



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

Facultad de ciencias – Área de Bioquímica y Biología
Molecular

Memoria de Trabajo de Fin de Máster

**“VERIFICATION OF A PHYSICAL INTERACTION OF
HMGB1 WITH ITS TARGET”**

**“COMPROBACIÓN DE UNA INTERACCIÓN FÍSICA DE
HMGB1 CON SU DIANA”**

**“COMPROBACIÓN DUNHA INTERACCIÓN FÍSICA DE
HMGB1 COA SÚA DIANA”**

Ana Feijóo Buján

A Coruña, a 1 de Septiembre de 2017

Dirigido por:

M^a Esperanza Cerdán Villanueva

Mónica Lamas Maceiras

AGRADECIMIENTOS

Hace 25 años tuve la suerte de encontrarme, por primera vez, con el amor de mi vida. Ella me enseñó que todo esfuerzo vale la pena y que la palabra “límite”, no tenía cabida en nuestro vocabulario. Ella me enseñó a luchar para llegar a la meta deseada y a no rendirme nunca, aunque el camino fuera complicado y la vida no sucediese como nos la habíamos imaginado, cuando éramos pequeñas. Aquí estoy, Mamá, cerrando etapas y cumpliendo sueños, como te prometí que haría cuando te fuiste. Gracias por haberme hecho sentir la persona más grande del mundo y la más feliz, por haber podido disfrutar de ti, de tu amor y de tu alegría durante 23 años, porque te aseguro que han sido los mejores años de mi vida; como decía Antonio Machín: *“Toda una vida, me estaría contigo, no me importa en qué forma, ni dónde ni cómo, pero junto a ti”*. Seguiré intentando cumplir todo lo que me proponga y sé que tu estarás ahí, a mi lado, en algún sitio, sonriendo, aunque ya no pueda verte.

Agradecer a mi familia, todo el cariño recibido, el apoyo y los buenos momentos. Gracias en especial, a mi padre, Jose, por el esfuerzo realizado para que este máster fuera posible, por quererme y por cuidarme; a mi ahijada, Nadia, por hacer del mundo un lugar mejor desde que llegó hace 7 años para llenarnos el corazón de sonrisas, y a mi prima Antía, *“Coli”*, por ser la persona más especial de este planeta.

Gracias a mis amigos, la familia que elegimos, por animarme, por mimarme, por todos los momentos vividos y por todos los que quedan, por las charlas, los viajes y las aventuras, por saber que decirme en cada momento y aguantar mi mal humor. ¡Sois unos benditos!

Gracias a mis directoras, M^a Esperanza y Mónica, por haberme brindado la oportunidad de realizar este proyecto, y también a todos mis compañeros del laboratorio, que siempre me hicieron sentir una más del grupo; en especial, gracias a Aida, por su dedicación, su cariño, su tiempo y su paciencia.

Gracias a todos, los que habéis compartido vuestro tiempo conmigo, y también a los que lo seguís haciendo día a día. ¡Os quiero!

ABSTRACT

In previous studies, using the yeast two hybrid system, the physical interaction between the human protein HMGB1 and the transcription factor YY1 was described, being both proteins related to carcinogenic processes. This method presents about 5% of false positives, therefore in the present work we have tried to confirm this interaction in the PC-3 tumor prostate cell line, by the co-immunoprecipitation technique. For the immunoprecipitation the anti-HMGB1 antibody was used, and for detecting the binding partner the anti-YY1 antibody. Negative results were obtained, which does not discard that both proteins might interact in other conditions.

Keywords: HMGB1, immunoprecipitation, YY1, prostate cancer, biomarker

RESUMEN

En estudios previos, mediante el sistema del doble híbrido en levaduras, se había descrito la interacción física entre la proteína humana HMGB1 y el factor transcripcional YY1, ambas relacionadas con procesos cancerígenos. Este método presenta alrededor de un 5% de falsos positivos, por lo que en el presente trabajo se ha intentado confirmar dicha interacción, en la línea celular de próstata tumoral PC-3, mediante la técnica de inmunoprecipitación, utilizando para la inmunoprecipitación anticuerpos anti-HMGB1 y para la detección de la proteína co-inmunoprecipitada un anticuerpo anti-YY1. Los resultados obtenidos no fueron positivos, lo que no descarta que ambas proteínas puedan interactuar en otras condiciones.

Palabras clave: HMGB1, inmunoprecipitación, YY1, cáncer de próstata, biomarcador

RESUMO

En estudos previos, mediante o sistema do dobre híbrido en lévedas, describíouse a interacción física entre a proteína humana HMGB1 e o factor transcripcional YY1, ambas relacionadas con procesos canceríxenos. Este método presenta alrededor dun 5% de falsos positivos, polo que no presente traballo inteutouse confirmar dicha interacción, na línea celular de próstata tumoral PC-3, mediante a técnica de inmunoprecipitación, empregando para a inmunoprecipitación anticorpos anti-HMGB1 e paraa detección da proteína co-inmuniprecipitada un anticorpo anti-YY1. Os resultados obtidos non fueron positivos, o que non descarta que ambas proteínas interaccionen noutras condicións.

Palabras clave: HMGB1, inmunoprecipitación, YY1, cancro de próstata, biomarcador

ÍNDICE

ABSTRACT/RESUMEN/RESUMO

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER DE PRÓSTATA	1-2
2. HMGB1	2-3
3. RELACIÓN DE HMGB1 CON EL CÁNCER	3-5
4. RELACIÓN DE HMGB1 E YY1	5-6
5. YY1 Y EL CÁNCER DE PRÓSTATA	6-7

OBJETIVOS	8
------------------------	---

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LÍNEA CELULAR	9
2. CULTIVO CELULAR	9
3. OBTENCIÓN DE LISADOS CELULARES - EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	9-10
4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD	10
5. INMUNOPRECIPITACIÓN	10-11
6. SDS-PAGE Y <i>WESTERN BLOT</i>	11-12
7. REUTILIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS: <i>STRIPPING</i>	12

RESULTADOS

1. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HMGB1 E YY1 EN LA LÍNEA TUMORAL PC-3	13-14
2. INMUNOPRECIPITACIÓN DE HMGB1 CON EL ANTICUERPO: <i>Anti-HMGB1 antibody ChIP Grade (abcam)</i>	14-15
3. COMPARACIÓN DE LA INMUNOPRECIPITACIÓN EMPLEANDO LOS ANTICUERPOS DE HMGB1: <i>HMG-1 (W-18) (Santa Cruz)</i> Y <i>Anti-HMGB1 antibody ChIP Grade (abcam)</i>	15-17
4. REUTILIZACIÓN DE LA MEMBRANA DE <i>Anti-HMGB1 antibody ChIP Grade (abcam)</i> , <i>STRIPPING</i> , PARA REVELARLA CON EL ANTICUERPO <i>Anti-YY1 antibody (abcam)</i>	17-18
5. COMPROBACIÓN DE LA INTERACCIÓN POR INMUNOPRECIPITACIÓN DE YY1 MEDIANTE EL EMPLEO DE LOS ANTICUERPOS: <i>Anti-HMGB1 antibody ChIP Grade (abcam)</i> Y <i>HMG-1 (W-18) (Santa Cruz)</i>	19-20

