético para el cultivo de levaduras. Composición:

- ∞ Dextrosa 2%
- ∞ 40 mg/L Histidina, Leucina, Adenina, Tirosina, Uracilo y Triptófano.
- ∞ 5 ml de la mezcla de aminoácidos 200x
 - 12g/L Isoleucina
 - 8g/L Lisina
 - 2g/L Metionina
 - 2g/L Treonina
 - 2g/L Arginina

Se le añade a una concentración del 0,67% la mezcla **YNB**. Composición:

- ∞ 15 gr/L Fosfato de Potasio
- ∞ 7,5 gr/L Sulfato de Magnesio
- ∞ 1,5 gr/L Cloruro sódico
- ∞ 75 gr/L Sulfato amónico
- ∞ 50 ml/L Vitaminas 300x
 - 0,6 mg/L Biotina
 - 120 mg/L Pantotenato cálcico
 - 0,6 mg/L Ácido fólico
 - 600 mg/L Inositol
 - 120 mg/L Niacina
 - 60 mg/L p-Aminobenzoico
 - 120 mg/L Piridoxina
 - 60 mg/L Riboflavina
 - 120 mg/L Tiamina
- ∞ 100 ml/L Sales traza 150x

- 75 mg/L Ácido bórico
- 6 mg/L Sulfato cúprico
- 15 mg/L Ioduro potásico
- 30 mg/L Cloruro férrico
- 30 mg/L Molibdato sódico
- 60 mg/L Sulfato de Zinc

CM/-Leu: igual composición que el CM, pero se elimina el aminoácido Leucina

CM/-Leu-Trp: igual composición que el CM, pero se eliminan los aminoácidos Leucina y Triptófano.

CM/-Trp: igual composición que el CM, pero se elimina el aminoácido Triptófano.

CM/-Leu-Trp-His: igual composición que el CM, pero se eliminan los aminoácidos Leucina, Triptófano e Histidina.

CM/-Ade-Leu-Trp-His: igual composición que el CM, pero se eliminan los aminoácidos Adenina, Leucina, Triptófano e Histidina.

CM/-Ade- Leu-Trp: igual composición que el CM, pero se eliminan los aminoácidos Adenina, Leucina y Triptófano

Medios para bacterias

LB (medio Luria-Bertani)

- ∞ Bacto-triptona 1%
- ∞ Bacto-Yeast-Extract 0,5%
- ∞ NaCl 0,5%
- ∞ Dextrosa 0,1%

LBA idéntico en composición al medio LB, pero suplementado con ampicilina, (6-[D(-)-alpha-Aminophenylacetamido]-penicillanic acid sodium Salt de Roche Diagnostics Corporation) a una concentración final de 70 µg/mL que permite sólo el crecimiento de bacterias con el gen que confiera resistencia a este antibiótico.

Para la preparación de las placas (medios sólidos), se añade 1,5% de agar, al medio líquido correspondiente. Las soluciones se esterilizan, en el autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1 atmósfera de presión.

4. ENSAYO DEL DOBLE HÍBRIDO

El experimento se realiza inoculando una colonia de nuestro cebo [Y2Hgold (pGBKT7+HMGB1)] en el medio líquido CM/-Trp y se deja en agitación entre 16 y 20 horas, a 30°C hasta que la OD₆₀₀ sea de 0,8. En este punto, el cultivo está en fase de crecimiento exponencial. Posteriormente, centrifugamos a 2000 rpm y se descarta el sobrenadante, con el fin de quedarnos con el precipitado de células, que se resuspende en 5ml de CM/-Trp. El siguiente paso del proceso se corresponde con la combinación del cebo (pGBKT+HMGB1) con 1ml de la librería, la presa, del que se retiran 10 µl para realizar la titulación de la misma en placas con CM/-Leu. La mezcla se resuspende en 45ml de 2xYPDA en un matraz de 2L para la generación de diploides, que se dejan durante 24 horas, en agitación suave a 30°C. Transcurridas las 24 horas, se centrifuga la solución y se resuspende el precipitado en 10ml de 0,5xYPDA con Kanamicina, para prevenir posibles contaminaciones. De la muestra obtenida, se toman 100µl para realizar una batería de diluciones 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000 y se siembran en tandas de tres, en placas distintas: CM/-Trp, CM/-Leu y CM/-Trp-Leu que se dejan durante 5 días a 30°C. Así se podrá calcular el número de diploides que se obtienen y la viabilidad de cada una de las cepas. La mezcla restante se inocula en placas de CM/-Trp-Leu-His, donde crecerán los interactuantes y se dejan crecer durante 5 días a 30°C.