DISCUSIÓN	20-21
------------------------	-------

CONCLUSION/CONCLUSIÓN/CONCLUSIÓN	22
---	----

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER DE PRÓSTATA

La próstata es una glándula del aparato reproductor masculino encargada de producir un líquido blanquecino que enriquece el semen y nutre a los espermatozoides con el fin de otorgarles mayor viabilidad para la fecundación (Mendoza, 2014). Los andrógenos, son uno de los factores más importantes en su crecimiento y desarrollo. Presenta un epitelio pseudoestratificado formado por tres tipos celulares: luminales, basales y neuroendocrinas (Scalken y Leenders, 2003). El cáncer de próstata es el tumor maligno más frecuente y el segundo más letal, tras el de pulmón, en los hombres. Es muy común y afecta a un 15% de los hombres blancos y a un 18% de los hombres afroamericanos. 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). Hay determinados factores, propuestos por la *Asociación Española Contra el Cáncer* (AECC), que influyen en el riesgo de padecer cáncer de próstata, estos incluyen factores genéticos, cambios hormonales, inflamación crónica y diferencias en la dieta. Los métodos actuales de tratamiento para este tipo de cáncer, son la prostatectomía radical, la quimioterapia, la radioterapia o la terapia hormonal, que sirven para controlar eficazmente la enfermedad (Gnanasekar *et al.*, 2013). El inicio y la progresión del tumor están relacionados con diferentes hormonas, especialmente con la testosterona cuyos niveles y los de su receptor, influyen en el crecimiento y la propagación del tumor prostático. La tasa de mortalidad de la enfermedad ha disminuido en un 4,1% anual desde 1994, gracias a la detección temprana mediante el empleo del test del antígeno prostático específico (PSA) o el tacto rectal. Este test mide la cantidad de antígeno prostático específico que hay en la sangre, cuyo origen y liberación ocurre desde la glándula prostática. La cantidad de PSA en sangre aumenta con la edad, ya que el tamaño de la próstata lo hace también. Sin embargo, este test no es del todo fiable ya que, los niveles del antígeno pueden elevarse en sangre, en otros supuestos que no son la presencia de cáncer, como por ejemplo debido a una inflamación, como sería en

el caso de la prostatitis. Además el 15% de los hombres que presentan unos niveles “normales” (<4ng/ml sangre), que se relacionarían con un individuo sano, padecen cáncer de próstata y de éstos el 2%, se encuentra en estadio avanzado (Mendoza L., 2014). Todos estos datos indican que, aunque este test es útil, precisa pruebas diagnósticas complementarias. Por lo tanto, un punto clave en la investigación del cáncer de próstata se centra en la identificación de nuevos biomarcadores que puedan ser utilizados en el diagnóstico, el estudio de la progresión del tumor y/o el tratamiento.

2. HMGB1

HMGB1, *High Mobility Group Box 1*, 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) (Figura 1). Las cajas HMG le permiten interactuar con el surco menor del DNA de una manera dependiente de estructura (Thomas y Travers, 2001).

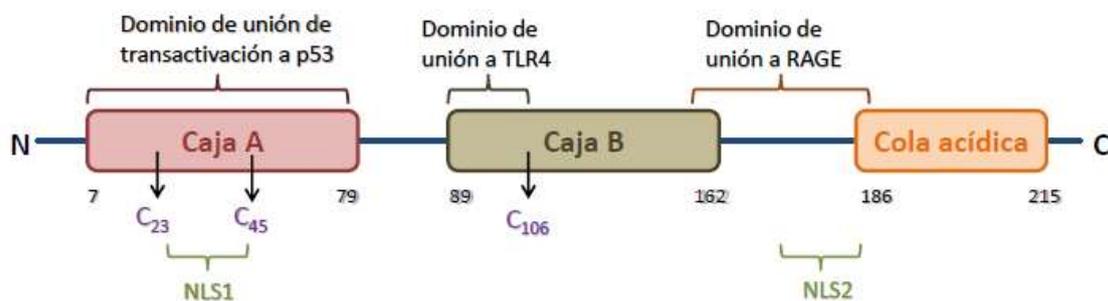


Figura 1: Estructura de HMGB1. C₂₃, C₄₅ y C₁₀₆, se corresponden con residuos de cisteína sensibles a redox. Importantes en la actividad de HMGB1 y puntos clave en ROS. NLS1 y NLS2 son señales de localización nuclear que controlan el transporte de HMGB1. www.clincancerres.aacrjournals.org

HMGB1, desempeña un papel importante en varias enfermedades como la arterioesclerosis, la diabetes, la artritis, la sepsis y el cáncer (Gnanasekar *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que, esta proteína, puede localizarse 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 puede actuar 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 se relaciona con procesos de autofagia y apoptosis, donde juega un papel importante como molécula de señalización extranuclear (Tang *et al.*, 2010). Además, HMGB1 puede ser también secretada de manera extracelular, por células del sistema inmunitario, pero también por células necróticas o alteradas durante el proceso de estrés oxidativo (Ellerman *et al.*, 2007), convirtiéndose en una molécula de señal extracelular, que se une a numerosos receptores de superficie, principalmente a TLRs (*Toll-Like Receptors*) y RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End products*) (Barreiro-Alonso A. *et al.*, 2016), siendo RAGE uno de los receptores de HMGB1, mayormente implicados en el desarrollo y progresión tumoral (Gnanasekar *et al.*, 2013).

3. RELACIÓN DE HMGB1 CON EL CÁNCER

Las características del cáncer comprenden, al menos, seis alteraciones fisiológicas celulares (Figura 2) que se adquieren durante el desarrollo de tumores en humanos, y 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 altos niveles de esta proteína y con un grado de acetilación mayor que el detectado en células sanas (Alexandrova y Beltchev, 1987).



Figura 2: Alteraciones fisiológicas que se adquieren durante el desarrollo del tumor

Además, esta proteína, presenta dos vías de actuación que están en proceso de estudio. Por un lado se ha visto que está implicado en progresión de diversos 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 el cáncer de próstata, en el de 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, evitando la proliferación celular y la metástasis, e incluso favorece la recuperación celular (Ellerman *et al.*, 2007).

Se ha descrito que HMGB1, está altamente expresado en las células de cáncer de próstata. Curiosamente, su presencia se relaciona con clínicas avanzadas de la enfermedad. Kuniyasu y sus colaboradores, realizaron un estudio en 2003 en el que encontraron que HMGB1 no se expresaba en pacientes que no presentaban metástasis

mientras que en los que existía un avance maligno de la enfermedad, esta proteína se expresaba en el 63% de las células del estroma. HMGB1 tiene un papel importante en la progresión del cáncer de próstata, y el papel principal del desarrollo, se centra en la interacción de HMGB1 con el receptor de andrógenos y el receptor RAGE. El eje HMGB1-RAGE es crucial en la carcinogénesis inducida por inflamación. (Gnanasekar *et al.*, 2003).

4. RELACIÓN DE HMGB1 E YY1

HMGB1 adquiere diversas funciones en relación al tipo de cáncer con el que se relacione, y se ha sugerido que estas diferencias podrían deberse, al menos en parte, a la interacción con distintas proteínas, lo cual es importante para observar lo que está ocurriendo a nivel celular y poder determinar nuevos biomarcadores y tratamientos que sean menos invasivos y más específicos.

En estudios previos, que formaron parte de mi proyecto de fin de grado, se empleó el sistema del doble híbrido, para estudiar las interacciones de HMGB1. Este sistema, permite testar interacciones entre proteínas utilizando levaduras y se basa en que dos proteínas que se expresan de forma separada, una el cebo y otra la presa, se fusionan con el dominio de unión a DNA y el dominio de activación de Gal4, respectivamente, de forma que cuando hay una interacción física entre la presa y el cebo, Gal4 se restituye, recupera su funcionalidad y provoca la transcripción de varios genes reporteros independientes (James *et al.*, 1996). El cebo empleado en este caso fue HMGB1 y la presa una librería de cDNA de tejido de próstata tumoral. El experimento permitió identificar catorce proteínas interactuantes, pero ninguna de ellas se había descrito previamente como interactuante de HMGB1 (Tabla 1).

Tabla 1: Genes obtenidos en el experimento del doble híbrido y comprobación de la existencia de interacciones previas con HMGB1, utilizando *BioGRID*

GEN	DESCRIPCIÓN	INTERACCIÓN CON HMGB1
<u>MRVI1</u>	Murine Retrovirus Integration Site 1 Homolog	NO
<u>ZNF428</u>	Dedo de zinc	NO
<u>TAF3</u>	Factor de transcripción 3 asociado al gen TBP	NO
<u>MAP1B</u>	Proteína de asociación a microtúbulos	NO
<u>WNK4</u>	Proteín-quinasa	NO
<u>FOS</u>	Fosfoproteína	NO
<u>RSF1</u>	Factor de remodelación y separación	NO
<u>SRFS3</u>	Factor de corte y empalme	NO
<u>UBE2N</u>	Enzima E2N conjugada a ubiquitina	NO
<u>PTPN2</u>	Proteína tirosina fosfatasa	NO
<u>GOLM1</u>	Proteína de la membrana de Golgi	NO
<u>MIEN1</u>	Potenciador de migración e invasión celular	NO
<u>ERBB2</u>	Receptor tirosín-quinasa	NO
<u>YY1</u>	Factor de transcripción	NO

Los estudios mediante la técnica de doble híbrido son muy útiles, pero presentan alrededor de un 5% de falsos positivos, por lo que es necesario la comprobación de las interacciones mediante otras metodologías. Tras realizar estudios bibliográficos, se seleccionó YY1 para dicha comprobación debido a su relación con el cáncer de próstata.

5. YY1 Y EL CÁNCER DE PRÓSTATA

YY1 (Yin Yang 1), es un factor de transcripción, perteneciente a la clase GLI-Krüppel de proteínas de dedo de zinc, omnipresente y multifuncional que puede actuar como elemento iniciador, represor o activador transcripcional. La transcripción del gen puede producir ocho transcritos diferentes (a, b, c, d, e, f, g y h), que son generados

por *splicing* alternativo, codificando ocho isoformas distintas, de la propia proteína (Zaravinos y Spandidos, 2010). Este factor, está altamente conservado, mostrando un 98,6% de similitud entre humanos y ratones (Zhu *et al.*, 1993). En el 2009, Deng y colaboradores, publicaron un artículo en el que estudiaban la interacción entre el receptor de andrógenos e YY1 en células prostáticas y observaron, a través de estudios de proteínas *in vitro* e inmunoprecipitación, que existía una interacción proteína-proteína entre este receptor e YY1. El receptor androgénico, tiene un papel regulador en el desarrollo de la próstata y su interacción con YY1 optimiza la función de este último como regulador transcripcional. Estos investigadores observaron que, niveles moderados de YY1 son necesarios para un correcto funcionamiento del receptor androgénico, pero cuando YY1 se sobreexpresa, interacciona con este receptor y con otros cofactores que, posteriormente interfieren con la formación del complejo de transcripción, silenciando la actividad del receptor de andrógenos. Diversos estudios han observado elevados niveles de YY1 en tejidos y líneas celulares de cáncer de próstata. Además la existencia de elevados niveles de YY1, se correlaciona con la progresión tumoral y estos niveles son más elevados en tumores intermediarios o avanzados (Grado Gleason 3-5), lo que abre una puerta a su uso como biomarcador de prognosis (Seligson *et al.*, 2005; Kashyap y Bonavida, 2014). Otro punto interesante en el estudio de YY1, es su relación con la resistencia que presentan algunos tipos de cáncer, incluido el de próstata, al tratamiento con ciertos fármacos; así se ha demostrado que derivados del óxido nítrico, como el detanonoato, inhiben, entre otros, a YY1 mediante su nitrosilación, provocando un aumento de la apoptosis celular (Kashyap y Bonavida, 2014).

Por otro lado, YY1 también puede desempeñar funciones antitumorales. Se ha demostrado que una isoforma truncada de YY1, que no posee los primeros 119 aminoácidos, pierde la función de regulador transcripcional, pero es capaz de unirse al DNA y formar un bucle, en respuesta a estímulos apoptóticos como estaurosporina o el factor de necrosis tumoral, promoviendo la apoptosis (Krippner-Heidenreich *et al.*, 2005).

OBJETIVO

Evaluar la interacción del factor de transcripción YY1 y la proteína HMGB1, mediante ensayos de inmunoprecipitación y *Western blot*, utilizando anticuerpos frente a YY1 y HMGB1, empleando la línea de próstata tumoral PC-3.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LÍNEA CELULAR

Se utilizó la línea celular PC-3 (ATCC® CRL-1435™). Una línea celular epitelial de un adenocarcinoma prostático humano, metastásico y de grado IV, obtenido en 1979 de un hombre de origen caucásico.

2. CULTIVO CELULAR

Las células se cultivaron en el medio RPMI 1640 (Gibco), suplementado con un 10% suero bovino fetal (FBS), previamente inactivado por calor y un 1% de penicilina/streptomycin.

La inoculación de las células y sus respectivos pases se llevaron a cabo bajo estrictas condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar. Para el crecimiento celular se incubaron las placas en un incubador a 37°C con 5% de CO₂.

Las células PC-3, crecen adherentes a las placas de cultivo en monocapa, por lo que cuando éstas alcanzaron alrededor de un 80% de confluencia se levantaron. Para ello primero se lavaron con DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) (Gibco), 5 ml por cada placa p100 y después se trataron con 1 ml de tripsina-EDTA (al 0,25% tripsina) y se incubaron a 37°C durante dos minutos. Tras este tiempo, se comprobó que las células estaban libres, no adheridas y se repartieron en placas con medio fresco. Para el proceso de congelación de las células, se empleó un medio constituido por FBS con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Las células se lavaron con DPBS y se tripsinizaron. Una vez levantadas, se inactivó la tripsina (1 ml de Tripsina por cada 4 ml de medio) y se centrifugaron las células: 5 min a 1000 rpm (Centrifuge 5804 R, rotor A-4-44, eppendorf). Posteriormente, se les quitó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de medio de congelación y guardaron a -80°C. Este proceso tiene que ocurrir lentamente, por lo que los viales de células se introdujeron en un recipiente de congelación, *Mr. Frosty*TM (5100-0001, Thermo Scientific), antes de introducirlo en el arcón de -80°C.

3. OBTENCIÓN DE LISADOS CELULARES – EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Los extractos de proteínas se obtuvieron a partir de 5 placas p150, de un cultivo de PC-3 con un 80% de confluencia. Inicialmente se lavaron las células de las placas de dos a tres veces con PBS de lavado (10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, 2,7mM KCl y 137mM NaCl). Posteriormente, se levantaron de la placa con un raspador y PBS y se centrifugaron durante 5 min a 1000 rpm (Centrifuge 5804 R, rotor A-4-44, eppendorf). Para lisar la muestra obtenida, se emplearon 3 ml de tampón de lisis (50mM Tris HCL pH 8, 150mM NaCl, 0,1% NP40, 1mM EDTA, 2mM MgCl₂) al que previamente se le añadieron inhibidores de proteasas, *PierceTM Protease Inhibitor Tablets, EDTA Free* (88266, Thermo Scientific) y se incubó la muestra en hielo 10 min. La ruptura de las células se llevó a cabo en un homogenizador de vidrio (Kontes Glass Co.). Una vez obtenido el homogenizado, se añadió benzonasa para eliminar los ácidos nucleicos presentes en la muestra, para ello se incubó el homogenizado en hielo durante 30 min. Por último, se centrifugó durante 15 min a 13000 rpm (Centrifuge 5804 R, rotor F45-30-11, eppendorf) y se recogió en el sobrenadante.