4.1. ENSAYOS FENOTÍPICOS DE CRECIMIENTO EN MEDIOS SELECTIVOS

En el ensayo del doble híbrido los genes reporteros que se emplean son *HIS3*, *ADE2* y *lacZ*. En el diploide, las levaduras poseen dos plásmidos: pGADT7-Rec (en donde se han clonado los distintos fragmentos de la librería) que posee el dominio de activación del factor transcripcional Gal4p y el plásmido pGBKT7HMGB1 que incluye el dominio de unión a DNA de Gal4p. La reconstitución de Gal4p conlleva que este factor transcripcional active la transcripción de los genes informadores *HIS3*, *ADE2* y *lacZ* y

esto permite el crecimiento de la levadura en las placas con el medio selectivo: CM/-Leu/-Trp/-His y CM/-Leu/-Trp/-Ade. También se comprueba la existencia de interacción por la actividad galactosidasa (gen *LacZ*), que transforma el sustrato sintético X- α -gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranosido) en un producto de color azul.

5. IDENTIFICACIÓN DE CANDIDATOS

5.1. EXTRACCIÓN DEL PLÁSMIDO DE LEVADURAS

El aislamiento y purificación del DNA plasmídico se realiza empleando el “kit” comercial *GeneJET plasmid miniprep kit*, de *ThermoFisher Scientific*.

El procedimiento se basa en el uso de una batería de soluciones que se corresponden con, la solución de resuspensión, la solución de lisis, la solución de neutralización y la solución de lavado, para conseguir extraer de forma más efectiva y pura el plásmido. El aislamiento comienza con la rotura mecánica de la célula de la levadura, para ello se resuspenden las células de los candidatos en la primera solución que contiene RNAasas, se añaden lascas de vidrio (de aproximadamente 450 micras) y se agita con un vórtex. Posteriormente se añaden la de solución de lisis que se mezcla por inversión y la solución de neutralización que ayuda a la precipitación de membranas, orgánulos y otros restos celulares. Se centrifuga durante 5 minutos a 13000 rpm, se recoge el sobrenadante y se introduce en una columna con una membrana de sílice en la que se quedará retenido el DNA. Se lava entonces la columna dos veces con solución de lavado, centrifugando a 13000 rpm durante 1 minuto para descartar el sobrenadante. Por último se eluye el DNA con 20 μ l de H₂O MiliQ y se conserva a 4°C hasta su utilización.

5.2. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

En esterilidad se añade a un Eppendorf, de 1ml, 50 μ l de células competentes *E. coli* de la línea XL1-Blue y 5 μ l del DNA plasmídico y se incuba en hielo durante 20 minutos. En un termobloque a 42°C se les da a las células un choque térmico durante aproximadamente 1 minuto y se sitúan de nuevo en hielo durante 1-2 minutos. A

continuación, se añade 1 ml de medio LB líquido y se incuba en agitación (250 rpm) durante 1 hora, para favorecer la recuperación de las células. Pasado dicho tiempo, se centrifugan a 13000 rpm durante 1 minuto y se descarta la mayor parte del sobrenadante resuspendiendo las células en 100 µl de medio que se siembra en placas LBA incubándose durante 24 horas a 37°C.

5.3. EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO DE BACTERIAS.

El procedimiento es el mismo que el detallado en el punto 5.1 *Extracción de plásmido de levaduras*, pero no se emplean las lascas de vidrio para realizar el proceso, ya que la membrana bacteriana es más débil y fácil de fracturar.

5.4. CUANTIFICACIÓN DE DNA

Para realizar la cuantificación de DNA de cada una de nuestras muestras, empleamos un espectrofotómetro de la casa comercial Eppendorf que analiza tanto la cantidad de DNA en µg/ml como el ratio 260/280, donde se observa la relación entre proteínas y DNA, siendo 280 nm el máximo de absorción por parte de las proteínas y 260 nm el de los ácidos nucleicos. Se alcanza un resultado óptimo cuando el ratio es próximo a 1,8.