4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

Se realizó una cuantificación de proteínas totales mediante el método de Bradford, (Bradford, 1976). Para la cuantificación del extracto, se realizó una recta patrón de BSA, partiendo de una solución a 2 mg/ml y se prepararon a distintas concentraciones: 0.125, 0.250, 0,5, 0,750 y 1 mg/ml. El Bradford (*BioRAD*) se utilizó a una dilución 1/5 en agua bidestilada. Se preparó una dilución 1/10 de la muestra, para determinar la concentración de proteínas presentes. Tanto a la muestra como a las diluciones de BSA se les añadió 1 ml de la dilución 1/5 de Bradford, se dejó actuar 5 min y se midió la absorbancia a 595 nm. Tras obtener los datos necesarios, se hizo una recta patrón de la que se extrapoló el valor de concentración de la muestra.

5. INMUNOPRECIPITACIÓN

Para llevar a cabo la inmunoprecipitación, inicialmente se realizó el acoplamiento de las *DynabeadsTM Protein G* (10765583, Invitrogen) con el correspondiente anticuerpo frente a HMGB1, *HMG-1 (W-18)* (sc-74085, Santa Cruz) y *Anti-HMGB1 antibody ChIP*

Grade (ab18256, abcam), a la vez se prepararon las inmunoprecipitaciones control para cada anticuerpo contra HMGB1. Dado que el anticuerpo de HMGB1 de abcam estaba hecho en conejo, se realizó una inmunoprecipitación control empleando una inmunoglobulina G isotipo control de conejo, *Rabbit IgG Isotype Control* (10500C, Thermo Fisher), por otro lado como el anticuerpo de Santa Cruz estaba hecho en ratón, se empleó como control una inmunoglobulina G de ratón, *Normal Mouse IgG* (12-371, Millipore). Para realizar los acoplamientos, se utilizaron 25µl de las *DynabeadsTM Protein G*, por cada inmunoprecipitación y se lavaron con PBS al 0,01% Tween. Posteriormente, se eliminó el PBS y se adicionaron 5µl del correspondiente anticuerpo, y 95µl del PBS al 0,01% Tween y se incubó en el *roller* durante 15 min a temperatura ambiente. Tras este procedimiento, se lavaron de nuevo las *DynabeadsTM Protein G*, con 200µl del PBS al 0,1% Tween tras lo cual se incubaron con el lisado (aproximadamente, 1 mg de proteína total por cada inmunoprecipitación), en rotación, a 4°C durante 18-24 horas. Una vez transcurrido este período de tiempo, se tomó el sobrenadante (*Flow trough*) y se lavaron las *DynabeadsTM Protein G*, 3 veces con tampón de lisis. Para eluir HMGB1 con las proteínas interactuantes, se añadieron 30µl de 2x tampón LB (1M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, glicerol, β-mercaptoetanol, 1% azul de bromofenol y H₂O_d) y se desnaturalizaron 10 min a 95°C. Al finalizar este proceso se separaron los 30µl de las *DynabeadsTM Protein G* empleando el un imán (*magnet*). Para analizar los resultados de la inmunoprecipitación, se realizaron los pertinentes *Western blot* empleando el anticuerpo de HMGB1 e YY1 para evaluar la presencia de estas proteínas.

6. SDS-PAGE Y WESTERN BLOT

Los extractos totales se desnaturalizaron empleando un tampón de carga (200mM Tris HCl pH 6.8, 400mM DTT, 8% SDS, 0,4% Azul de Bromofenol, 40% glicerol) y se calentaron durante 5 min a 95°C. Posteriormente las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10% (Separador: H₂O_d, 1.5M Tris-HCl pH 8,8 45% acrilamida, 20% SDS, 10% APS, TEMED; Concentrador: H₂O_d, 1.5M Tris-HCl pH 6,8 45% acrilamida, 20% SDS, 10% APS, TEMED). La electroforesis se llevó a cabo a voltaje

constante, primero a 80 V durante 20 min y después 1 hora a 180-190 V, en tampón de electroforesis (25mM Tris, 192mM glicina, 0,1% SDS).

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se transfirieron a una membrana de PVDF (GE Healthcare), la cual había sido permeabilizada con metanol y lavada con agua bidestilada y tampón de transferencia. La transferencia se realizó a amperaje constante, 200 mA durante 1 hora, en tampón de transferencia (25mM Tris, 192mM glicina, 20% metanol). A continuación, la membrana se bloqueó en leche desnatada al 10% en PBS 0,1% Tween durante 10 min a temperatura ambiente y se incubó con el correspondiente anticuerpo primario, bien *Anti-HMGB1 antibody CHIP Grade* (ab18256, abcam), o bien *Anti-YY1 antibody* (ab109228, abcam), en una dilución 1/1000, en leche desnatada al 5% con PBS 0,1% Tween. Tras lavar la membrana 3 veces con PBS al 0,1% Tween, ésta, se incubó con el anticuerpo secundario, *Protein G HRP conjugate* (18161, Millipore) en una dilución 1/5000, y posteriormente se lavó tres veces, durante 10 min, con PBS al 0,1% Tween. Por último, se realizó la detección por quimioluminiscencia, empleando el kit *Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent* (RPN2232, GE Healthcare) siguiendo el protocolo de la casa comercial, y la membrana se reveló empleando el sistema *ChemiDoc™ MP, Imaging System* de BioRAD, a temperatura ambiente. Durante el revelado, la membrana se fue escaneando empleando el programa *Image Lab Software* de BioRAD.

7. REUTILIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS: *STRIPPING*

Para la reutilización de las membranas, primero es necesario eliminar la unión de los anticuerpos. Para ello, se incubó la membrana con el tampón de *stripping* (1M Tris-HCL pH 6,8, 20% SDS, β-mercaptoetanol) en un baño durante 30 min a 50°C. Posteriormente se realizaron una serie de lavados a temperatura ambiente, primero 3 veces con agua bidestilada durante 10 min y luego 5 veces en PBS 0,1% Tween durante 10 min. Se bloqueó de nuevo la membrana con leche al 10% en PBS 0,1% Tween durante 10 min a temperatura ambiente y se incubó con los anticuerpos correspondientes para evaluar la presencia de otra proteína.

RESULTADOS

1. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HMGB1 E YY1 EN LA LÍNEA TUMORAL PC-3

En primer lugar se comprobó la expresión de HMGB1 e YY1 en la línea tumoral PC-3 y la conveniencia de los anticuerpos elegidos realizando un lisado de proteínas y *Western blot*, como se ha descrito previamente en materiales y métodos. Para determinar el volumen de lisado de proteínas de PC-3 que se emplearía para la realización del *Western blot*, se realizó una curva patrón con BSA (descrito en el apartado 4 de materiales y métodos) y se cuantificó la muestra, cargándose así dos volúmenes correspondientes a valores de 20 y de 40 μg de proteína total. Se empleó un marcador de peso molecular, *NZY Colour Protein Marker II* (MB09002, NZYtech), para determinar el tamaño las proteínas de interés.

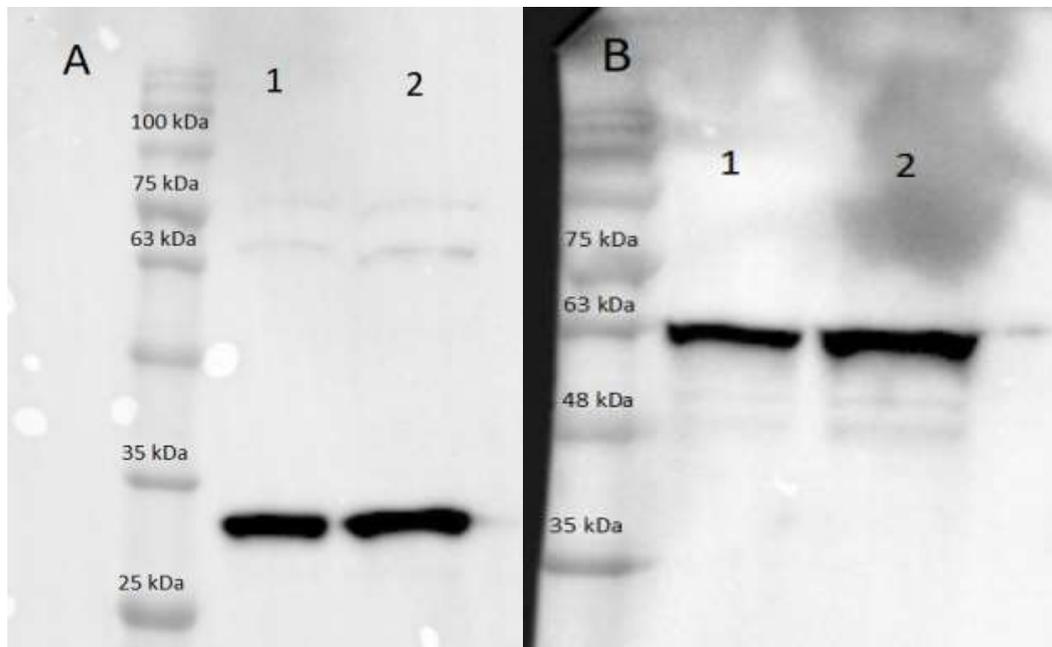


Figura 3: Membranas de comprobación de la expresión de HMGB1 (A) y de YY1 (B). Carriles 1(A) y 1(B) con 20 μg de proteína total. Carriles 2(A) y 2(B) con 40 μg de proteína total.

En ambas membranas, (Figura 3) pudieron observarse las bandas en los pesos moleculares que se correspondían a las proteínas de interés. HMGB1 a 29 kDa y en el caso de YY1, en torno a los 60 kDa (según se describe en fichas técnicas de los anticuerpos empleados, (abcam).

Tras la realización de este *Western blot* inicial, se pudo proceder a la evaluación de la interacción de la proteína humana, HMGB1, con el factor transcripcional, YY1, ya que ambas proteínas, estaban presentes en la línea tumoral empleada y los anticuerpos eran capaces de detectarlas.

2. INMUNOPRECIPITACIÓN DE HMGB1 CON EL ANTICUERPO: *Anti-HMGB1 antibody CHIP Grade (abcam)*

Para poder determinar si HMGB1 inmunoprecipitaba, se realizó un *Western blot* empleando el anticuerpo *Anti-HMGB1 antibody CHIP Grade (abcam)* y como control, una inmunoglobulina G isotipo control de conejo, *Rabbit IgG Isotype Control (Thermo Fisher)* y los resultados se muestran en la figura 4.

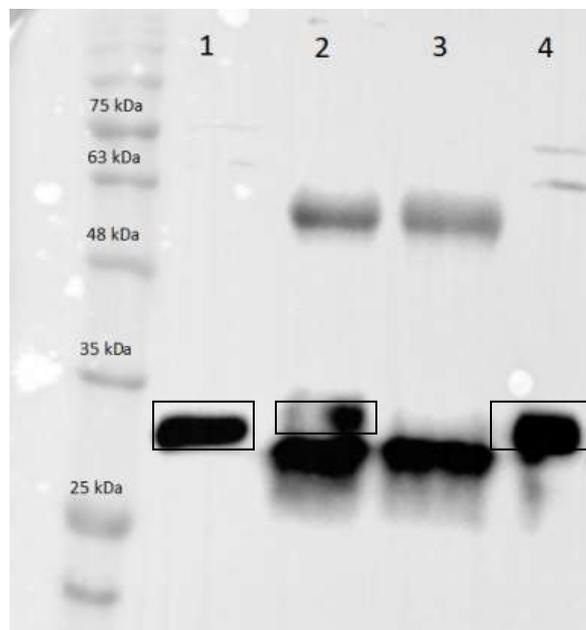


Figura 4: *Western blot* de la inmunoprecipitación de HMGB1, empleando los anticuerpos *Anti-HMGB1 antibody CHIP Grade* y *Rabbit IgG Isotype Control*. Carriles, 1:Lisado total, 2:IP-HMGB1, 3:IP-Rabbit y 4:FT-HMGB1. (IP: Inmunoprecipitación. FT: Eluido de la columna). Con un cuadrado se ha resaltado la posición de HMGB1.

El análisis de esta membrana, permite concluir que HMGB1 sí que inmunoprecipita, ya que en el carril 2 puede observarse una banda en el peso que se corresponde con esta proteína, aunque bastante tenue. Podemos visualizar abundantes cantidades de la misma en el carril 1, que se corresponde con el lisado total y por desgracia, también en el 4, que se corresponde con el volumen eluído de la inmunoprecipitación, lo que indica que parte de HMGB1 se está perdiendo, ya que no todo está inmunoprecipitando. Por otro lado, en el carril 3, el control, no se observa la banda de HMGB1, evidenciando que la banda que observamos en el carril 2, es específica de la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-HMGB1.

Las bandas superior e inferior que se observan en los carriles de las inmunoprecipitaciones, carril 2 y carril 3, se corresponden con la cadena ligera (banda inferior) y la cadena pesada (banda superior) del anticuerpo.

3. COMPARACIÓN DE LA INMUNOPRECIPITACIÓN EMPLEANDO LOS ANTICUERPOS DE HMGB1: *HMG-1 (W-18) (Santa Cruz)* Y *Anti-HMGB1 antibody CHIP Grade (abcam)*

Como se puede observar en la figura 4, la banda que corresponde al inmunoprecipitado de HMGB1 es bastante tenue, por lo que se procedió a la repetición del experimento, realizando dos *Western blot* pero utilizando anticuerpos diferentes para intentar mejorar los resultados. En un experimento, se empleó el anticuerpo *Anti-HMGB1 antibody CHIP Grade (abcam)*, y *Rabbit IgG Isotype Control (ThermoFisher)* (Figura 5) y en otro, se utilizaron los anticuerpos *HMG-1 (W-18) (Santa Cruz)* y *Normal Mouse IgG (Millipore)* (Figura 6).

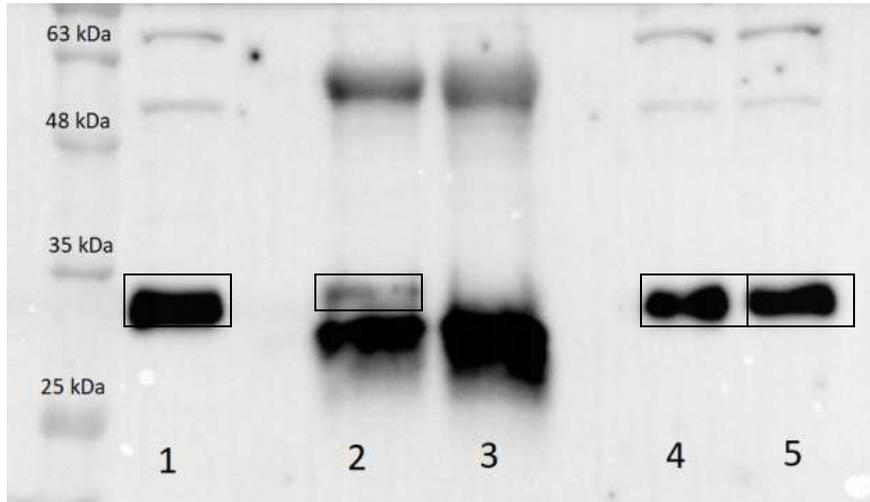


Figura 5: Western blot con los anticuerpos *Anti-HMGB1 antibody CHIP Grade* (abcam) y *Rabbit IgG Isotype Control* (ThermoFisher). Carriles, 1:Lisado total, 2:IP-HMGB1, 3:IP-*Rabbit*, 4:FT-HMGB1 y 5:FT-*Rabbit*. (IP: Inmunoprecipitación, FT: Eluido de la columna). Con un cuadrado se ha resaltado la posición de HMGB1.