5.5. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

Los distintos plásmidos de la librería se secuencian utilizando el oligo T7 (5'AATACGACTCACTATAGGGCG-3') en el SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidade da Coruña).

5.6. HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS

BLASTN: Programa informático que se emplea para analizar homología de las secuencias nucleotídicas obtenidas de los plásmidos de la librería. Esta base de datos, se localiza en la página web NCBI (*National Center Biotechnology Information*), cuyo enlace se detalla a continuación: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Las búsquedas de información acerca de los candidatos secuenciados, se han visualizado en la página web del NCBI en un apartado denominado **PubMed**. La página web es la siguiente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Para determinar si la interacción de HMGB1 con las proteínas identificadas de la librería se había descrito previamente, se utilizó el **BioGRID** (*Biological General Repository for Interaction Datasets*), cuyo enlace es el que sigue: <http://thebiogrid.org>. La página de la Asociación Española Contra el Cáncer (<https://www.aecc.es/>) se utilizó para obtener información general sobre el cáncer de próstata.

RESULTADOS

Para identificar las proteínas que interaccionaban físicamente con HMGB1 se realizó un experimento del doble híbrido tal y como se indica en el apartado de materiales y métodos. Se empleó la cepa de *S. cerevisiae* Y187 con el plásmido pGBKT7HMGB1, combinada con una alícuota de 1 ml de la librería de tejido de próstata tumoral para la formación de diploides.

1. CÁLCULOS

Para la titulación de la librería se sembraron diluciones, 1/100, 1/1000 y 1/10000 (por triplicado), antes de realizar el ensayo del doble híbrido. Después del experimento se sembraron las mismas diluciones para comprobar la eficiencia tanto de la cepa que porta pGBKT7HMGB1 en medio CM/-Trp, como de la librería en medio CM/-Leu y de los diploides en medio CM/-Leu/-Trp.

Los cálculos se han realizado en base a los datos obtenidos en las diferentes placas, teniendo en cuenta el factor de dilución y el volumen sembrado en cada una de ellas.

Tabla 2: Datos obtenidos para el cálculo de las diferentes viabilidades:

	Dilución	Colonias (cfu)	Volumen sembrado (ml)
Titulación librería	1/10.000	1051	0,1
Nº screen clones	1/100	141	0,1
Librería (prey)	1/1.000	486	0,1
HMGB1 (bait)	1/10.000	3016	0,1

$$\text{Titulación de la librería} = (1051/0,1) \times 10000 = 105.100.000 \rightarrow 1,05 \cdot 10^8$$

$$\text{Viabilidad librería (prey)} = (486/0,1) \times 1000 = 4.860.000 \rightarrow 4,86 \cdot 10^6$$

$$\text{Viabilidad HMGB1 (bait)} = (3016/0,1) \times 10000 = 301.600.000 \rightarrow 3,01 \cdot 10^8$$

$$\text{Viabilidad diploides} = (141/0,1) \times 100 = 141.000 \rightarrow 1,41 \cdot 10^5$$

$$\text{Eficiencia de la formación de diploides} = [1,41 \cdot 10^5 / 4,86 \cdot 10^6] \times 100 = 2,9\%$$

Los resultados obtenidos mostraron una eficiencia de formación de diploides mayor del 2%, que es el mínimo necesario para considerar el experimento como válido, ya que garantiza un número de clones chequeados mayor de dos millones. Además las viabilidades obtenidas son razonables, la viabilidad de los diploides menor que la de la librería y ésta menor que la de la línea con pGBKT7HMGB1.

2. ENSAYOS FENOTÍPICOS

Las colonias que crecieron en las placas CM/-Leu/-Trp/-His, fueron resemebradas en medio CM/-Leu/-Trp/-Ade, posteriormente se pasaron a CM/-Leu/-Trp/-His/-Ade y de este medio a CM/-Leu/-Trp/X-Gal.

Tabla 3: Número de colonias crecidas en los distintos medios:

	Medios de cultivo			
	CM/-Leu/-Trp/-His	CM/-Leu/-Trp/-Ade	CM/-Leu/-Trp/-His/-Ade	CM/-Leu/-Trp/-Xagal
candidatos	47	37	32	26

De estas 26 colonias positivas, capaces de crecer en los tres medios y de dar color azul en presencia de X-Gal, se prepararon cultivos de 10 ml en medio líquido CM/-Leu/-Trp/-His, y se realizó la extracción del plásmido de las muestras, tal como se indica en el apartado de materiales y métodos. Posteriormente se realizaron 26 transformaciones independientes utilizando para cada una 50 µl de bacterias *E. coli* XL1-Blue y 5µl de cada DNA plasmídico extraído de las levaduras. Una colonia de cada transformación fue sembrada en medio LBA e incubada 24 horas a 37°C, para posteriormente realizar la extracción del plásmido de bacterias.

Por último se cuantificó la cantidad de DNA con el espectrofotómetro “*Kinetic*” de Eppendorf, dónde se obtuvo la cantidad de DNA en µg/ml.

Tabla 4: Resultado de la cuantificación de DNA de las muestras:

Colonia	DNA (µg/ml)	Colonia	DNA (µg/ml)
1	591,9	25	605,8
3	982,4	30	896,6
4	589,1	31	864,1
7	631,1	33	708,4
12	823,8	35	692,9
16	612	47	784
19	710,5	48	557,4
21	539,2	56	684,5
22	1063,5		

El DNA obtenido tras los procesos anteriores, fue enviado al SAI (*Sevicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña*) y fue secuenciado.

Las secuencias resultantes fueron confrontadas con la base de datos BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool*), para determinar la identidad de los genes clonados en el plásmido de la librería y con BioGRID para comprobar si la interacción de estas proteínas con HMGB1 se había descrito con anterioridad.

Tabla 5: Resultados obtenidos tras el análisis de BLASTN y BioGRID

CANDIDATOS	PROTEÍNA	DESCRIPCIÓN	INTERACCIÓN CON HMGB1
1 y 31	<u>MRVI1</u>	Sitio de integración del retrovirus murino	NO
3	<u>ZNF428</u>	Dedo de zinc	NO
4 y 12	<u>TAF3</u>	Factor de transcripción 3 asociado al gen TBP	NO
7 y 8	<u>MAP1B</u>	Proteína de asociación a microtúbulos	NO
16	<u>WNK4</u>	Proteín-quinasa	NO
19	<u>FOS</u>	Fosfoproteína	NO
21	<u>RSF1</u>	Factor de remodelación y separación	NO
22 y 30	<u>SRFS3</u>	Factor de corte y empalme	NO
25	<u>UBE2N</u>	Ubiquitina	NO
33	<u>PTPN2</u>	Proteína tirosina fosfatasa	NO
35	<u>GOLM1</u>	Proteína de la membrana de Golgi	NO
36 y 47	<u>MIEN1</u>	Potenciador de migración e invasión celular	NO
48	<u>ERBB2</u>	Receptor tirosín-quinasa	NO
56	<u>YY1</u>	Factor de transcripción	NO

Cinco muestras no dieron resultados válidos para el estudio tras la secuenciación. Cuatro se correspondían con el vector pGADT7-Rec vacío, es decir sin ningún fragmento de cDNA clonado y uno fue identificado como HMGB1, esto es posible porque esta proteína interactúa consigo misma.

DISCUSIÓN

Según los resultados obtenidos se puede indicar que el experimento, ha sido bueno ya que no se ha obtenido un elevado número de repeticiones en relación con los candidatos identificados. Las repeticiones encontradas no han sido de más de dos genes por muestra.

Tras la búsqueda de interacciones de los mismos, con HMGB1 empleando el programa informático, BioGRID, se ha comprobado que ninguna de las proteínas identificadas se había descrito previamente como interactuante de HMGB1. Sin embargo, existe una relación indirecta de estas proteínas, con otras que sí que están identificadas como interactuantes con la proteína humana, HMGB1. Por un lado TAF3, está asociado a TBP (proteína que se une a la caja TATA) que es una *proteína de unión a la caja TATA* y se sabe que interactúa con HMGB1. También se había registrado la interacción con otra proteína con dominio de dedo de Zinc, ZFN24, similar a la proteína que se ha localizado en este experimento, ZNF428. Otra proteína relacionada fue MAP1B, *proteína de asociación a microtúbulos*, con MAPK1, *Mitogen-activated protein kinase 1*, cuya interacción con HMGB1 también estaba descrita en el BioGRID.