Mediante el uso de estos anticuerpos, se pudo recomprobar la inmunoprecipitación de HMGB1, que se había realizado previamente, observándose los mismos resultados, lo cual ha servido como una segunda comprobación del empleo del anticuerpo de HMGB1 de la casa comercial abcam.

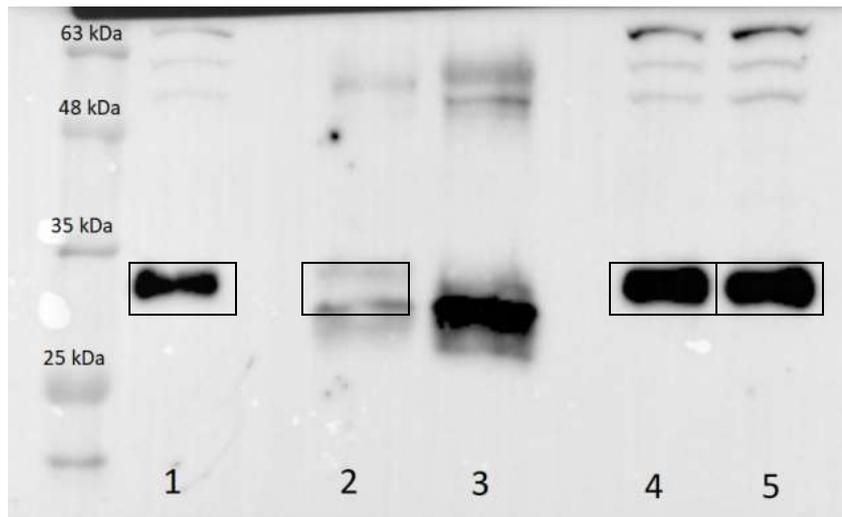


Figura 6: Western blot con los anticuerpos *HMG-1 (W-18)* (Santa Cruz) y *Normal Mouse IgG* (Millipore). Carriles, 1:Lisado total, 2:IP-HMGB1, 3:IP-*Mouse*, 4:FT-HMGB1 y 5:FT-*Mouse*. (IP: Inmunoprecipitación, FT: Eluido de la columna). Con un cuadrado se ha resaltado HMGB1

En la segunda membrana, Figura 6, se puede observar que la cantidad de HMGB1 inmunoprecipitada, es ligeramente inferior a la de la membrana anterior (figura 5) empleando el anticuerpo de abcam. La primera membrana se escaneó pasados 7,3 segundos, mientras que ésta tuvo que escanearse a 32,2 segundos, para poder visualizar la banda correspondiente a HMGB1. Por este motivo, se decidió utilizar el anticuerpo de la casa comercial abcam para los experimentos posteriores.

4. REUTILIZACIÓN DE LA MEMBRANA DE *Anti-HMGB1 antibody* *ChIP Grade* (abcam), *STRIPPING*, PARA REVELARLA CON EL ANTICUERPO *Anti-YY1 antibody* (abcam).

Teniendo en cuenta los experimentos anteriores se decidió utilizar la membrana de la figura 4, en la que la inmunoprecipitación se había realizado con el anticuerpo *Anti-HMGB1 antibody ChIP Grade* (abcam) y el revelado con el mismo anticuerpo, para comprobar si junto a HMGB1 inmunoprecipitaba YY1, lo que requería revelar la membrana con el anticuerpo para esta proteína.

Para poder realizar este segundo revelado, se decidió eliminar la hibridación previa con el anticuerpo *Anti-HMGB1*. Para ello, se trató la membrana siguiendo el protocolo de *stripping*, descrito en el apartado número 7 de materiales y métodos, eliminando el anticuerpo anti-HMGB1 y posteriormente se rehibridó con el anticuerpo *Anti-YY1 antibody* (abcam).

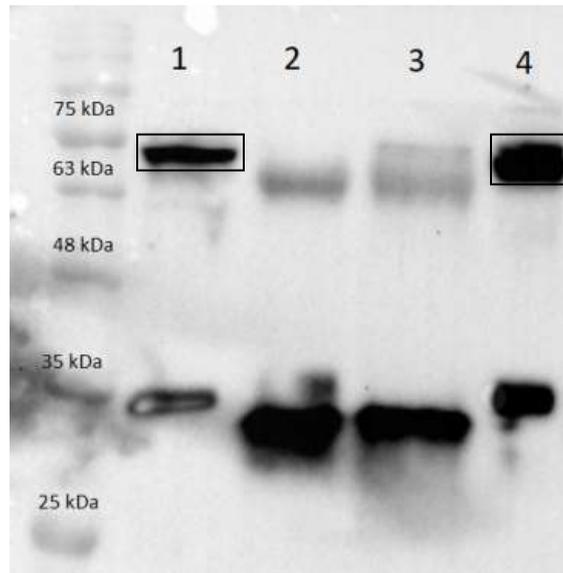


Figura 7: *Western blot*, revelado con el anticuerpo de YY1, *Anti-YY1 antibody (abcam)*. Carril 1: Lisado total, 2: IP-HMGB1, 3: IP-*Rabbit* y 4: FT-HMGB1. (IP: Inmunoprecipitación, FT: Eluído de la columna).

Con un cuadrado se ha resaltado la posición de YY1

En el primer carril, correspondiente con el lisado, y en el cuarto, correspondiente con el eluído de la inmunoprecipitación, se puede observar una banda entre 75 y 63 kDa, que se corresponde con la proteína YY1, que está presente en esta línea empleada, la PC-3. Para que la interacción entre las proteínas de interés fuera positiva en esta membrana, debiera de observarse en el segundo carril, el correspondiente con la inmunoprecipitación de HMGB1, una banda a la misma altura, pero esto no se produjo. En resumen, en esta membrana no se ha podido visualizar YY1 en la inmunoprecipitación. Estos resultados negativos, podrían atribuirse a que la utilización del protocolo de *stripping* para la reutilización de membranas, es agresivo y puede generar pérdidas de proteínas en la membrana, por lo que se procedió a intentar validar esta interacción con otro experimento.

No obstante, debe considerarse que el proceso de *stripping* no ha sido muy eficiente ya que en la parte inferior de la membrana (figura 4) se sigue visualizando la señal correspondiente a HMGB1.

5. COMPROBACION DE LA INTERACCIÓN POR INMUNOPRECIPITACIÓN DE YY1 MEDIANTE EL EMPLEO DE LOS ANTICUERPOS: *Anti-HMGB1 antibody CHIP Grade (abcam)* Y *HMG-1 (W-18) (Santa Cruz)*

Para intentar comprobar la interacción de HMGB1 e YY1 por inmunoprecipitación y ya que el proceso de *stripping* podía dañar la membrana, se procedió a la realización de dos nuevos experimentos de inmunoprecipitación, uno empleando los anticuerpos *Anti-HMGB1 antibody CHIP Grade (abcam)*, y *Rabbit IgG Isotype Control* (ThermoFisher) (Figura 8) y en el otro *HMG-1 (W-18) (Santa Cruz)* y *Normal Mouse IgG* (Millipore) (Figura 9). En ambos casos, las membranas se revelaron directamente con el anticuerpo, *Anti-YY1 antibody (abcam)*.

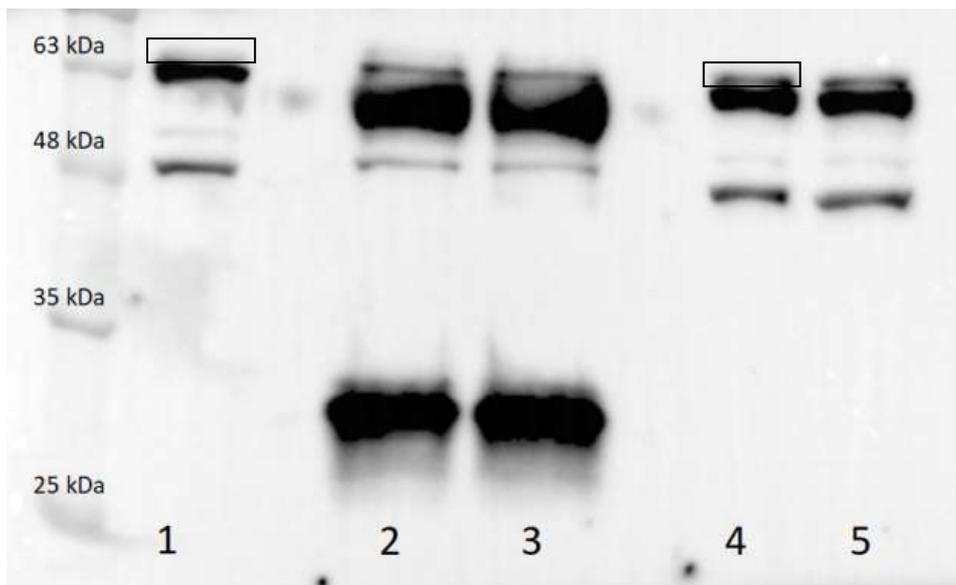


Figura 8: *Western blot* con los anticuerpos *Anti-HMGB1 antibody CHIP Grade (abcam)*, y *Rabbit IgG Isotype Control* (ThermoFisher) y revelado directo con YY1. Carril 1:Lisado, 2:IP-HMGB1, 3:IP-Rabbit, 4:FT-HMGB1 y 5:FT-Rabbit. (IP: Inmunoprecipitación, FT: Eluido de la columna). Con un cuadrado se ha resaltado la posición de YY1

En la imagen de la figura 8, se puede observar la banda correspondiente a YY1 en el lisado total, carril 1, aunque muy tenue y en el carril 4. En el carril 3 correspondiente a la inmunoprecipitación también se observa una banda de tamaño similar, pero que

también aparece en el control negativo, el carril 3, lo que indica que es una banda inespecífica.

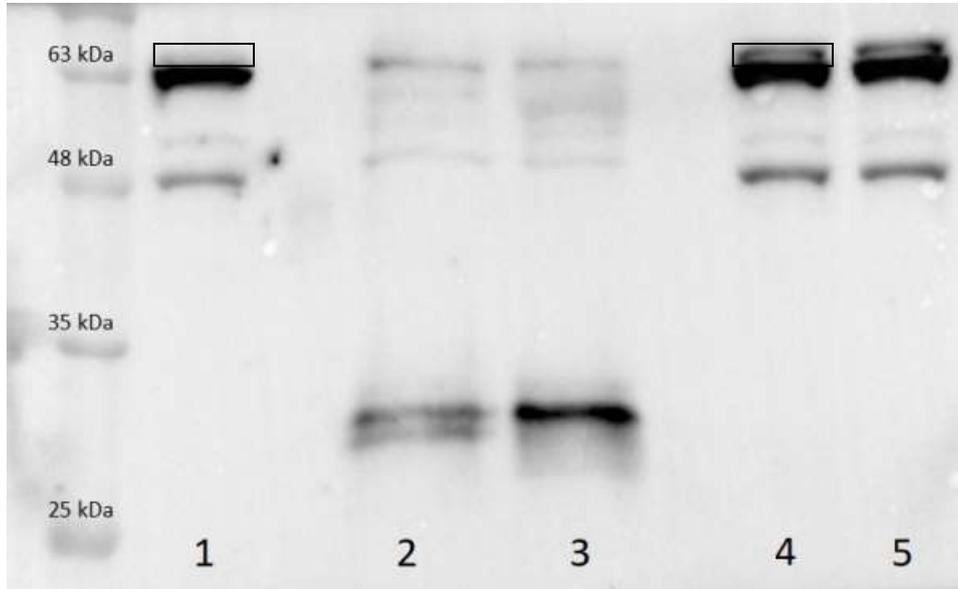


Figura 9: *Western blot* con los anticuerpos *HMG-1 (W-18)* (Santa Cruz) y *Normal Mouse IgG* (Millipore) y revelado directo con YY1. Carriles, 1:Lisado, 2:IP-HMGB1, 3:IP-Mouse, 4:FT-HMGB1 y 5:FT-Mouse. (IP: Inmunoprecipitación, FT: Eluído de la columna). Con un cuadrado se ha resaltado la posición de YY1

En la figura 9, con el empleo del anticuerpo de Santa Cruz, podemos observar el mismo resultado.

DISCUSIÓN

En estudios iniciales, empleando el sistema del doble híbrido, se había observado la existencia de interacciones físicas entre HMGB1 y otras proteínas, entre las que se incluía YY1 (Feijóo-Buján, 2016). La interacción física de HMGB1 y YY1 no se había descrito con anterioridad y se consideró muy interesante debido a la relación de YY1 con el cáncer de próstata, ya no sólo por su implicación en el desarrollo de la enfermedad (Deng *et al.*, 2009), sino también por su papel inductor de resistencia a fármacos para tratar este tipo de cáncer (Kashyap y Bonavida, 2014). Por todo ello, se procedió al intento de validación de la interacción entre YY1 y HMGB1, mediante experimentos de inmunoprecipitación, cuyos resultados, no han podido confirmar lo

planteado. Esto no implica que no exista una interacción entre ambas proteínas, si no que, mediante este método, en esta línea celular y en estas condiciones, no ha sido posible comprobarla. Podría intentar validarse utilizando otra línea celular o modificando los experimentos de inmunoprecipitación, como por ejemplo utilizar resinas de agarosa, en vez de partículas magnéticas, para fijar el anticuerpo o realizar *crosslinking* para fijar las interacciones físicas entre proteínas. Otra posibilidad sería variar el tipo de metodología, realizando por ejemplo, un FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*), que se basa en fusionar las proteínas de estudio a proteínas fluorescentes, una de las cuales emite luz de una longitud de onda determinada, que es capaz de excitar a la otra y esta emite fluorescencia sólo si ambas proteínas están a una distancia menor de 10 nm. (Takanishi *et al.*, 2006).

Aunque no se ha podido comprobar la interacción física de YY1 y HMGB1, si se sabe que ambas interactúan con otras proteínas como el receptor de andrógenos (AR) y miembros la familia de proteínas HOXB, relacionadas con el cáncer de próstata. El promotor de *HOXB13* tiene sitios de unión para el factor transcripcional YY1 y Seligson y colaboradores (2005) demostraron su coinmunoprecipitación en células tumorales de próstata donde dicha interacción, favorece la progresión de la enfermedad. Por otro lado, el receptor de andrógenos es crítico para la proliferación y supervivencia de las células tumorales de próstata e YY1 interactúa con el extremo C-terminal de dicho receptor androgénico (Deng *et al.*, 2009).