De los catorce interactuantes identificados, trece muestran relación con los distintos tipos de cáncer, de los cuales cinco de ellos, han sido relacionados con el cáncer de próstata.

TAF3: Proteína que se asocia a la TBP. No se puede afirmar que exista un claro papel de esta proteína el cáncer, aunque se ha descrito su relación con p53 un supresor tumoral con funciones esenciales en vías de apoptosis y control del ciclo celular (Bereckzi *et al.*, 2008).

ZNF428: Es una proteína con dominios de dedos de Zinc, que interacciona selectivamente y no covalentemente con iones metálicos. No hay datos publicados acerca de su influencia en enfermedades.

MRVI1: En humanos apenas hay estudios pero una proteína similar en ratones sugieren que la integración MRV en MRVI1, induce leucemia mieloide mediante la alteración de la expresión de un gen importante para el crecimiento de células mieloides y/o diferenciación.

MAP1B: Proteína asociada a microtúbulos. Se ha descrito su papel indirecto en varios cánceres como el de pulmón y mama, ya que interacciona con RASSF1A una proteína con un importante papel antitumoral porque induce senescencia y apoptosis celular (Dallol *et al.*, 2004),

WNK4: Proteína-quinasa con diferentes patrones de expresión. Hay una fuerte evidencia de que estas quinasas, juegan un papel como reguladoras de las cascadas de MAPK, que están implicadas en el control de proliferación celular y por lo tanto en el crecimiento y progresión de numerosos tumores malignos. En el cáncer de próstata la vía de señalización MAPK (ERK/MAPK) puede actuar como mediador antitumoral, a través de sus efectos sobre la apoptosis, la supervivencia celular, el potencial metastásico y el crecimiento independiente de andrógenos (Moniz y Jordan, 2010).

FOS: Proteína oncogénica relacionada fundamentalmente con el cáncer de ovario donde desregula diversas proteínas pro-apoptóticas (Yin *et al.*, 2016).

RSF1: Factor de remodelación y separación de la cromatina. Distintos estudios indican la relación entre la remodelación de la cromatina y los procesos cancerosos a través de la regulación del ciclo celular y la expresión génica. Se ha encontrado una sobreexpresión de RSF1 en distintos tipos de cáncer como el carcinoma oral de células escamosas y el de próstata, en ambos casos contribuye al crecimiento de las células cancerosas, a la invasión y la formación de metástasis, lo que lo hace un buen candidato para biomarcador (Li *et al.*, 2014).

SRSF3: Factor de corte y empalme rico en serina y arginina, que regula el *splicing* alternativo del mRNA y la exportación del mRNA maduro desde el núcleo al citoplasma. Se sobreexpresa en el cáncer de ovario y en el cáncer oral de células escamosas, donde se asocia con el inicio y desarrollo de lesiones pre-cancerosas y cáncer, donde se ha propuesto como biomarcador (Zhang y He, 2015; Peiqi *et al.*, 2016).

UBE2N: Proteína de la ruta de la Ubiquitina (degradación de proteínas). Juega un papel protumoral, en neuroblastoma infantil, en el que induce la pérdida de la función antitumoral de p53 se produce su pérdida de función. Se ha detectado que esta proteína también se sobreexpresa en cáncer de próstata, pero no se ha dilucidado su función (Davalieva *et al.*, 2015).

PTPN2: Proteín-tirosín-fosfatasa. Actúa como regulador negativo de la vía PI3K/AKT, que se ve alterada en el cáncer de mama, favoreciendo la progresión del tumor (Karlsson *et al.*, 2015).

GOLM1: Proteína de membrana del aparato de Golgi. Estudios comparativos de tejido prostático sano y tumoral, pusieron de manifiesto la sobreexpresión de esta proteína en el cáncer de próstata. Puede emplearse como biomarcador, como el PSA ya que se excreta activamente en la orina y es producido de manera masiva por el tejido tumoral prostático, siendo incluso más efectivo que éste (Varambally *et al.*, 2008).

MIEN1: Factor que potencia la invasión y migración celular. Está relacionado con numerosos tipos de cáncer, en los que se aumentan sus niveles de expresión (mama, próstata, gastrointestinal y oral). En el cáncer de puede ser utilizado como un biomarcador (Rajendiran *et al.*, 2014).

ERBB2: Receptor tirosín-quinasa. Esta prtoteina esta sobreexpersada en cáncer de mama y se ha utilizado un anticuerpo-ERBB2 como tratamiento con resultados esperanzadores. Se ha sugerido, que su sobreexpresión podría jugar un papel importante en el desarrollo del cáncer de próstata, pero tras estudios comparativos

con el cáncer de mama, se determinó que la expresión de ERBB2 en el tejidos prostáticos tumorales era relativamente baja y sus niveles no se alteraban mucho durante la progresión de la enfermedad, determinando que el tratamiento con el anticuerpo-ERBB2, no serían útiles para el tratamiento de este tipo de tumor (Savinainen *et al.*, 2002).

YY1: Factor de transcripción que se sobreexpresa en la progresión del tumor prostático, además se ha constatado su papel en la resistencia a algunos fármacos que desarrollan algunos tumores por lo que se ha convertido una diana para el estudio de nuevas terapias (Kashyap y Bonavida, 2014).

Se debe tener en cuenta que este es un estudio inicial, y que todas la interacciones identificadas deben ser recomprobadas mediante otra técnicas como por ejemplo co-inmunoprecipitación.

CONCLUSIÓN

El método de doble híbrido en levaduras, es capaz de identificar nuevas proteínas que interactúan físicamente con la proteína humana HMGB1. En este estudio han sido identificadas catorce proteínas en una muestra de tejido de próstata tumoral.

La proteína humana HMGB1 en células de próstata cancerosas, parece que interactúa físicamente con catorce proteínas de las cuales, trece han sido relacionadas previamente con cáncer y se corresponden con: TAF3, GOLM1, ERBB2, WNK4, MIEN1, FOS, YY1, SRSF3, SRF1, UBE2N, PTPN2 Y MAP1B. De estos interactuantes, en cinco se había descrito una relación con el cáncer de próstata: MIEN1 y WNK4 con un papel fundamentalmente antitumoral y GOLM1, YY1 y RSF1 con una función fundamentalmente oncogénica.

CONCLUSION

The method of yeast two-hybrid is able to identify new proteins that physically interact with the human protein HMGB1. In this study fourteen proteins have been identified in a sample of prostate tumor tissue.

The human protein HMGB1 in prostate cancer cells, seems physically interacts with fourteen proteins which thirteen have previously been related to cancer: TAF3, GOLM1, ERBB2, WNK4 MIEN1, FOS, YY1, SRSF3, SRF1, UBE2N, PTPN2 and MAP1B. Five have been associated with prostate cancer: MIEN1 and WNK4 with a fundamentally anti-tumor role and GOLM1, YY1 and RSF1 with a oncogenic function.

BIBLIOGRAFÍA

- Barreiro-Alonso A., Lamas-Maceiras M., Rodriguez-Belmonte, E., Vizoso-Vázquez, A., Quindós, M., Cerdán, M.E. (2016). High mobility group B proteins, their partners, and other redox sensors in ovarian and prostate cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-17.
- Bartling B., Hofmann H.S., Weigle B., Silber R.E. & Simm A. (2005). Down-regulation of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) supports non-small cell lung carcinoma. *Carcinogenesis*. 26: 293–301.
- Berczki O., Ujfaludi Z., Pardi N., Nagy Z., Tora L., Boros I.M. & Balint E. (2008) TATA binding protein associated factor 3 (TAF3) interacts with p53 and inhibits its function. *BMC Molecular biology*. 9: 57-68.
- Bianchi M.E. & Agresti A. (2005). HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Current Opinion in Genetics & Development*. 15:496-506.
- Bonaldi T., Laengst, G., Strohner, R., Becker, P.B. & Bianchi, M.E. (2002). The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. *The EMBO journal*. 21: 6865-6873.
- Davalieva K., Kostovska I.M., Kiprijanovska S., Markoska K., Kubelka-Sabit K., Filipovski V., Stavridis S., Stankov O., Komina S., Petrusevska G. & Polenakovic M. (2015) Proteomics analysis of malignant and benign prostate tissue by 2D DIGE/MS reveals new insights into proteins involved in prostate cancer. *Prostate*. 75: 1586-1600.
- Dalloy A., Agathangelou A., Fenton S.L., Ahmed-Choudhury J., Hesson L., Vos M.D., Clark G.J., Downward J., Maher E.R. & Latif F. (2004) RASSF1A interacts with microtubule-associated proteins and modulates microtubule dynamics. *Cancer research*. 64: 4112-4116.
- Ellerman J.E., Brown C.K., de Vera M., Zeh H.J., Billiar T., Rubartelli A. & Lotze M.T. (2007). Masquerader: high mobility group box-1 and cancer. *Clinical cancer research*. 13: 2836–2848.
- Gangloff Y.G., Pointud J.C., Thuault S., Carré L., Romier C., Muratoglu S., Brand M., Tora L., Couderc J.L. & Davidson I. (2001) The TFIID components human TAF(II)140 and *Drosophila* BIP2 (TAF(II)155) are novel metazoan homologues of yeast TAF(II)47 containing a histone fold and a PHD finger. *Molecular cell biology*. 21: 5109-5121.
- Hanahan D. & Weinberg R.A. (2000) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 100: 57-70.
- James P., Halladay J. & Craig E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*. 144: 1425-1436.
- Karlsson E., Veenstra C., Emin S., Dutta C., Pérez-Tenorio G., Nordenskjöld B., Fornander T. & Stål O. (2015) Loss of protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2 is associated with activation of AKT and tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 153: 31-40.

- Kashyap V. Bonavida B. (2014). Role of YY1 in the pathogenesis of prostate cancer and correlation with bioinformatic data sets of gene expression. *Genes Cancer*. 5 :71-83.
- Li H., Zhang Y., Zhang Y., Bai X., Peng Y., He P. (2014). Rsf-1 overexpression in human prostate cancer, implication as a prognostic marker. *Tumour Biol*. 35:5771-6.
- Moniz S. & Jordan P. (2010) WNK kinase signalling in cancer biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67: 1265-1276.
- Peiqi L., Zhaozhong G., Yaotian Y., Jun J., Jihua G., & Rong J. (2016) Expression of SRSF3 is Correlated with Carcinogenesis and Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma. *International journal of medicine science*. 13: 533-539.
- Rajendiran S., Parwani A.V., Hare R.J., Dasgupta S., Roby R.K. & Vishwanatha J.K. (2014) microRNA-940 suppresses prostate cancer migration and invasion by regulating MIEN1. *Molecular cancer*. 13-250.
- Rakoff-Nahoum S. & Medzhitov R. (2009) Toll-like receptors and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 9: 57-63.
- Savinainen K.J., Saramäki O.R., Linja M.J., Bratt O., Tammela T.L. Isola J.J. & Visakorpi T. (2002). Expression and gene copy number analysis of ERBB2 oncogene in prostate cancer. *American journal of pathology*. 160: 339-345.
- Scalken J.A. & Van Leenders G. (2003) Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology. *Urology*. 62: 11-20.
- Thomas J.O. & Travers A.A. (2001) HMG1 and 2, and related "architectural" DNA-binding proteins. *Trends in biochemical sciences*. 26: 167-174.
- Timms B.G. (2008) Prostate development: a historical perspective. *Differentiation*. 76: 565-577.
- Varambally S., Laxman B., Mehra R., Cao Q., Dhanasekaran S.M., Tomlins S.A., Granger J., Sreekumar A., Yu J., Gu W., Shen R., Ghosh D., Wright L.M., Kuefer R., Rubin M.A., Fimmel C.J. & Chinnaiyan A.M. (2008) Golgi protein GOLM1 is a tissue and urine biomarker of prostate cancer. *Neoplasia*. 10: 1285-1294.
- Zhang P. & He X. (2015) Serine/arginine-rich splicing factor 3 (SRSF3) regulates homologous recombination-mediated DNA repair. *Molecular cancer*. 14: 158-172.