Por último, también existen interacciones comprobadas entre YY1 y otras de las proteínas interactuantes de HMGB1, determinadas por el sistema del doble híbrido, como la que ocurre con la proteína Fos. Ésta es una proteína oncogénica relacionada fundamentalmente con el cáncer de ovario donde desregula diversas proteínas pro-apoptóticas (Yin *et al.*, 2016), pero también parece desempeñar un papel en la proliferación de células tumorales en el cáncer de próstata (Ojea-Calvo *et al.*, 2004).

CONCLUSION

The use of the double hybrid system, Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System de Clontech®, in yeast, had detected the physical interaction of the human proteins HMGB1 and YY1, two proteins related with prostate cancer, so in order to confirm this interaction using a different technique, immunoprecipitation using protein lysates from the PC-3 tumor cell line, and anti-HMGB1 antibodies for immunoprecipitation and anti-YY1 antibodies for visualization were done. Unfortunately no positive results were obtained, which only indicates that the interaction cannot be verified by this technique in these conditions and this cell line.

CONCLUSIÓN

Mediante la utilización del sistema del doble híbrido Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System de Clontech®, en levaduras, se había detectado la interacción física de las proteínas humanas HMGB1 y YY1, dos proteínas relacionadas con el cáncer de próstata, por lo que se intentó confirmar dicha interacción mediante una técnica distinta, la inmunoprecipitación utilizando lisados proteicos de la línea celular tumoral PC-3, y anticuerpos anti-HMGB1 para la inmunoprecipitación y anticuerpos anti-YY1 para la visualización. Por desgracia no se obtuvieron resultados positivos, lo que únicamente indica que no se puede comprobar la interacción mediante esta técnica, en estas condiciones y esta línea celular.

CONCLUSIÓN

Mediante a utilización do sistema do dobre híbrido, Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System de Clontech®, en lévedas, detectárase a interacción física da proteína humanas HMGB1 e o factor transcripcional YY1, dúas proteínas relacionadas co cancro de próstata, polo que intentouse confirmar dicha interacción mediante unha técnica distinta, a inmunoprecipitación utilizando lisados proteicos la línea celular tumoral de próstata, PC-3, e anticorpos anti-HMGB1 para a inmunoprecipitación e anticorpos anti-YY1 para a visualización. Por desgracia, non se obtiveron resultados positivos, o que únicamente indica que non se pode comprobar a interacción mediante esta técnica, nestas condicións e nesta línea celular.

BIBLIOGRAFÍA

Alexandrova E.A. & Beltchev B.G. (1987). Differences between HMG1 proteins isolated from normal and tumour cells. *Biochimica et Biophysica ACTA* 915: 399-405.

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.

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.

Bradford, M.M. (1976). A dye binding assay for protein. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Deng Z., Wan M., Cao P., Rao A., Cramer A.D. & Sui G. (2009). Yin Yang 1 Regulates the transcriptional activity of androgen receptor. *Oncogene* 28: 3746-3757.

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.

Feijóo-Buján A. (2016). Análisis de las interacciones físicas de HMGB1 por el sistema del doble híbrido, Trabajo Fin de Grado, Biología, Universidade da Coruña.

Gnanasekar M., Kalyanasundaram R., Zheng G., Chen A., Bosland M.C. & Kajdacsy-Balla A. (2013). HMGB1: A promising therapeutic target of prostate cancer. *Prostate Cancer*. 1-8.

Hanahan D. & Weinberg R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-664.

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.

Kashyap V. & Bonavida B. (2014). Role of YY1 in the pathogenesis of prostate cancer and correlation with bioinformatics data sets of gene expression. *Genes & Cancer* 5: 71-83.

Krippner-Heidenreich A., Walsemann G., Beyrouthy M.J., Speckgens S., Kraft R., Thole H., Talanian R.V., Hurt M.M. & Lüsher B. (2005). Caspase-Dependent Regulation and Subcellular Redistribution of the Transcriptional Modulator YY1 during Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 25: 3704-3714.

Kuniyasu H., Chihara Y., Kondo H., Ohmori H. & Ukai R. (2003). Amphoterin induction in prostatic stromal cells by androgen deprivation with metastatic prostate cancer. *Oncology Reports* 10: 1863-1868.

Mendoza L. (2014). Cáncer de próstata: información actualizada sobre el cáncer de próstata y sobre las opciones terapéuticas, pp: 1-6. AuthorHouse, Bloomington.

Ojea-Calvo A., Mosteiro-Cerviño M.J, Domínguez-Freire F., Alonso-Rodrigo A., Rodríguez-Iglesias B., Benavente-Delgado J., Barros-Rodríguez J.M. & González-Piñeiro A. (2004). Factores pronósticos del cáncer de próstata: utilidad de la expresión del ki67 en las biopsias preoperatorias. *Urología* 57: 805-816.

Scalken J.A. & Van Leenders G. (2003). Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology. *Urology* 62: 11-20.

Seligson D., Horvath S., Huerta-Yepez S., Hanna S., Garbán H., Roberts A., Shi T., Liu X., Chia D., Goodglick L. & Bonavida B. (2005). Expression of transcription factor Yin Yang 1 in prostate cancer. *International Journal of Oncology*. 27: 131-141.

Takanishi C.L., Bykova E.A., Cheng W. & Zheng J. (2006). GFP-based FRET analysis in live cells. *Brain Research* 1091: 132-139.

Tang D., Kang R., Cheh C.W., Livesey K.M., Liang X., Schapiro N.E., Benschop R., Sparvero L.J., Amoscato A.A., Tracey K.J., Zeh H.J. & Lotze M.T. (2010). HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. *Oncogene* 29: 5299-5310.

Thomas J.O. & Travers A.A. (2001). HMG1 and 2, and related "architectural" DNA-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 26: 219.

Timms B.G. (2008). Prostate development: a historical perspective. *Differentiation* 76: 565-577.

Yin J.G., Liu X.Y., Wang B., Wang D.Y., Wei M., Fang H. & Xiang M. (2016). Gene expression profiling analysis of ovarian cancer. *Oncology Letters* 12: 405-412.

Zaravinos A. & Spandidos D.A. (2010). Yin Yang 1 expression in human tumors. *Cell Cycle* 9: 512-522.

Zhu W., Lossie A.C., Camper S.A. & Gumucio D.L. (1993). Chromosomal localization of the transcription factor YY1 in the mouse and human. *Mammalian Genome* 5: 234-236.

Zhu W., Olson S.Y. & Garbán H.J. (2011). Transcription regulator Yin-Yang 1: From silence to cancer. *Critical Reviews in Oncogenesis* 16: 227-2381.

ABREVIATURAS

µg: Microgramos

µl: Microlitro

AR: Receptor androgénico

BSA: Seroalbúmina bovina

cDNA: DNA complementario

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPBS: Tampón fosfato salino de Dubelcco

DTT: Ditiotreitól

FBS: Suero bovino fetal

FT: Eluído de la columna

H₂O_d: Agua destilada

HCl: Ácido clorhídrico

IP: Inmunoprecipitación

KDA: Kilodaltons

LB: Tampón de carga

M: Molar

mg: Miligramo

min: minuto

ml: Mililitro

Mm: Milimolar

NaCl₂: Cloruro de sodio

ng: Nanogramo

nm: Nanómetro

°C: Grados centígrados

PBS: Tampón fosfato salino

PSA: Antígeno prostático específico

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

rpm: Revoluciones por minuto

SDS: Sodiodecilsulfato

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano