

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA AVANZADA



TRABAJO FIN DE MÁSTER

ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE HAKAI Y LAS PROTEÍNAS HMGB EN LAS LÍNEAS CELULARES EPITELIALES DE COLON

ANÁLISE DA RELACIÓN ENTRE HAKAI E PROTEÍNAS HMGB NAS LIÑAS DE CÉLULAS EPITELIAIS DE COLON

ANALYSIS OF THE RELATION BETWEEN HAKAI AND HMGB PROTEINS IN COLON EPITHELIAL CELL LINES

Julio 2020

Manuela Isabel Sánchez Serrano





FACULDADE DE CIENCIAS

Instituto de Investigación Biomédica de Coruña (INIBIC)

ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE HAKAI Y LAS PROTEÍNAS HMGB EN LAS LÍNEAS CELULARES EPITELIALES DE COLON

ANÁLISE DA RELACIÓN ENTRE HAKAI E PROTEÍNAS HMGB NAS LIÑAS DE CÉLULAS EPITELIAIS DE COLON

ANALYSIS OF THE RELATION BETWEEN HAKAI AND HMGB PROTEINS IN COLON EPITHELIAL CELL LINES

Manuela Isabel Sánchez Serrano

A Coruña, Julio 2020

SANCHEZ
SERRANO
MANUELA ISABEL -
- 26513044R

Firmado digitalmente por
SANCHEZ SERRANO
MANUELA ISABEL -
26513044R
Fecha: 2020.07.03 09:39:04
+02'00'

Dra. Angélica Figueroa Conde-Valvis, en calidad de directora y tutora, autoriza la presentación del presente trabajo fin de máster ante el Tribunal Evaluador.

FIGUEROA
CONDE-VALVIS
ANGELICA -
52988974X

Firmado digitalmente
por FIGUEROA CONDE-
VALVIS ANGELICA -
52988974X
Fecha: 2020.07.03
11:34:30 +02'00'

AGRADECIMIENTOS

En este punto me gustaría agradecer a varias personas su apoyo durante la realización de este trabajo y que han hecho de esta etapa una gran experiencia.

En primer lugar, agradecer al el grupo de investigación de Plasticidad Epitelial y Metástasis del INIBIC, donde realicé el trabajo. Angélica por darme la oportunidad de investigar en un tema que me apasiona desde hace años. En especial quiero agradecer a Andrea, por facilitar tanto la integración en el instituto como por la ayuda en el desarrollo de los experimentos. Gracias también a Amanda por los consejos en las inmunoprecipitaciones y a Irene por aquella inolvidable tarde de febrero con la inmunofluorescencia, sin ti no habría sido posible terminarla.

A mis amigos del máster, por hacer de cada café entre clases el mejor momento de cada día, por compartir momentos de risas y agobios, por las noches de cervezas en cualquier sitio de Coruña y los debates de ciencia en cualquier momento. Gracias a Irene y Gonzalo por cada viaje, cada noche ya fuese de fiesta o de pizza y peli. Gracias a todos por hacer que Galicia sea parte de mí y un lugar al que volver siempre.

Gracias a mis amigos Daniel y Jessica, por aguantar todos mis momentos de agobio, charlas interminables sobre el TFM y aún más por los consejos que me habéis dado. También a Mario y Juan, por seguir siempre ahí, aunque no entendiéis nada de lo que os contaba y pensar que voy a descubrir la “cura del cáncer”. Fátima y Sandra, mis biólogas favoritas, gracias por seguir a pesar de que pasen los años. Gracias a Carlota, Lara, Sara y Mau por hacer de esas tardes de cuarentena algo divertido y distraerme de todo el agobio.

Sin lugar a dudas, dar las gracias a mi familia, mamá, papá, José, Antonio y Raquel, por vuestro amor y apoyo en la distancia y a quienes les dedico este trabajo. Gracias por apoyarme y permitirme estudiar lo que me apasiona sin poner barrera alguna, ya sea en Jaén, Bolonia o Coruña.

Por último, gracias a cada una de las decisiones que me han traído hasta aquí y a cada persona que haya aportado un granito de arena y me ha apoyado en ellas. Gracias a la Biología, por ser el comienzo de todo esto y mi pasión.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	1
3. INTRODUCCIÓN	2
3.1. Cáncer	2
3.2. Transición Epitelio-Mesénquima	5
3.3. Hakai	6
3.4. Proteínas HMGB	8
3.4.1. HMGB1	9
3.4.2. HMGB2	10
4. OBJETIVOS	11
5. MATERIALES Y MÉTODO	11
5.1. Líneas celulares	11
5.2. Medios de cultivo	12
5.3. Plásmidos	12
5.3.1. Plásmido control	12
5.3.2. Plásmido de sobreexpresión de Hakai	13
5.3.3. Plásmido de sobreexpresión de HMGB1	13
5.4. Amplificación bacteriana	13
5.4.1. Cepa y cultivo bacteriano	13
5.4.2. Transformación bacteriana	13
5.4.3. Extracción plasmídica	14
5.5. Transfección celular	14
5.5.1. Transfección para la sobreexpresión proteica	14
5.5.1.1. Ensayo de regulación proteica	15
5.5.1.2. Ensayo de cinética de sobreexpresión	15
5.6. Extracción y cuantificación de proteínas	15
5.7. Inmunoprecipitación	16
5.8. <i>Western Blot</i>	17
5.8.1. Preparación de las muestras	17
5.8.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida	17
5.8.3. Transferencia de proteínas a membrana de PVDF	18
5.8.4. Inmunodetección	18
5.9. Inmunofluorescencia	19
6. RESULTADOS	20
6.1. Expresión endógena de los niveles proteicos de Hakai y las proteínas HMGB en diferentes líneas epiteliales de CCR	20
6.2. Interacción entre Hakai y HMGB1 en las líneas celulares epiteliales de colon	22
6.3. Influencia de la expresión de HMGB1 sobre la expresión de Hakai	24
7. DISCUSIÓN	26
8. CONCLUSIÓN	28
9. BIBLIOGRAFÍA	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Niveles de expresión proteica de los controles de carga para las líneas epiteliales de CCR.....	20
Figura 2. Niveles de expresión de las proteínas E-cadherina, Hakai, Anexina A2, HMGB1 y HMGB2 en las líneas celulares de CCR.....	21
Figura 3. Valores relativos de las proteínas de interés en las diferentes líneas de CCR; (A) E-cadherina, (B) Hakai, (C) Anexina A2, (D) HMGB1 y (E) HMGB2.....	22
Figura 4. Inmunoprecipitación de Hakai y co-inmunoprecipitación de HMGB1, en la línea celular HCT116.....	22
Figura 5. Niveles de expresión de Hakai y HMGB1 en la línea celular HCT116 sometida a diferentes transfecciones.....	23
Figura 6. Niveles de expresión de las proteínas Hakai y HMGB1 en la línea HCT116 transfectada por Hakai (A) y HMGB1 (B).....	24
Figura 7. Inmunoprecipitación de Hakai y co-inmunoprecipitación de HMGB1 en la línea celular HCT116 transfectada por pHMGB1-GFP.....	24
Figura 8. Efecto de la sobreexpresión de Hakai y HMGB1 en la localización subcelular.....	25
Figura 9. Efecto de la sobreexpresión de HMGB1 en la localización subcelular en la línea transfectada con pHMGB1-GFP.....	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la matriz de inmunoprecipitación para una p100.....	16
Tabla 2. Composición de los geles de acrilamida mini.....	18

1. RESUMEN

Los carcinomas son los cánceres más comunes, se desarrollan por la transformación de células epiteliales en mesenquimales. La principal causa de muerte en los pacientes con cáncer se debe a las metástasis. Esta tiene lugar cuando el tumor primario alcanza lugares distantes en el organismo y origina tumores secundarios. En la evolución del tumor interviene el programa de transición epitelio-mesénquima (EMT) en el que las células epiteliales pierden características fenotípicas, como las uniones entre células y con la matriz extracelular y la polaridad celular, y adquieren otras nuevas, como el aumento de la proliferación, la movilidad y la invasión celular. Los tumores son tejidos complejos, especialmente en el cáncer de colon debido a su elevada heterogeneidad, y se encuentran influenciados por el microambiente tumoral en el que se desarrollan. Hakai es una proteína incrementada en cáncer de colon y está implicada en el programa EMT porque reduce la adhesión celular y aumenta la invasividad y participa en la regulación de la migración celular. Las proteínas HMGB (*High Mobility Group Box*) son proteínas de cromatina no histónicas que actúan sobre el ADN y que se encuentran sobreexpresadas en muchos tipos de cáncer. HMGB1 y HMGB2 se han asociado con los principales signos del cáncer como la progresión tumoral y la formación de metástasis. En un estudio proteómico se demostró que las proteínas HMGB se encuentran incrementadas al sobreexpresar Hakai y existen evidencias que relacionan estas proteínas con la resistencia a fármacos. El objetivo general es determinar la posible implicación de las proteínas HMGB y Hakai sobre la progresión tumoral en cáncer de colon.

Palabras clave: cáncer, cáncer colorrectal, Hakai, proteínas HMGB, HMGB1, HMGB2.

2. ABSTRACT

Carcinomas are the most common cancer; they are developed by the transformation of epithelial cells into mesenchymal. The main cause of death in cancer patients is due to metastasis. This occurs when primary tumor reaches distant places in the organism and causes secondary tumors. The epithelial-mesenchymal transition program (EMT) intervenes in the evolution of the tumor, in which epithelial cells lose phenotypic characteristics, such as the connections between cells with the extracellular matrix and cell polarity, and acquire new ones, such as increased proliferation, mobility and cell invasion. Tumors are complex tissues, especially in colon cancer due to their high heterogeneity, and are influenced by the tumoral microenvironment in which they develop. Hakai is a protein

that is increased in colon cancer and is involved in the EMT program because it reduces cell adhesion and increases invasiveness and participates in the regulation of cell migration. HMGB proteins (High Mobility Group Box) are non-histonic chromatin proteins that act on DNA and they are overexpressed in many types of cancer. HMGB1 and HMGB2 have been associated with the main signs of cancer such as tumor progression and metastasis formation. In a proteomic study, HMGB proteins were shown to be increased by overexpressing Hakai, and there is evidence linking these proteins to drug resistance. The general objective is to determine the possible involvement of the HMGB and Hakai proteins on tumor progression in colon cancer.

Key words: cancer, colorectal cancer, Hakai, HMGB proteins, HMGB1, HMGB2.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Cáncer

Los carcinomas son los tipos de cáncer más comunes, se desarrollan por la transformación de células epiteliales en mesenquimales. Es decir, experimentan una transformación hacia células tumorales. Aproximadamente el 90% de las muertes relacionadas con el cáncer se deben a la metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000; Berman, 2004; Castosa et al., 2018).

En Hanahan y Weinberg (2000), se propuso un modelo para definir las seis propiedades que adquiere un tumor durante su desarrollo. Estos son: capacidad replicativa ilimitada, capacidad de desarrollar vasos sanguíneos (angiogénesis), evasión de la muerte celular programada (apoptosis), autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a los inhibidores del crecimiento e invasión y metástasis de los tejidos. La evidencia creciente sugiere que la inflamación es la séptima característica (Vakkila y Lotze, 2004; Mantovani et al., 2008; Mantovani, 2009). La propiedad más destacable es la proliferación ilimitada por eludir los mecanismos homeostáticos existentes, que establecen un determinado número de ciclos y, posteriormente, la muerte celular (Hanahan y Weinberg, 2011).

Estas propiedades permiten una fácil comprensión de cómo evolucionan los carcinomas, desde la invasión celular hasta la metástasis, proceso denominado “cascada de invasión-metástasis” (Fidler, 2003; Talmadge y Fidler, 2010). Se produce una invasión local en zona epitelial (tumor); se consideran malignos cuando son capaces de romper la membrana basal, invadir el estroma y metastatizar. Este se denomina el tumor original o primario (Lopez-Otin y Matrisian, 2007). Para el desarrollo de este, se origina una red de vasos

linfáticos (linfangiogénesis) y sanguíneos (angiogénesis), lo que permite la diseminación de las células tumorales al entrar en ambos sistemas circulatorios (Pezzella et al., 2015). Se podría producir una extravasación de estas células cancerosas e instaurarse en otra localización, formando pequeños nódulos celulares (micrometástasis) (Hanahan y Weinberg, 2011). Estas micrometástasis pueden crecer y desarrollar macrometástasis, lo que se traduce en la colonización del tejido y formación de un tumor secundario (van Zijl et al., 2011). La probabilidad de completar toda la evolución es muy baja, siendo el paso menos eficiente la colonización (Reymond et al., 2013). Una vez se desarrolla la colonización, las células metastásicas pueden diseminarse desde ese tumor secundario a nuevas localizaciones o retornar al tumor primario (Hanahan y Weinberg, 2011).

Los tumores son tejidos complejos, compuestos por diferentes tipos de celulares que interactúan entre sí; se incluyen también las células normales, que forman el estroma del tumor. Los tumores no se comprenden únicamente con la descripción de las células cancerosas que incluye, sino que hay un microambiente tumoral en el que se desarrolla. La constitución y las interacciones de señalización del microambiente tumoral son cruciales para los fenotipos del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011)

De acuerdo con los datos del proyecto GLOBOCAN (2018), el cáncer colorrectal (CCR) es el tercer cáncer con mayor incidencia (casi 1,850.000 nuevos casos) y el segundo con mayor mortalidad en el mundo, representando más de 880.000 muertes en 2018, siendo el 54.9% hombres (Bray et al., 2018). La principal causa de mortalidad en pacientes con CCR, al igual que en otros tumores sólidos, son las metástasis (Testa et al., 2018). El órgano más frecuente de diseminación del cáncer de colon es el hígado (Molinari et al., 2018) y en el cáncer rectal, los pulmones (Testa et al., 2018).

El origen del cáncer se puede ser diverso, la mayoría (85%) de los CCR son esporádicos, un 20-30% se debe a componentes hereditarios (Dunlop et al., 2012; Whiffin et al., 2014) y un pequeño porcentaje (1-2%) son consecuencia de enfermedades inflamatorias intestinales (Munkholm, 2003). El CCR presenta una alta heterogeneidad entre pacientes y a nivel intratumoral (Grady y Carethers, 2008; Vogelstein et al., 2013; McGranahan y Swanton, 2017) y no se limita a la genética, sino que también se manifiesta en los cambios epigenéticos y el microambiente tumoral (Blank et al., 2018). Esto supone un problema para adoptar un tratamiento farmacológico (Molinari et al., 2018, Testa et al., 2018).

Una característica importante es la inestabilidad genómica que puede surgir, al menos, por tres mecanismos. El más común se debe a la inestabilidad cromosómica, cambios importantes en número y estructura (Poulogiannis et *al.*, 2010). Otro mecanismo es consecuencia de la hipermutación de las islas CpG (presentes normalmente en algunas regiones promotoras) por metilación, lo que provoca la inactivación transcripcional de genes supresores de tumores (Ogino y Goel, 2008, Testa et *al.*, 2018). Y, por último, la inestabilidad de microsatélites (microARN o ARNm) como consecuencia de la reparación defectuosa y falta de coincidencia de ADN (Arends, 2013). Los microARN son pequeñas moléculas de ARN monocatenario no codificante, de 21-25 nucleótidos, que regulan de forma negativa la expresión génica a nivel postranscripcional. Se dirigen a las regiones 3'-UTR, no traducidas, del ARN mensajero (ARNm) de forma que inducen su degradación o represión de traducción (Bartel, 2004). La expresión anormal de microARN tiene un papel crítico en el inicio y progresión de varios tipos de cáncer (Calin y Croce, 2006). La evidencia acumulada ha demostrado su importancia en la resistencia a múltiples fármacos de varios tipos de cáncer (Chen, 2005; Zhu et *al.*, 2011; Sun et *al.*, 2012).

También hay evidencia de que factores exógenos, como el estilo de vida o el medio ambiente, y el microbioma contribuyen a la patogénesis, las células no neoplásicas y a una mayor heterogeneidad (Bramsen et *al.*, 2017; Ogino et *al.*, 2018). Respecto al microbioma, su riqueza y composición se cree que tiene un papel importante en la formación del CCR en función de dónde se localice el tumor primario. Existen diferencias moleculares y fenotípicas dependiendo de la localización tumoral, según se encuentren en el lado izquierdo (tumor distal) o derecho (tumor proximal); presentan diferentes perfiles de expresión génica y de mutación (Stintzing et *al.*, 2017). Algunos estudios proponen que se consideren como entidades diferentes debido a estas diferencias (Testa et *al.*, 2018).

Los tumores con inestabilidad cromosómica surgen como consecuencia de una combinación de activación oncogénica e inactivación del gen supresor tumoral. Esto va acompañado de cambios en las características del tumor en el carcinoma, denominado secuencia de carcinoma (Fearon y Vogelstein, 1990). Un evento temprano en esta ruta, por ejemplo, es la hiperactivación de la ruta de señalización de *Wnt*, que tiene un papel crucial en el mantenimiento, proliferación y diferenciación de las células madres intestinales (Testa et *al.*, 2018). Las anomalías de la vía *Wnt* caracterizan a la mayoría de los cánceres colorrectales esporádicos (Frayling y Arends, 2013). Se estima que alrededor del 10-20%

de los carcinomas pueden desarrollarse a través de una secuencia diferente de cambios morfológicos, conocida como la vía “dentada” (Müller et al., 2016).

3.2. Transición Epitelio-Mesénquima

En las primeras etapas de la progresión tumoral y la metástasis de carcinoma, las células tumorales activan un programa esencial para llevar a cabo la transición de epitelial a mesénquimal (TEM o EMT), se observa frecuentemente en carcinoma humano (Nieto, 2013). Los datos sugieren su participación en las primeras etapas de la tumorigénesis al actuar sobre la migración y, también, está involucrado en la progresión maligna del cáncer de colon humano (Figueroa et al., 2009a). La EMT es un proceso muy controlado, tiene lugar durante la embriogénesis, la curación y la reparación de tejidos; estos constituyen los procesos EMT fisiológicos. Sin embargo, puede ocurrir durante afecciones patológicas, como la fibrosis orgánica y progresión tumoral (Castosa et al., 2018).

Las células epiteliales están polarizadas y conectadas entre sí a través de adhesiones entre las células, formando láminas de células estructuradas que restringen su movimiento en el epitelio. También están unidas al sustrato de la matriz extracelular, lo que es esencial para su diferenciación y polarización (Harris y Tepass, 2010). La EMT en cáncer se caracteriza por interrumpir estos contactos, la pérdida de la polaridad y, además, tiene lugar una reorganización del citoesqueleto (Nieto, 2013; Aparicio et al., 2015; Ye y Weinberg, 2015). Dicha interrupción se asocia con la transición de adenoma a carcinoma, debido a la pérdida de la proteína de membrana, E-cadherina (E-cad), que es esencial para su formación. Por otro lado, en esta transición se adquieren nuevas características propias del fenotipo mesenquimal como el aumento de la proliferación, la movilidad y la invasión celular (Birchmeier y Behrens, 1994, Pérez-Moreno et al., 2003; Cavallaro y Christofori, 2004; Gumbiner, 2005; Chaffer y Weinberg, 2011).

Por tanto, la pérdida funcional de E-cad en las uniones adherentes, pudiendo ser parcial o completa (Birchmeier y Behrens, 1994; Hanahan y Weinberg, 2000), es un sello molecular crítico de la EMT. Es un supresor tumoral y se considera un predictor clínico de mal pronóstico en muchos tipos de cáncer (Umbas et al., 1994; Tsanou et al., 2008; Li et al., 2016). En paralelo, también se adquieren marcadores mesenquimales, como la N-cadherina (N-cad). Es un marcador mesenquimal que se regula positivamente durante la EMT, considerándose también un sello distintivo de la EMT en cáncer (Hazan et al., 2004). La adquisición del fenotipo móvil invasivo es crucial en el desarrollo de tumores malignos y

la formación de metástasis, concretamente en el desprendimiento de las células tumorales del tumor primario y la migración (Hanahan y Weinberg, 2000).

El programa EMT se puede activar de forma transitoria o estable y, a su vez, en diferentes grados durante el curso de la invasión y la metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011). El programa es inducido por la acción de diferentes señales en el microambiente tumoral, por lo que existe la posibilidad de reversibilidad. En ausencia de esta exposición continua, una vez se producen las micrometástasis, las células pueden someterse al programa inverso, la transición mesénquima-epitelio (TME o MET) (Hugo et al., 2007).

3.3.Hakai

En Fujita et al. (2002), se descubrió la proteína E3 ubiquitina-ligasa Hakai. Se trata de una proteína formada por 106-206 aminoácidos y presenta 3 dominios: dominio RING, una secuencia corta de reconocimiento pTyr y un dominio rico en prolina. El dominio RING es el único similar, estructuralmente, a los dominios RING de otras proteínas. Posee un dominio Zn-Finger (ZnF) atípico dentro de la región pTyr, con un nuevo pliegue estructural cuya formación requiere de residuos de aminoácidos de 2 monómeros de Hakai entrelazados, antiparalelos. La dimerización de Hakai, a través del dominio ZnF atípico y el dominio RING, genera un nuevo dominio de unión a pTyr, el dominio HYB (Mukherjee et al., 2012). Tiene forma de bolsa altamente cargada lo que lo convierte un objetivo farmacológico muy adecuado. Es frecuente la asociación de E3 ubiquitina-ligasas disfuncionales con enfermedades; por lo que, también es un objetivo para terapias dirigidas (Burger et al., 2006; Lohr et al., 2010). El dominio HYB es necesario para la actividad E3 ubiquitina-ligasa, que actúa sobre la progresión (Castosa et al., 2018; Martínez-Iglesias et al., 2020).

Hakai primero fue descrita como una E3 ubiquitina-ligasa de tipo RING-finger para el complejo de E-cad (Fujita, et al., 2002). Hakai se une al dominio citoplasmático de E-cad; el dominio HYB de Hakai interactúa con E-cad fosforilada en tirosina por la quinasa Src. Se induce así la ubiquitinación y degradación y, por tanto, la alteración de los contactos celulares (Vleminckx, et al., 1991; Fujita et al., 2002; Palacios et al., 2005; Shen et al., 2007; Bonazzi et al., 2008; Mukherjee et al., 2012; Cooper et al., 2015). Esta interrupción introduciría al programa EMT (Perez-Moreno et al., 2003; Wheelock y Johnson, 2003). La ubiquitinación señala, frecuentemente, para la degradación de proteínas en el sistema de la ruta del lisosoma o del proteosoma (Hunter, 2007). Esta actividad es la mejor

caracterizada de las interacciones conocidas de Hakai (Fujita et al., 2002). Se demostró que E-cad está regulada negativamente a nivel post-traducciona l en las fases iniciales, mientras que la pérdida de E-cad a través de la represión transcripcional es un evento tardío durante la EMT (Janda et al., 2006). Por lo tanto, Hakai es el primer regulador post-traducciona l descrito para la estabilidad de E-cad (Fujita et al., 2002).

Recientemente se ha observado que Hakai también podría actuar como E3 ubiquitina-ligasa para Anexina A2 (Díaz-Díaz et al., 2020), fosforilada por Src (Stebbins et al., 1997). Anexina A2 está implicada, entre otras funciones, en la formación de los citoesqueletos de membrana y en los contactos celulares (Hayes y Moss, 2009). Está relacionada con el proceso tumoral porque tiene un papel importante en la proliferación tumoral, invasión y metástasis; considerándose un factor de mal pronóstico (Zhang et al., 2009a; Wang y Lin, 2014; Han et al., 2017). Existen datos controvertidos sobre el papel de Anexina A2 en cáncer, ya que en algunos tumores se observa que su expresión disminuye en cáncer mientras que en otros se sobreexpresa, incluido el cáncer colorrectal (Duncan et al., 2008; Yang et al., 2013).

Los datos sugieren que Hakai está implicado en el control de varios procesos celulares importantes cruciales en la progresión del tumor (Rodríguez-Rigueiro et al., 2011a). Hakai se incrementa en el colon humano y adenocarcinoma gástrico, en comparación con el tejido epitelial adyacente (Figuroa et al., 2009a; Rodríguez-Rigueiro et al., 2011b; Abella et al., 2012). En cáncer de colon, la expresión de Hakai aumenta gradualmente a medida que evoluciona el tumor (Castosa et al., 2018), de forma que reduce la adhesión celular e incrementa la invasividad (Rodríguez-Rigueiro et al., 2011a). Hakai, también denominado CBLL1 (gen *Cbl proto-oncogene like 1*) (Frame et al., 2002), exhibe un potencial oncogénico (Figuroa et al., 2009a) y se podría utilizar como (bio)marcador potencial durante la progresión del cáncer de colon, aunque son necesarios más estudios que lo confirmen (Castosa et al., 2018). Además de esta regulación en la adhesión celular, Hakai participa en la regulación de la migración celular y la embriogénesis (Figuroa et al., 2009a; Kaido et al., 2009; Gong et al., 2010).

Se presenta de forma ubicua en los tejidos (Fujita et al., 2002). Muchas E3 ubiquitina-ligasas tienen múltiples sustratos para ubiquitinación (Maniatis, 1999; Shenoy et al., 2001; Mantovani y Banks, 2003; Li et al., 2004); esto se podría traducir en la posibilidad de coordinar e interconectar procesos celulares que son, aparentemente, diferentes (Figuroa

et *al.*, 2009a). Entre ellos se encuentra la cortactina, que participa en la reorganización del citoesqueleto de actina, y DOK1, que se une a un inhibidor del oncogén Ras (Mukherjee et *al.*, 2012). Se localiza en núcleo y citoplasma, lo que indica posibles roles funcionales en múltiples ubicaciones celulares. Es por ello que, además de las funciones dependientes de ubiquitina, se ha propuesto la posible involucración en varios procesos celulares con acción independiente (Figuroa et *al.*, 2009a; Figuroa et *al.*, 2009b; Gong, et *al.*, 2010; Aparicio, et *al.*, 2012; Díaz-Díaz, et *al.*, 2017; Díaz-Díaz, et *al.*, 2020). De hecho, Hakai controla la proliferación de una manera dependiente de E-cad e independiente (Abella et *al.*, 2012; Horiuchi et *al.*, 2013).

3.4. Proteínas HMGB

La familia de proteínas del grupo de alta movilidad (HMGB) está formada por HMGB1, HMGB2, HMGB3 y HMGB4. El miembro más abundante y extendido es HMGB1 (Stros, 2010). HMGB2 y HMGB3 se expresan ampliamente en embriones, su patrón de expresión en el adultos es más restringido (Müller et *al.*, 2001). Son proteínas de cromatina no histónicas, de bajo peso molecular y solubles en ácido. Son proteínas ubicuas en las células eucariotas y se unen de forma específica al ADN, induciendo curvas de ADN de gran ángulo, mejorando la flexibilidad del ADN y, probablemente, facilitando numerosas interacciones biológicas (Thomas y Travers, 2001; Hock et *al.*, 2007; Zhang et *al.*, 2009b; Wang et *al.*, 2012; Lotze y Tracey, 2005). Es decir, las proteínas HMGB desenrollan el ADN (Javaherian et *al.*, 1979), facilitan su transcripción (Singh y Dixon, 1990) y se unen al ADN superenrollado (Sheflin et *al.*, 1993). También se cree que juegan un papel importante en la estructura y función de la proteína (Bustin et *al.*, 1990).

Participan en otras funciones extranucleares y como alarmas extracelulares (Barreiro-Alonso et *al.*, 2016), esto explica que se localicen en el núcleo, el citoplasma y que se secreten al medio extracelular tras la secreción activa de las células inmunes o la liberación pasiva de células necróticas (Tang et *al.*, 2010). Además, están altamente conservadas en organismos eucariotas (Bustin et *al.*, 1990). Las proteínas HMGB son de crucial importancia en la regulación de muchos genes que responden al estrógeno al mejorar la unión de los receptores y la transcripción (Joshi et *al.*, 2011). Estas interacciones activan o reprimen la transcripción en función de sus factores asociados; de manera que las proteínas HMGB tienen diferentes funciones en la regulación transcripcional dependiendo del tipo celular o tejido (Cámara-Quílez et *al.*, 2020). Las proteínas HMGB se sobreexpresan en

muchos tipos de cáncer (Barreiro-Alonso *et al.*, 2016) y participan en la biología de las células madre y la reprogramación celular (Abraham *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2017).

HMGB1 y HMGB2, además de ser las proteínas más abundantes de la familia, están estrechamente relacionadas evolutivamente (Bustin *et al.*, 1990), comparten más del 80% de homología de secuencia (Barreiro-Alonso *et al.*, 2016). Contienen 2 dominios de unión al DNA conocidos como “cajas” (HMG-Box), que consiste en dominios básicos de, aproximadamente, 80 aminoácidos (Bianchi *et al.*, 1992). Su sobreexpresión se ha asociado a los principales signos de cáncer, como progresión tumoral, formación de metástasis y un mal pronóstico (Lange y Vasquez, 2009). Se supone dicha sobreexpresión provoca el aumento de la inestabilidad genómica y el transporte hacia el citoplasma. Permitiendo evitar la apoptosis y aumentar la autofagia y colaborando con la supervivencia y la capacidad proliferativa de las células malignas. Por tanto, las proteínas HMGB son importantes dianas en la búsqueda de terapias contra el cáncer y tratamientos regenerativos (Cámara-Quílez *et al.*, 2020).

3.4.1. HMGB1

La proteína HMGB1 primero fue denominada “anfoterina” debido a que tiene una carga bipolar única. Su gen codifica para una única proteína de 214 aminoácidos y tiene un peso molecular de 25kDa, aproximadamente. Consta de 2 dominios *box* homólogos (A y B), bastante rígidos y básicos en forma de L, una cola C-terminal que contiene 30 residuos de glutámico y aspártico (Glu/Asp) repetidos y la región de unión, de unos 20 aminoácidos (Merenmies *et al.*, 1991; Thomas y Travers, 2001; Kang *et al.*, 2014; Barreiro-Alonso *et al.*, 2016). Es una proteína esencial para la vida (Calogero *et al.*, 1999).

Las funciones de esta proteína son diversas dependiendo de la ubicación, los sustratos de unión molecular y los estados redox de la propia proteína (Andersson *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2016); concretamente, los estados redox de 3 residuos de cisteínas dentro de la proteína (posiciones 23, 45 y 106) (Venerau *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012). HMGB1 se modifica post-traduccionalmente y puede hacerlo por acetilación, fosforilación, glucosilación, metilación y oxidación (Lotze y Tracey, 2005; Müller *et al.*, 2001; Alexandrova y Beltchev, 1987). Las dos primeras inducen la translocación del núcleo al citoplasma, aumentando la secreción de HMGB1 de los macrófagos y las células del cáncer de colon (Scaffidi *et al.*, 2002; Bonaldi *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2009).

HMGB1 es una molécula de señalización extracelular durante la inflamación, la diferenciación celular, la migración celular y la metástasis tumoral (Lotze y Tracey, 2005; Müller *et al.*, 2001; Dong, *et al.*, 2007; Ellerman *et al.*, 2007). HMGB1 es un factor promotor de tumores liberado de las células cancerosas, se considera la posibilidad de que induzca vías de inmunosupresión (Zhang *et al.*, 2018). Su sobreexpresión se asocia con todas las características centrales del cáncer; es un componente importante del microambiente tumoral desordenado (Tang *et al.*, 2010). Se sabe que la sobreexpresión se asocia con un peor pronóstico en pacientes con cáncer (Wu *et al.*, 2013) y se ha descrito como un nuevo marcador pronóstico y posible objetivo terapéutico en una variedad de cánceres humanos (He *et al.*, 2000; Nagatani *et al.*, 2001; Balasubramani *et al.*, 2006; Pardo *et al.*, 2006; Maeda *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2010). Hay estudios que muestran que el silenciamiento de HMGB1 es una estrategia terapéutica bien confirmada y prometedora; la problemática está en controlar los efectos negativos ya que HMGB2 no puede sustituir el déficit (Cámara-Quílez *et al.*, 2020).

3.4.2. HMGB2

HMGB2 tiene 2 dominios, uno dominio básico *box*, con 182 residuos de aminoácidos en el extremo NH₂ y otro dominio de elevada carga ácida en el extremo COOH-terminal, que constituye el 12% restante de la proteína (Bustin *et al.*, 1990; Majumdar *et al.*, 1991; Shirakawa y Yoshida, 1992) y contiene 22 residuos Glu/Asp (Barreiro-Alonso *et al.*, 2016). Como miembro de la familia de proteínas HMGB, HMGB2 actúa sobre el ADN pero se conoce mucho menos de la función biológica en comparación con la información disponible para HMGB1. HMGB2 también es liberado al espacio extracelular bajo diversas condiciones inflamatorias y se une a receptores como el receptor para productos finales de glicación avanzada (Yamoah *et al.*, 2008; Pusterla *et al.*, 2009).

Debido a la elevada homología de HMGB2 con HMGB1, podría tener efectos similares respecto al desarrollo del cáncer. La expresión de HMGB2 se ha relacionado con la respuesta contra agentes quimioterapéuticos (Varma *et al.*, 2005; Krynetskaia *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009). Esto sugiere que la sobreexpresión promueve la resistencia a los medicamentos en cáncer (An *et al.*, 2015), como ya ocurre en glioblastoma y cáncer hepatocelular (Wu *et al.*, 2013; Kwon *et al.*, 2010). En Shin *et al.* (2013), se demuestra que HMGB2 protege a las células del daño del ADN y que su déficit sensibiliza a las células de CCR a la radiación. Su expresión tiene importancia pronóstica en carcinoma hepatocelular

(Kwon et *al.*, 2010), células escamosas de la piel (Sharma et *al.*, 2008) y cáncer epitelial de ovario (Ouellet et *al.*, 2006).

En un estudio proteómico se identifica la regulación de HMGB2 cuando Hakai se sobreexpresa (Díaz-Díaz et *al.*, 2017), esto sugiere que Hakai podría interactuar con HMGB1 y/o HMGB2, por la elevada homología entre ambas proteínas HMGB. Tanto Hakai como HMGB1 se encuentran sobreexpresadas en cáncer y presentan un potencial inmunosupresor, además de la importancia del control en la expresión génica de HMGB1. Dado el papel de Hakai en la tumorigénesis y el papel de las proteínas HMGB en el cáncer, este trabajo tiene por objetivo estudiar ambas proteínas y su posible interacción.

4. OBJETIVOS

1. Analizar la posible interacción entre Hakai y las proteínas HMGB en líneas epiteliales de colon.
2. Determinar la expresión endógena de Hakai y las proteínas HMGB en diferentes líneas de cáncer de colon.
3. Estudiar la posible influencia de la expresión de HMGB sobre la expresión de Hakai.

5. MATERIALES Y MÉTODO

5.1. Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo proceden de cáncer de colon humano: DLD-1 (CCL-221), HCT116 (CCL-247), HT-29 (HTB-38), LoVo (CCL-229), SW480 (CCL-228), SW620 (CCL-221) y T84 (CCL-248), obtenidas de ATCC (*American Type Culture Collection*). Todas las líneas celulares proceden de tejido de colon y presentan una morfología adherente epitelial.

Estas líneas se pueden dividir por su origen, siendo SW480, HT-29 y HCT116 líneas procedentes de tumores primarios y LoVo, SW620 y T84, líneas derivadas de metástasis. O por la evolución de la enfermedad, dividiéndose en adenocarcinoma (SW480, DLD-1, SW620, LoVo y HT-29) y carcinoma (HCT116 y T84). Estas diferencias se reflejan en la clasificación de Dukes, que permite establecer grados en el progreso del tumor. Se sabe que SW480 es grado B; SW620, grado C (Leidovitz et *al.*, 1976); y DLD-1, grado C (Dexter et *al.*, 1977). Para las líneas HT-29 y HCT116 no se especifican grados, pero se situarían entre grado C y D según la progresión del tumor.

Las líneas celulares, al proceder de viales congelados, se sometieron a un proceso de cuarentena y testado por la posible presencia de *Mycoplasma* en el interior celular. Se realizó mediante PCR en el equipo Primus 96^{plus} de MWG AG BIOTECH; las muestras se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando SYBR® *Safe DNA gene* de Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific), NZYDNA *Ladder VII* de Nzytech y el tampón de carga G7654-5ML de Sigma-Aldrich. Los resultados se revelaron por ultravioleta en el equipo Amersham Imager 600 de GE Healthcare.

5.2. Medios de cultivo

Se utilizaron 4 medios de cultivo diferentes para el cultivo celular, todos ellos obtenidos de Gibco (Thermo Fisher Scientific). Las líneas celulares HCT116 y HT-29 se cultivaron con McCoy's (*McCoy's 5A (Modified) Medium* (1X)); DLD-1, SW480 y SW620, con DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*); LoVo, con F-12 (*Ham's F-12 Nutrient Mixture*); y la línea T84, con DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*). Todos se suplementaron con FBS (Suero Bovino Fetal), proporcionado por Gibco; siendo al 5% para DMEM/F-12 y al 10% para McCoy's, DMEM y F-12. También se suplementaron al 1% con penicilina/estreptomicina. Las líneas celulares se manipularon en condiciones estériles en el interior de una cabina de flujo laminar vertical, concretamente la cabina PV-100 de TELSTAR. Se mantuvieron en el interior de un incubador, el equipo con el que se trabajó fue MCO-17AI de SANYO; a 37°C, con una humedad relativa de 95% y una presión parcial de CO₂ del 5%.

Para la transfección celular se utilizó medio Opti-MEM de Gibco. Es un medio de cultivo bajo en nutrientes ideal para utilizar en las transfecciones; muy recomendado para la transfección con lipofectamina, se utilizó Lipofectamine® de Invitrogen.

5.3. Plásmidos

5.3.1. Plásmido control

Es un plásmido que tiene la misma cantidad de información que los plásmidos de sobreexpresión pero no es funcional. No altera la expresión proteica, actúa como control de transfección. Se emplea el plásmido 3.1 PCDNA de Thermo Fisher Scientific, en adelante p3.1. Incluye genes de resistencia a ampicilina y geneticina, procariontes y eucariotas respectivamente. La concentración del vial utilizado para la amplificación era 926 ng/μL.

5.3.2. Plásmido de sobreexpresión de Hakai

Plásmido que permite la sobreexpresión de la proteína Hakai (pFlag-Hakai), cedido por el Dr. Fujita. Posee una etiqueta (*tag*), la proteína Flag. También presenta gen de resistencia a geneticina para eucariotas y ampicilina, para procariotas. La concentración del vial utilizado para la amplificación era 2398 ng/μL.

5.3.3. Plásmido de sobreexpresión de HMGB1

Se trata de un plásmido que permite la sobreexpresión de la proteína HMGB1 (pHMGB1-GFP) fue cedido por el grupo de investigación EXPRELA de la Dra. Esperanza Cerdán. Posee un marcador fluorescente, GFP (*Green Fluorescence Protein*). La sobreexpresión se desdobra en HMGB1 y HMGB1-GFP, pues el peso molecular es mayor en la última. Presenta resistencia a dos antibióticos, kanamicina para procariotas y geneticina para eucariotas. El vial utilizado para la amplificación tenía una concentración de 743 ng/μL.

5.4. Amplificación bacteriana

5.4.1. Cepa y cultivo bacteriano

Para la amplificación de los plásmidos es necesario transformar bacterias previamente. Se trabajó con una cepa competente de *Escherichia coli*, *One Shot MAX efficiency DH5α-T1^R competent cells* (en adelante, DH5α) de Invitrogen. Se comercializan en viales de 1mL, perfectos para cada transformación.

El medio utilizado para el crecimiento en placa de DH5α transfectada fue LBA (Luria-Bertani Agar). Y para el crecimiento para la amplificación plasmídica se utilizó LB (ausencia de agar), se debe trabajar con medio líquido para realizar el correspondiente protocolo de extracción plasmídica. El crecimiento se llevó a cabo a 37°C en estufa en condiciones aerobias, el equipo utilizado fue UM 500 de la casa comercial Memmert. Los medios se suplementaron con los antibióticos, citados en 5.3, para la selección bacteriana.

5.4.2. Transformación bacteriana

Se trabajó en condiciones de esterilidad bajo la llama del mechero Bunsen. A cada vial de DH5α se le añadió el plásmido de interés (p3.1, pFlag-Hakai y pHMGB1-GFP), 1μL. Se dejó 30 minutos a 4°C para la integración y se llevó al termobloque, *Thermoleader dry block heat bath* de UniEquip, a 42°C durante 30 segundos. Posteriormente, se dejó a 4°C durante 2 minutos, y se añadió 250μL de medio LB y se dejó durante 1 hora en el

termobloque de agitación, *Thermomixer confort* de Eppendorf, a 300rpm, a 37°C. Finalmente, se realizó la siembra en placa, cada una con el antibiótico de resistencia correspondiente. Se incubó a 37°C en estufa, durante 24h aproximadamente. Las colonias obtenidas son las que han integrado el plásmido.

5.4.3. Extracción plasmídica

De las colonias transfectadas obtenidas, se seleccionó la de mayor tamaño. Se incubó en medio LB *overnight* (~16h) a 37°C en agitación, la estufa utilizada fue el incubador con agitador orbital de Lan Technics. De esta colonia se obtuvo los clones para la amplificación, todos ellos idénticos.

Para la extracción plasmídica se utilizó el QIAprep® *Spin Miniprep Kit* de QIAGEN, es un *kit* que permite la obtención de DNA plasmídico altamente purificado en poco tiempo. Tras la incubación *overnight*, se centrifugó para eliminar el medio de cultivo a 4500rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, para precipitar las bacterias. Se eliminó el sobrenadante y se siguieron los pasos indicados en el protocolo incluido en el *kit*. El producto final fue una elución que contenía una determinada cantidad de material plasmídico. Este se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop™ 2000 proporcionado por Thermo Fisher Scientific.

5.5. Transfección celular

De las líneas utilizadas en el presente trabajo, según especifica la casa comercial ATCC, las más óptimas para realizar transfecciones son: HCT116, HT-29 y SW620. Se seleccionó la línea celular HCT116 por su rápido crecimiento, lo que permite realizar mayor número de pruebas en un menor tiempo.

5.5.1. Transfección para la sobreexpresión proteica

Se sembraron 250.000 células para cada condición establecida y la transfección se llevó a cabo cuando estuvieron al 60-80% de confluencia. Se utilizó el medio Opti-MEM; primero se incubó la lipofectamina (1:2) y los plásmidos, por separado durante 5 minutos, y luego se mezclaron (resuspendiendo lentamente) y se incubaron 20 minutos.

Por otro lado, las células se lavaron con solución salina isotónica para retirar el medio de cultivo, se les añadió medio Opti-MEM y la mezcla de transfección. La incubación en este caso fue de 5 horas. Finalmente, se retiró el medio de transfección y se añadió DMEM.

Tras 72h de cultivo se recogieron las células. Este mismo proceso se siguió en los diferentes ensayos realizados.

5.5.1.1. Ensayo de regulación proteica

Se utilizaron los plásmidos pFlag-Hakai y pHMGB1-GFP de forma simultánea para estudiar la posible regulación entre las proteínas. Se estableció una cantidad total de 2µg de plásmido en condición, considerando como control 2µg de p3.1. Se establecieron 5 puntos de transfección: igual cantidad de los plásmidos, mayor cantidad de uno que de otro (para ambos) y un punto para la sobreexpresión de un único plásmido, en ambos.

5.5.1.2. Ensayo de cinética de sobreexpresión

Se utilizaron los plásmidos pFlag-Hakai y pHMGB1-GFP de forma independiente con el objetivo de analizar el efecto de cada sobreexpresión proteica por separado y los efectos producidos en los niveles endógenos. Se estableció la cinética considerando 0-3µg de plásmido y evitar un exceso de toxicidad, propia de la lipofectamina. El control se generó con p3.1 y también que se utilizó hasta completar los 3µg en cada punto considerado.

5.6. Extracción y cuantificación de proteínas

Las células en cultivo, una vez se encuentran con una confluencia del 80-90% se recogieron para obtener los lisados proteicos. Se lavaron con PBS (1X) de la casa comercial MP, se levantaron de la placa (*scraping*) y se recogieron en un eppendorf. Se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. A las células se les añadió un volumen de tampón de lisis al 1% de TX-100 (20mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% de TritonX-100) suplementado con un *mix* de inhibidores de proteasas. Este se componía por: PI *cocktail* (*Halt*TM *Protease Inhibitor Cocktails*) (1:100) y PMSF (fluoruro de fenilmetilsufonilo) (1:100), ambos de Thermo Fisher Scientific. Se incubó durante 30 minutos y se centrifugó durante 10 minutos a 12000 rpm, todo a 4°C. El sobrenadante resultante es el que contiene los lisados proteicos.

La cuantificación proteica para la preparación de las muestras se realizó utilizando el método colorimétrico BCA (ácido binciconínico) utilizando el *kit* comercial *Pierce BCA Protein Assay* de Thermo Fisher Scientific. Se realiza una recta patrón a partir de concentraciones conocidas de BSA (*Bovine Serum Albumin*), de 0 a 12 µg; esto permite conocer la concentración de las muestras analizadas. Estas se cuantificaron con 2µL de

muestra en 200µL de *Working Solution* (solución resultante de los reactivos A y B; 50:1), realizando 2 réplicas. Este *kit* requiere una incubación de 30 minutos a 37°C. La absorbancia se midió a 570nm en el espectrofotómetro NanoQuant Infinite M200 PRO de TECAN y se procesó en el *software* Tecan i-control.

5.7. Inmunoprecipitación

Se fundamenta en precipitar una proteína en cuestión, Hakai, y las proteínas con la que esta interacciona. La co-inmunoprecipitación se visualiza al utilizar el anticuerpo específico para la otra proteína de interés, HMGB1. Se trabajó con la línea HCT116 al ser la línea celular que tenía la técnica puesta a punto.

Por un lado, se preparó la matriz de inmunoprecipitación con PBS suplementado al 0,1% con Tween 20, de Sigma-Aldrich, (PBS-T). Se añadieron las *beads* magnéticas para anticuerpos de conejo, *DynabeadsTM Protein A* de Invitrogen, y los anticuerpos purificados de Ig G y Hakai (*Rabbit anti-Hakai Affinity Purified* y *Rabbit anti-IgG Affinity Purified*, ambos de la casa comercial Bethyl). Las *beads* deben ser lavadas previamente a su uso con PBS-T al 0,1%. La adición se realiza en el orden descrito y en las cantidades reflejadas en *Tabla 1*. Una vez preparada la matriz, se incubó en rotación a 30 rpm durante 2 horas a 4°C; consiguiendo la unión específica entre *beads* y anticuerpos. Transcurrido este tiempo, se retiró la matriz realizando 3 lavados con PBS-T para eliminar el excedente, resuspendiendo las *beads* en cada lavado. Es necesario trabajar con una cámara magnética que evite la pérdida de las *beads* durante estos lavados, se utilizó PureProteomeTM Magnetic Stand de 8 posiciones de la casa comercial Merk de Millipore.

Reactivos	Ig G	IP: Hakai
PBS-T al 0,1%	500 µL	500 µL
<i>Dynabeads Protein A</i>	10,4 µL	10,4 µL
Anticuerpo purificado (IgG/Hakai)	2,5 µg	2,5 µg

Tabla 1. Composición de la matriz de inmunoprecipitación para una p100. Los valores reflejados son para una p100 por cada punto de la IP. La cantidad de PBS-T es constante pero las *beads* y los anticuerpos se adecúan al número de placas utilizadas en cada caso.

Por otro lado, hay que obtener los lisados proteicos cuyo proceso se describe en apartado 5.6. Las células se incubaron en placas de 100mm (en adelante p100), proporcionadas por BD Biosciences, utilizando dos placas p100 para cada punto (Ig G y IP). El objetivo es conseguir lisado proteico suficiente como para obtener resultados. Además, hay otras

particularidades con respecto al protocolo descrito en 5.6 porque el proceso debe realizarse a 4°C y, para obtener los lisados, siempre se añade 1mL de tampón de lisis con el *mix* de inhibidores. En este caso el *mix* de proteasas contenía, además, N-etilmaleimida (1:200), de Sigma-Aldrich, para inhibir la desubiquitinización de las proteínas.

Una vez obtenidos y transcurridas las 2 horas de incubación, se añadieron los lisados para que generen la unión entre las proteínas y los anticuerpos purificados. Se incubaron durante 30 minutos en rotación a 4°C. Se reservan 80µL de cada punto como *input*, es decir, como control; los lisados restantes se añaden, en igual cantidad (~900µL), a las *beads* unidas a los anticuerpos.

5.8. Western Blot

5.8.1. Preparación de las muestras

Es necesario preparar las muestras para realizar esta técnica para que todas estén en igualdad de condiciones y sean comparables. Se utilizan los datos obtenidos de la cuantificación proteica para que todas tengan la misma concentración. Todas las muestras preparadas en el presente trabajo se prepararon a 1µg/µL. Para cada muestra se añadió 20µg de proteína, el tampón desnaturizante Laemmli 5X (4% de SDS, 20% de glicerol, 10% de 2-mercaptoetanol, 0,004% de azul de bromofenol, 0,125M de Tris-HCl) y se completó con tampón de lisis. La IP es la excepción, no se realiza la cuantificación previa, sino que se añaden 20µL de tampón Laemmli 5X al *input*; y a los lisados y *beads*, 40µL. Las muestras se hirvieron a 95°C durante 7 minutos en el termobloque.

5.8.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se realizó en el equipo Mini-Protean III de Bio-Rad. Para la preparación de los geles, se emplearon los reactivos indicados en la *Tabla 2*. Además de las muestras, se cargan 5µL de marcador proteico, para localizar las proteínas de interés. Se utilizaron dos: *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* de Bio-Rad y *Color Protein Standard, Broad Range*, de New England BioLabs.

Precision Plus Protein™ Dual Color Standards de Bio-Rad presenta 10 bandas: 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250. *Color Protein Standard, Broad Range*, de New England BioLabs tiene 12 bandas de precisión: 11, 17, 22, 25, 32, 46, 58, 80, 100, 135, 190 y 245.

Reactivos	Gel separador		Gel de apilamiento
	10%	12%	
H ₂ O	3 mL	2,5 mL	3,2 mL
1,5M Tris-HCl pH 8,8	2,5 mL	2,5 mL	-
0,5M Tris-HCl pH 6,8	-	-	1,25 mL
Glicerol 50% (Sigma Aldrich)	2 mL	2 mL	-
Acrilamida/bisacrilamida 29:1 (Bio-Rad)	2,5 mL	3 mL	500 µL
SDS 10% (Sigma Aldrich)	100 µL	100 µL	50 µL
APS (Persulfato amónico) (Sigma Aldrich)	30 µL	30 µL	50 µL
TEMED (Tetrametiletilendiamina) (NZYTech)	15 µL	15 µL	5 µL

Tabla 2. Composición de los geles de acrilamida mini. Las cantidades mostradas se corresponden con geles mini de resolución, al 10% y 12%, y apilamiento.

5.8.3. Transferencia de proteínas a membrana de PVDF

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) con tamaño de poro 0,2µm; concretamente se utilizó *Immun-Blot® PVDF Membranes for Protein Blotting* de Bio-Rad. Para la activación de la membrana se pre-incubó en metanol (15 segundos), en agua destilada y, luego, en la solución tampón de transferencia (0,025mM Trizma base, 0,192M glicina, 20% de metanol en agua). Para el montaje de la transferencia se siguieron las indicaciones proporcionadas por BioRad. La transferencia realizó a 0,2A durante una hora, en condiciones de humedad y en hielo.

5.8.4. Inmunodetección

Una vez realizada la transferencia, las membranas se bloquearon con una solución de TBS-T al 1X (10% de *Tris-buffered saline* 10X, 20% de Tween) con leche en polvo (*Skim Milk Powder* de Sigma-Aldrich) al 5% durante 1 hora en agitación. Tras el bloqueo, se incubó la membrana con el anticuerpo primario en la misma solución de bloqueo, *overnight* a 4°C en agitación. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con solución la misma solución de bloqueo. Después se incubó durante 1 hora el anticuerpo secundario correspondiente, contra la cadena IgG específica del anticuerpo primario, en dilución 1:10.000. Por último, se lavaron de nuevo 3 veces durante 5 minutos con TBS-T. Los resultados se obtuvieron por quimioluminiscencia en el equipo Amersham Imager 600, con el reactivo Luminata™ Crescendo Western HRP Substrate de Millipore.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-Anexina A2 (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos), anti-E-cadherina (Invitrogen, Estados Unidos), anti-Flag (Sigma Aldrich,

Alemania), anti-GAPDH (Invitrogen, Estados Unidos), anti-GFP (Abcam, Reino Unido), anti-Hakai (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), anti-HMGB1 (Abcam, Reino Unido), anti-HMGB2 (Abcam, Reino Unido), anti-Tubulina (Sigma Aldrich, Alemania), anti-Vinculina (Cell Signaling Technology, Países Bajos) y anti-B actina (Abcam, Reino Unido). Todos ellos se utilizaron en dilución 1:1000 a excepción de anti-Flag y B-actina que lo hicieron en diluciones 1:4000 y 1:5000, respectivamente. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-IgG de conejo y anti-IgG de ratón, ambos conjugados con peroxidasa de la casa comercial ECL *Detection Reagent* de Sigma-Aldrich.

Los niveles de proteína obtenidos se analizaron con el *software* ImageJ (Institutos Nacionales de Salud, Estados Unidos). Los niveles se normalizaron frente a los niveles de proteína de control de carga (GAPDH) y se relativizaron contra el punto de control de la técnica. Las gráficas se elaboraron con el *software* GraphPad Prism 8.

5.9. Inmunofluorescencia

Se estudiaron 4 condiciones: células sin transfectar tratadas con lipofectamina, transfectadas con p3.1, transfectadas con pHMGB1-GFP y transfectadas con pFlag-Hakai. Se sembraron 15.000 células transfectadas para cada condición en la *Millicell EZ slide 8-well glass* de Millipore (en adelante, *chamber*). Las células se dejaron crecer 72 horas, desde la transfección, a 37°C en atmósfera de 95% de humedad y 5% de CO₂.

La técnica se realiza sobre la propia *chamber*, que consiste en un portaobjetos con cámaras diferenciadas por un aplique que se retira al final. Se siguió el protocolo estándar para inmunofluorescencia, con alguna particularidad como permeabilización con Triton X100 disuelto en PBS al 0,5% al tratarse de proteínas nucleares. Se utilizaron los anticuerpos primarios de Hakai y HMGB1, reflejados en el apartado 5.8.4, son aptos para inmunofluorescencia. La incubación se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente, con diluciones 1:100 para Hakai y 1:500 para HMGB1. El anticuerpo secundario utilizado fue *Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Alexa Fluor 568* de Invitrogen, con tinte fluorescente naranja/rojo brillante, cuya excitación ideal es de 568nm. Se incubó durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Para visualizar las estructuras nucleares se añadió Hoechst (1:5000) disuelto en PBS, se trabajó con Hoechst 33342 de Thermo Fisher Scientific. La fijación se hizo con el gel de montaje *ProLong™ Gold Antifade Mountant* de Thermo Fisher Scientific.

Las muestras se visualizaron en el microscopio de fluorescencia BX61 de Olympus (*Monitored reflected Fluorescence System*), el módulo de fluorescencia utilizado fue el equipo U-RFL-T de Olympus y las imágenes se fotografiaron con la cámara Nikon Eclipse TS100 acoplada al microscopio y se procesaron en *software* de análisis ImageJ.

6. RESULTADOS

6.1. Expresión endógena de los niveles proteicos de Hakai y las proteínas HMGB en diferentes líneas epiteliales de CCR

En primer lugar, y para comprender mejor las líneas celulares consideradas en el estudio, se procedió con el análisis de los niveles endógenos de las líneas celulares de CCR. Este estudio previo permite conocer los niveles basales de Hakai, HMGB1 y HMGB2 y así tener antecedentes de expresión para las pruebas sucesivas.

Primero era necesario establecer el control de carga (o *housekeeping*) que mejor se ajusta al conjunto de líneas celulares, es decir, que la expresión sea igual en todas. Se estudiaron las expresiones de Tubulina, Vinculina, β -actina y GAPDH. En *Figura 1* se pueden observar los resultados obtenidos en *Western blot* diferentes; la Tubulina y la vinculina son los controles de carga en los que mayor modulación se observa entre las líneas celulares. Por lo que, entre β -actina y GAPDH, GAPDH parece que es el control de carga más adecuado en este caso.

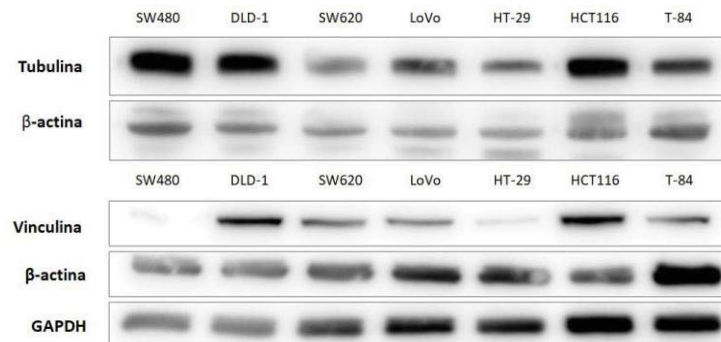


Figura 1. Niveles de expresión proteica de los controles de carga para las líneas epiteliales de CCR. Las líneas incluidas son SW480, DLD-1, SW620, LoVo, HT-29, HCT116 y T-84. Se compara la expresión de Tubulina y β -actina (imagen superior) y Vinculina, β -actina y GAPDH (imagen inferior). Se selecciona GAPDH como control.

Las proteínas incluidas en este análisis de niveles endógenos son E-cadherina, Hakai, Anexina A2, HMGB1 y HMGB2. E-cadherina permite analizar más a fondo la línea celular y establecer relaciones con el programa EMT. Anexina A2 se incluye por sus implicaciones en el avance de la enfermedad y una mejor caracterización de las líneas.

Al trabajar con 7 líneas celulares representativas de la progresión del tumor, y con el precedente de heterogeneidad del cáncer de colon, es de esperar la expresión diferencial de las proteínas. Las diferencias entre las líneas celulares se han descrito anteriormente y son el criterio para establecer el orden en el que se disponen al realizar los *Western blot*. En Rodríguez-Quiroga (2017), también se utilizaron las líneas SW480, DLD-1, SW620, HT-29 y T84, lo que ayudó a establecer el orden. En *Figura 2* se reflejan los resultados obtenidos por *Western blot* y estos se procesan en ImageJ y se representan mediante gráficos de barras (*Figura 3*) para facilitar la comparación entre líneas y proteínas.

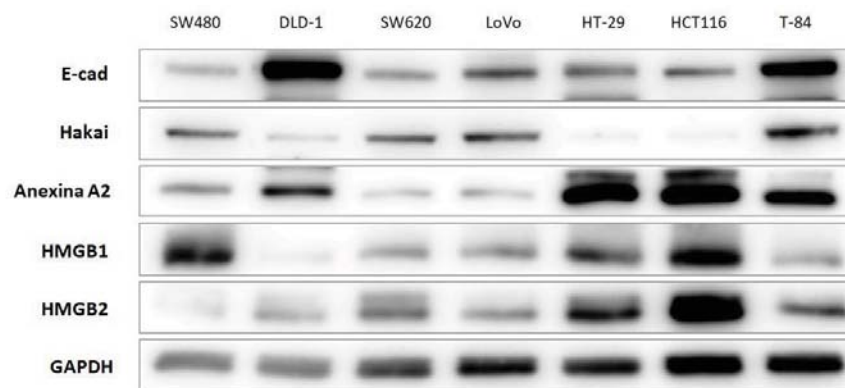


Figura 2. Niveles de expresión de las proteínas E-cadherina, Hakai, Anexina A2, HMGB1 y HMGB2 en líneas celulares de CCR. Se trata de las hibridaciones de *Western blot* para las proteínas. Las líneas son SW480, DLD-1, SW620, LoVo, HT-29, HCT116 y T-84. Se incluye el control de carga, GAPDH.

Destaca la línea DLD-1 en la expresión de E-cad (*Figura 3-A*), muy por encima del resto de líneas. Las líneas con mayor expresión de Hakai (*Figura 3-B*) son SW480, DLD-1 y SW620 y las que presentan una menor expresión son HT-29 y HCT116, teniendo un valor similar. HT-29 y HCT116, por otro lado, son las líneas con mayor expresión de Anexina A2, mientras que SW620 y LoVo, las de menor (*Figura 3-C*). Respecto a la expresión de HMGB1 y HMGB2, no presentan el mismo patrón de expresión proteica en las líneas estudiadas. Se observa que la línea con mayor expresión de HMGB1 (*Figura 3-D*) es SW480; y que tanto en SW620 y LoVo como HCT116 y HT-29 los niveles de expresión son muy similares entre sí. En la expresión de HMGB2 (*Figura 3-E*), HCT116 y HT-29 son las líneas que presentan mayores niveles, siendo en el caso de HCT116 similar a la expresión de HMGB1. En la línea SW480 los niveles de expresión de HMGB1 y HMGB2 son opuestos.

No se observan patrones de expresión inversos entre Hakai y E-cad y Hakai y Anexina A2, aunque Hakai actúe como E3 ubiquitina-ligasa para ambas.

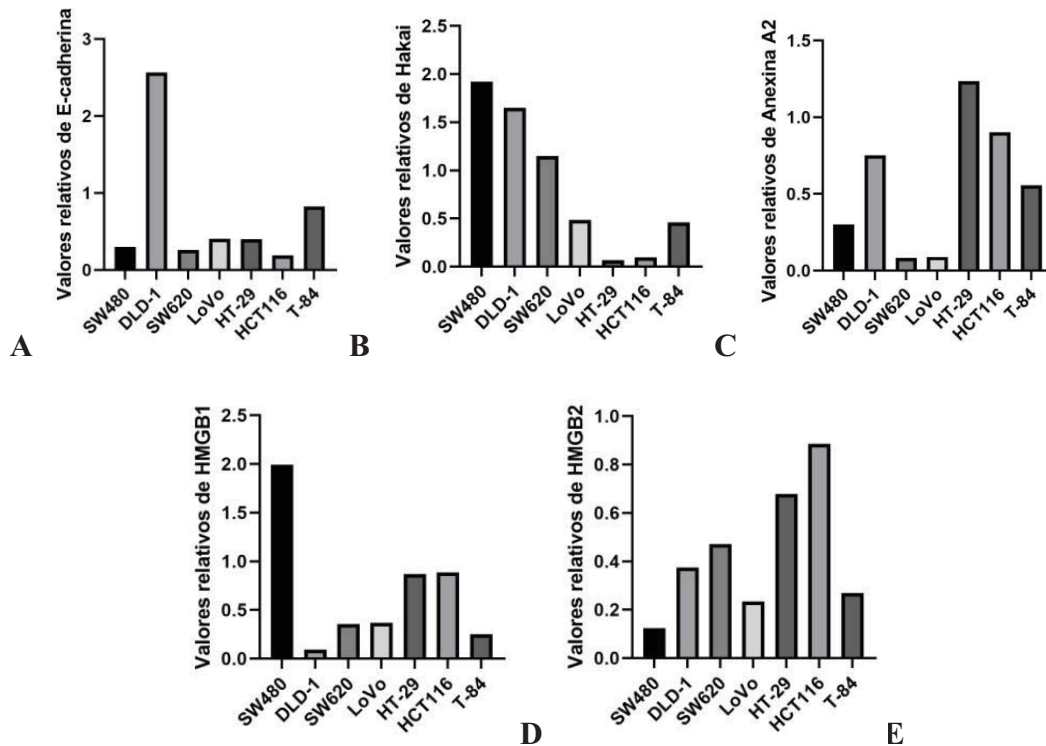


Figura 3. Valores relativos de las proteínas de interés en las diferentes líneas de CCR; (A) E-cadherina, (B) Hakai, (C) Anexina A2, (D) HMGB1, (E) HMGB2. Los niveles proteicos se analizaron con el *software* ImageJ y se encuentran normalizados para el control de carga, GAPDH. Representación gráfica con los datos estandarizados se realizó con GraphPad Prism 8.

6.2. Interacción entre Hakai y HMGB1 en las líneas celulares epiteliales de colon

Para determinar la posible interacción entre nuestras proteínas de interés, Hakai y HMGB1, se realizó una inmunoprecipitación, realizando varias réplicas. En la IP de Hakai (*Figura 4*) se pueden ver claramente las bandas correspondientes a la inmunoprecipitación y la co-inmunoprecipitación. Por tanto, se puede determinar que sí existe interacción entre las proteínas aunque no se puede determinar la forma en que tiene lugar dicha interacción.

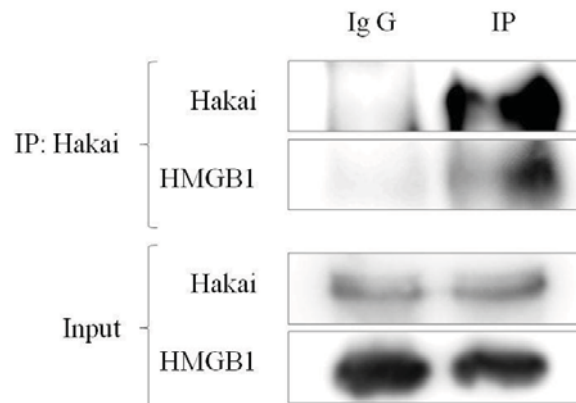


Figura 4. Inmunoprecipitación de Hakai y co-inmunoprecipitación de HMGB1, en la línea celular HCT116. Se hibrida con Hakai y HMGB1. Las bandas del *input* verifican la carga igual para IgG e IP.

Demostrada esta interacción, se realizó un ensayo preliminar para estudiar la regulación de las proteínas mediante transfecciones con los plásmidos de sobreexpresión, y comprender mejor las implicaciones de la interacción. Los resultados se pueden visualizar en *Figura 5*.

Al transfectar de forma conjunta y en igual cantidad los plásmidos pFlag-Hakai y pHMGB1-GFP (*Figura 5-2*), se observa una disminución de la expresión de Hakai que puede deberse a la competencia entre los plásmidos por integrarse en la célula. En las condiciones 3 y 6 (*Figura 5*) se muestra que al transfectar con mayor cantidad de pHMGB1-GFP la expresión de Hakai se incrementa, más que en condiciones opuestas (4 y 5). Para comprender la expresión de HMGB1 hay que considerar tanto la banda de HMGB1 como la de GFP porque se diferencia entre expresión endógena y exógena, respectivamente. Es por ello que se procedió a realizar la cinética de sobreexpresión de ambas proteínas para visualizarlo mejor.

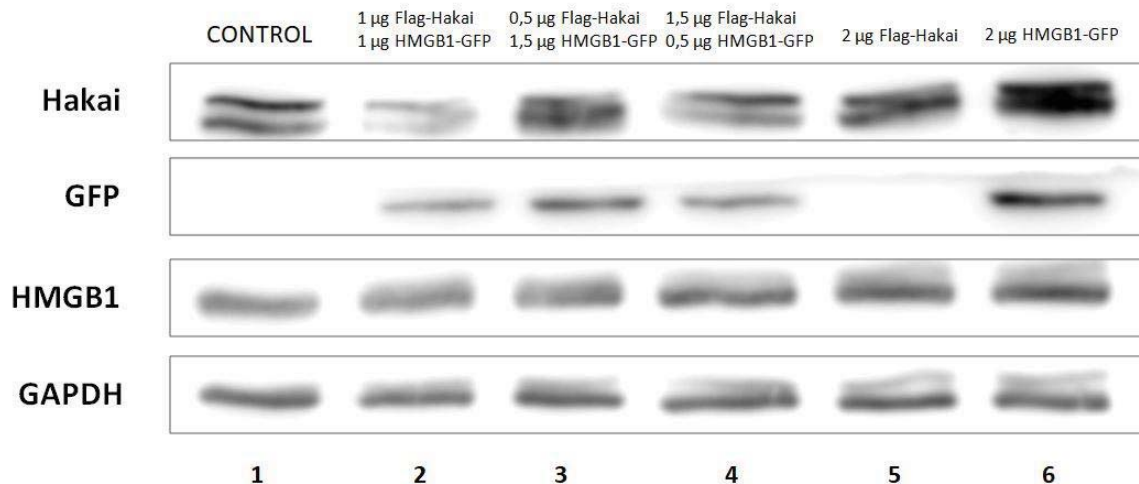


Figura 5. Niveles de expresión de Hakai y HMGB1 en la línea celular HCT116 sometida a diferentes transfecciones. Se muestran diferentes condiciones de transfección y co-transfección para estudiar la posible regulación entre las proteínas Hakai y HMGB1. Se incluye GFP para verificar la transfección de pHMGB1-GFP y observar el HMGB1 exógeno en las condiciones 2, 3, 4, 6. Cuando se transfecta mayor cantidad de pHMGB1-GFP se observa mayor expresión de Hakai.

De acuerdo con los datos reflejados en *Figura 6*, en ambas cinéticas se produce un aumento en la expresión de Hakai. Los niveles endógenos de HMGB1 se mantienen constantes en ambas cinéticas, coincidiendo con los resultados obtenidos en *Figura 5*. Sin embargo, los niveles de HMGB1 son mayores al transfectar la línea celular HCT116 con pHMGB1-GFP (*Figura 6-B*) que al hacerlo con pFlag-Hakai (*Figura 6-A*), porque hay expresión tanto endógena como exógena.

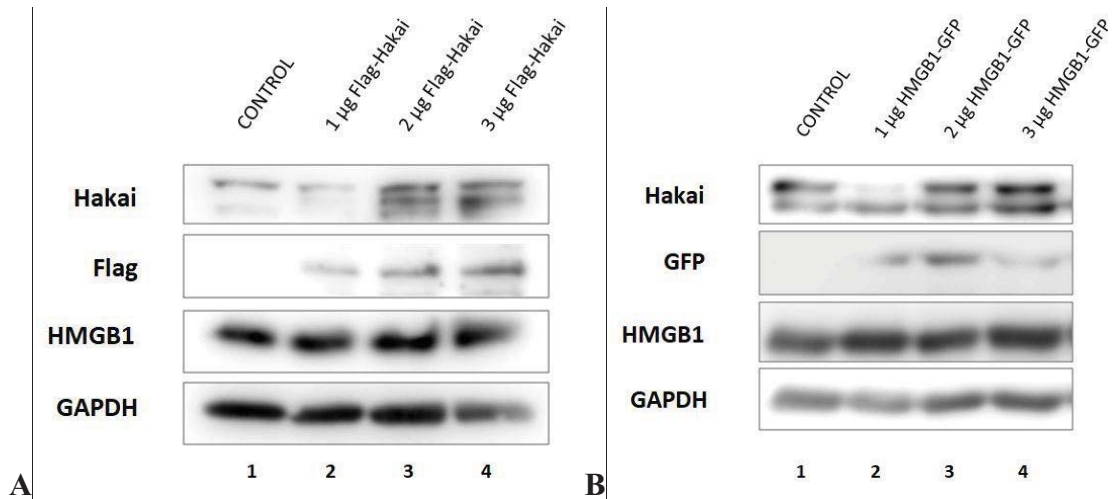


Figura 6. Niveles de expresión de las proteínas Hakai y HMGB1 en la línea HCT116 transfectada por pFlag-Hakai (A) y pHMGB1-GFP (B). En ambas las cinéticas se observa la sobreexpresión de Hakai. Se incluyen Flag y GFP para verificar las transformaciones.

Se realizó de nuevo una inmunoprecipitación de de Hakai en la línea HCT116 transfectada con pHMGB1-GFP (Figura 7) para estudiar la interacción de Hakai con los niveles, endógenos y exógenos, de HMGB1. Al comparar ambas IPs, control y transfectada, se vuelve a demostrar la interacción entre Hakai y HMGB1 endógeno. No se observa banda de interacción con HMGB1 exógeno (Figura 7-B) aunque el *input* se verifica que la transfección tiene lugar, pues sí hay hibridación con GFP.

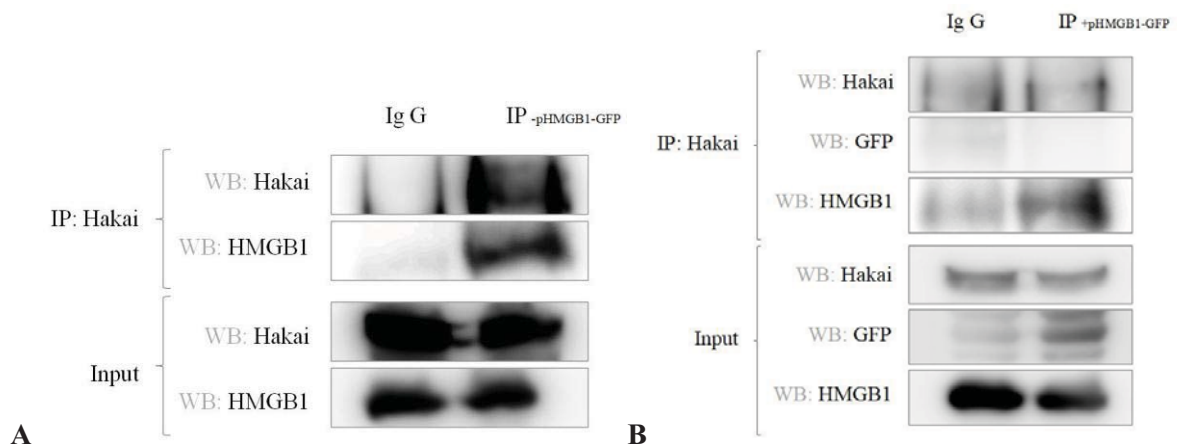


Figura 7. Inmunoprecipitación de Hakai y co-inmunoprecipitación de HMGB1 en la línea celular HCT116; (A) IP sin transfectar y (B) IP transfectada por pHMGB1-GFP. La IP-A actúa como control, mientras que en IP-B muestra los resultados de la transfección e incluye expresión endógena y exógena de HMGB1. GFP para verificar la transfección.

6.3. Influencia de la expresión de HMGB1 sobre la expresión de Hakai

En las imágenes de inmunofluorescencia (Figura 8 y Figura 9) se puede observar que tanto Hakai como HMGB1 se localizan en el núcleo. Al examinar la línea transfectada con

pHMGB1-GFP (*Figura 9*) se puede determinar que esta transfección, tanto en la expresión de Hakai como de HMGB1, es efectiva y exitosa por la cantidad de células transfectadas.

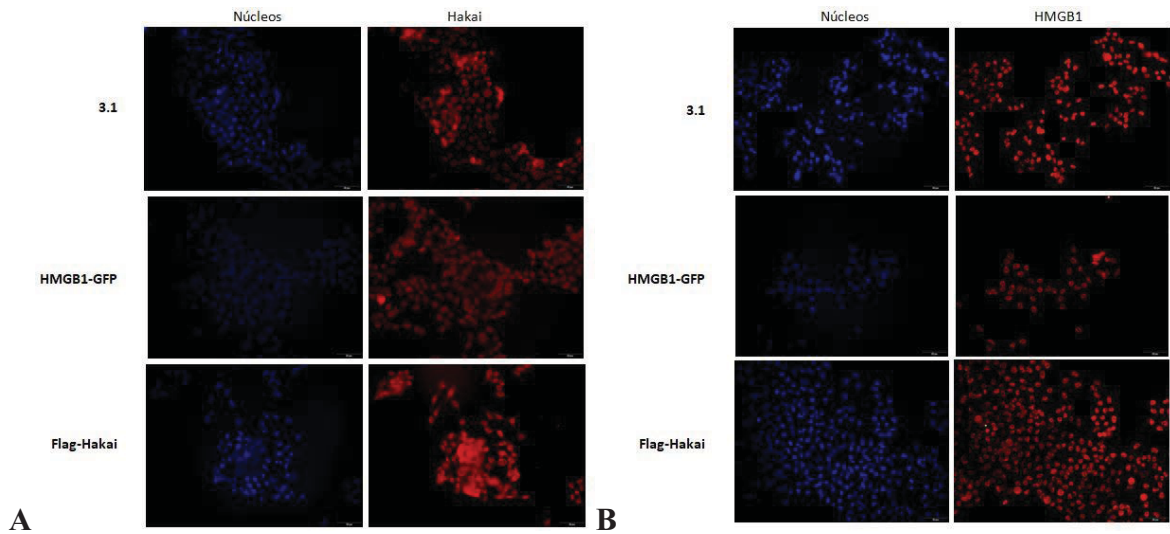


Figura 8. Efecto de la sobreexpresión de Hakai y HMGB1 en la localización subcelular. (A) Muestra los efectos en Hakai y (B) en HMGB1; las líneas fueron transfectadas con los plásmidos p3.1, pHMGB1-GFP y pFlag-Hakai. Fotos observadas por el microscopio óptico, objetivo 20x. Escala bar, 50 μ m.

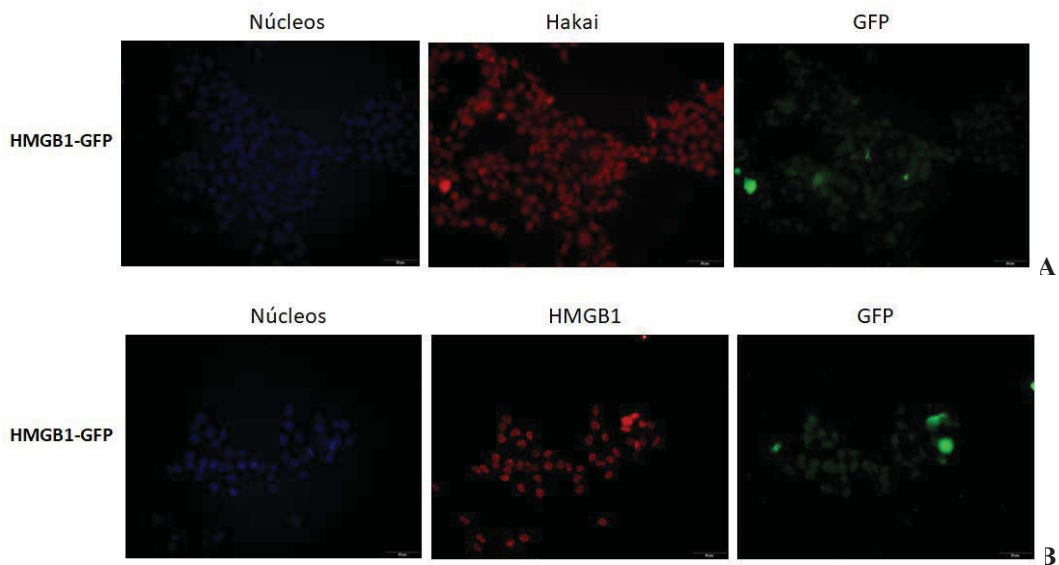


Figura 9. Efecto de la sobreexpresión de HMGB1 en la localización subcelular en la línea transfectada con pHMGB1-GFP. (A) Muestra el efecto en Hakai y (B) muestra el efecto en HMGB1. Fotos observadas por el microscopio óptico, objetivo 20x. Escala bar, 50 μ m.

Al estudiar el efecto en Hakai en las diferentes condiciones, su expresión se localiza principalmente en el núcleo, aunque también hay expresión a nivel citoplasmático. En el caso de HMGB1 la localización también es nuclear en todas las condiciones consideradas, considerando los niveles endógenos. En *Figura 9* se muestran los efectos de la transfección de pHGMB1-GFP en ambas proteínas. En este caso, se pueden mostrar de forma

simultánea los niveles endógenos (*Figura 9-B*) y exógenos de HMGB1 (*Figura 9, A y B*). Mientras que el endógeno se expresa a nivel nuclear, el exógeno parece hacerlo a nivel de citoplasma. Por lo tanto, se puede determinar que las proteínas Hakai y HMGB1 se co-localizan en el núcleo. Aunque en la línea HMGB-GFP se observa que el HMGB1 exógeno (unido a GFP) se expresa a nivel citoplasmático, no se observa este cambio de forma intensa en la línea Flag-Hakai. La expresión endógena de HMGB1 no se ve afectada en las líneas con sobreexpresión proteica.

7. DISCUSIÓN

Las líneas celulares se encuentran ordenadas atendiendo a la clasificación de Dukes y a la evolución en el cáncer de colon, de adenoma a carcinoma; sin diferenciar entre células procedentes de metástasis o no. Esto permite comprender la evolución del cáncer de colon. En base a los resultados obtenidos en el análisis de los niveles endógenos (*Figura 2 y Figura 3*), se evidencia la heterogeneidad existente en CCR y la diferente expresión proteica entre los diferentes tipos celulares, es decir, entre los diferentes estadios de la progresión. Además, se evidencia que no hay un único tipo de cáncer de colon, sino que este viene determinado por su origen y el microambiente en el que se desarrolla. En Testa *et al.* (2018), se considera que el CCR no es una enfermedad única, sino que un grupo heterogéneo de tumores malignos que se originan en el interior del colon, desde un punto de vista genómico.

Las proteínas HMGB1, HMGB2 y GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), entre otras, forman un complejo proteico nuclear implicado en la respuesta citotóxica al ADN modificado por la incorporación de análogos de nucleósidos anticancerígenos (Krynetski *et al.*, 2003). Es curioso que habiendo dicha implicación, sea GAPDH el mejor control de carga entre los estudiados. Ese *housekeeping* se ha utilizado para las diferentes técnicas, no mostrando regulación en las transfecciones ni en las cinéticas.

Los resultados también se podrían estudiar atendiendo a las diferencias entre las líneas celulares, considerándose como criterios la evolución del tumor (adenocarcinoma y carcinoma) y la posible influencia de la metástasis (tumor primario y secundario).

No se puede determinar, con los datos obtenidos, que la capacidad metastásica pueda influir de algún modo determinado en la expresión de las proteínas E-cadherina, Hakai, HMGB1 y HMGB2. No se puede establecer un patrón definido bajo este criterio. De

hecho, en el caso de las líneas celulares procedentes de tumores primarios se observan mayores diferencias en la expresión de proteínas que cuando proceden de tumores secundarios. Tampoco se establece ningún patrón de expresión cuando el criterio es la evolución del cáncer. Lo que se justifica por la gran heterogeneidad conocida del cáncer de colon y evidencia la importancia de encontrar un marcador de biopsia líquida. La biopsia de tejido sólido cuando el tumor presenta heterogeneidad puede no ser representativa porque no se toma una muestra de todo el tumor, sino una parte. Sin embargo, en las biopsias líquidas podría recogerse diferentes tipos celulares o ADN tumorales que se encuentren en circulación por el organismo (Molinari *et al.*, 2018).

Si analizamos el comportamiento de las proteínas sin atender a criterios, HMGB1 y HMGB2 no presentan el mismo patrón de expresión de las proteínas estudiadas aunque comparten algunas funciones y su homología es elevada. Las líneas SW620, HT-29, HCT116 y T84 presentan una expresión similar en ambas proteínas, estas líneas tienen en común el pertenecer a fases finales de la progresión del cáncer. De hecho, SW620, HT-29 y HCT116 son las líneas que presentan un aumento gradual de la expresión de HMGB2 a medida que evoluciona el cáncer, lo que se traduce en un aumento de la quimiorresistencia. A nivel individual, en la línea SW480 predomina la expresión de HMGB1 frente a la de HMGB2, cuyos niveles son los más bajos. Esto podría sugerir que en etapas tempranas del cáncer de colon la expresión de HMGB1 es más elevada y predomina sobre HMGB2. A medida que evoluciona la enfermedad, estos niveles se van haciendo más cercanos ya que en HT-29 y HCT116 los valores de ambas proteínas son muy próximos.

Respecto al aumento de la quimiorresistencia, HMGB2 y Anexina A2 presentan un patrón de expresión parecido ya que aumenta a medida que evoluciona el cáncer. El aumento de expresión de Anexina A2 también se relaciona con el aumento de quimiorresistencia (Jung *et al.*, 2015; Tong *et al.*, 2015), alta invasividad, favorece el crecimiento del tumor (Christensen *et al.*, 2017) y el desarrollo de metástasis (Zhang *et al.*, 2009A; Wang y Lin, 2014; Christensen *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2017). Tanto la expresión elevada como la reducida de Anexina A2 se correlacionan con un mal pronóstico en algunos tipos de cáncer (Christensen *et al.*, 2017) porque puede actuar como un oncogén o como un supresor tumoral, respectivamente (Gou *et al.*, 2008). Por tanto, sería interesante profundizar en la posible regulación entre Hakai y Anexina A2, pues parece haber una regulación negativa por parte de Hakai (Díaz-Díaz *et al.*, 2017).

A nivel individual de cada línea celular se pueden extrapolar algunas conjeturas basadas únicamente en la expresión proteica, pero sería necesario analizar más a fondo. Se podría determinar que la línea SW480 es la línea más invasiva del conjunto estudiado. Sus niveles de E-cadherina son muy inferiores a los de Hakai, lo que denota la degradación por parte de Hakai, y los niveles de Hakai y HMGB1 son los más elevados del conjunto, lo que apoya dicha invasividad. Por otro lado, en línea DLD-1 tiene lugar el caso opuesto, considerándose la menos invasiva y, por tanto, más epitelial teniendo en cuenta los elevados niveles de E-cadherina. Aunque los niveles de Hakai también son elevados, E-cadherina se expresa en mayor medida. Además, los niveles de HMGB1 al ser los más reducidos también apoyan la menor invasividad. Esto podría estar justificado porque las líneas son de estados diferentes, B (SW480) y C (DLD-1), aunque ambas se describen como adenocarcinomas. No obstante, los resultados son demasiado preliminares como para poder establecer conclusiones.

En cuanto a los resultados sobre la interacción de Hakai y las proteínas HMGB, se puede determinar que Hakai y HMGB1 sí interactúan y se co-localizan en el núcleo. No se puede determinar cómo se produce esta interacción con los datos obtenidos, sino que habría que continuar investigando. Respecto a los resultados de inmunoprecipitación obtenidos en la línea celular HCT116 transfectada con pHMGB1-GFP (*Figura 7*), la ausencia de co-inmunoprecipitación de HMGB1 exógeno con Hakai puede deberse a que la propia GFP. Esta puede provocar cambios estructurales haciendo que el dominio por el que HMGB1 interactúa con Hakai deje de estar, al tratarse de un *tag* de gran tamaño.

De acuerdo con todos los resultados obtenidos, todo parece apuntar que HMGB1 regula positivamente Hakai; sin embargo, Hakai no parece influir del mismo modo en la expresión de HMGB1. Mediante un estudio proteómico ya se demostró que la sobreexpresión de Hakai regulaba positivamente la expresión de HMGB2 (Díaz-Díaz et al., 2017).

Finalmente, hay que destacar el interés que presentan estas interacciones proteicas en el desarrollo de las posibles dianas terapéuticas para tratar el cáncer de colon.

8. CONCLUSIÓN

1. HMGB1 y HMGB2 no presentan el mismo patrón de expresión en la progresión del cáncer de colon.

2. Hakai y HMGB1 son proteínas que interactúan entre sí.
3. La sobreexpresión de HMGB1 incrementa los niveles endógenos de Hakai.
4. La sobreexpresión de Hakai no regula positivamente los niveles endógenos de HMGB1.
5. Hakai y HMGB1 son proteínas que se co-localizan en el núcleo celular en condiciones normales y en condiciones de sobreexpresión.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abella, V., Valladares, M., Rodríguez, T., Haz, M., Blanco, M., Tarrio, N., Iglesias, P., Aparicio, L. A., Figueroa, A. (2012) miR-203 regulates cell proliferation through its influence on Hakai expression. *PLoS One*. 7(12): e52568.
2. Abraham, A.B., Bronstein, R., Chen, E.I., Koller, A., Ronfani, L., Maletic-Savatic, M., Tsirka, S.E. (2013). Members of the high mobility group B protein family are dynamically expressed in embryonic neural stem cells. *Proteome Sci*. 11(1): 18-29.
3. Alexandrova, E.A., Beltchev, B.G. (1987). Differences between HMG1 proteins isolated from normal and tumour cells. *Biochim Biophys Acta*. 915(3): 399-405.
4. An, Y., Zhang, Z., Shang, Y., Jiang, X., Dong, J., Yu, P., Nie, Y., Zhao, Q. (2015). miR.23b-3p regulates the chemoresistance of gastric cancer cells by targeting ATG12 and HMGB2. *Cell Death and Disease*. 6(5): e1766.
5. Andersson, U., Antoine, D.J., Tracey, K.J. (2014). The functions of HMGB1 depend on molecular localization and post-translational modifications. *J Intern Med*. 276(5): 420-424.
6. Aparicio, L.A., Blanco, M., Castosa, R., Concha, A., Valladares, M., Calvo, L., Figueroa, A. (2015). Clinical implications of epithelial cell plasticity in cancer progression. *Cancer Lett*. 366(1): 1-10.
7. Aparicio, L.A., Valladares, M., Blanco, M., Alonso, G., Figueroa, A. (2012). Biological influence of Hakai in cancer: a 10-year review. *Can Met Rev*. 31(1-2): 375-386.
8. Arends, M.J. (2013) Pathways of colorectal carcinogenesis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol, AIMM*. 21(2): 97-102.
9. Balasubramani, M., Day, B.W., Shoen, R.E., Getzenberg, R.H. (2006). Altered expression and localization of creatine kinase B, heterogeneous nuclear ribonucleoproteína F, and high mobility group box 1 protein in the nuclear matrix associated with colon cancer. *Cancer Res*. 66(2): 763-769.
10. Barreiro-Alonso, A., Lamas-Maceiras, M., Rodríguez-Bemonte, E., Vizoso-Vázquez, A., Qindós-Varela, M., Cerdán, M.E. (2016). High mobility group B proteins, their partners, and other redox sensors in ovarian and prostate cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 20165845061 (17 pages)
11. Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116(2): 281-297.
12. Berman, J.J. (2004). Tumor taxonomy for the developmental lineage classification of neoplasms. *BMC Cancer*. 4: 88.
13. Bianchi, M.E., Falciola, L., Ferrari, S., Lilley, D.M. (1992). The DNA binding site of HMG1 protein is composed of two similar segments (HMG boxes), both of which have counterparts in other eukaryotic regulatory proteins. *EMBO J*. 11(3): 1055-1063.
14. Birchmeier, W., Behrens, J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*. 1198(1): 11-26.
15. Blank, A., Roberts, D.E. 2nd, Dawon, H., Zlobec, I., Lugli, A. (2018). Tumor Heterogeneity in Primary Colorectal Cancer and Corresponding Metastases. Does the Apple Fall Far From the Tree? *Front Med (Lausanne)*. 5: 234.
16. Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A., Bianchi, M.E. (2003). Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *Embo J*. 22(20): 5551-5560.
17. Bonazzi, M., Veiga, E., Cerda, J.P., Cossart, P. (2008). Successive post-translational modifications of E-cadherin are required for InlA-mediated internalization of *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol*. 10(11): 2208-2222.
18. Bramsen, J.B., Rasmussen, M.H., Ongen, H., Mattesen, T.B., Orntoft, M.W., Árnadóttir, S.S., Sandoval, J., Laguna, T., Vang, S., Oster, B., Lamy, P., Madsen, M.R., Laurberg, S., Esteller, M.,

- Dermitzakis, E.T., Orntoft, T.F., Andersen, C.L. (2017). Molecular-Subtype-Specific Biomarkers Improve Prediction of Prognosis in Colorectal Cancer. *Cell. Rep.* 19(6): 1268-1280.
19. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *C A Cancer J Clin.* 689(6):394-424.
 20. Burger, A., Amemiya, Y., Kitching, R., Seth, A.K. (2006). Novel RING E3 ubiquitin ligases in breast cancer. *Neoplasia.* 8(8): 689-695.
 21. Bustin, M., Lehn, D.A., Landsman, D. (1990). Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. *Biochim Biophys Acta.* 1049(3): 231-237.
 22. Calin, G.A., Croce, C.M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6(11): 857-866.
 23. Calogero, S., Grassi, F., Aguzzi, A., Voigtländer, T., Ferrier, P., Ferrari, S., Bianchi, M.E. (1999). The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth, but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet.* 22(3): 276-280.
 24. Cámara-Quílez, M., Barreiro-Alonso, A., Rodríguez-Bemonte, E., Qindós-Varela, M., Cerdán, M.E., Lamas-Maceiras, M. (2020). Differential characteristics of HMGB2 versus HMGB1 and their perspectives in ovary and prostate cancer. *Cur Can Med.* 27(20): 3271-3289.
 25. Castosa, R., Martínez-Iglesias, 2018O., Roca-Lema, D., Casas-País, A., Díaz-Díaz, A., Iglesias, P., Santamarina, I., Graña, B., Calvo, L., Valladares-Ayerbes, M., Concha, A., Figueroa, A. (2018). Hakai overexpression effectively induces tumour progression and metástasis in vivo. *Sicientific Reports.* 8: 3466.
 26. Cavallaro, U., Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer.* 4(2): 118-132.
 27. Chaffer, C.L., Weinberg, R.A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science.* 331(6024): 1559-1564.
 28. Chen, C.Z. (2005). MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med.* 353(17): 1768-1771.
 29. Christensen, M.V., Hogdall, C.K., Jochumsen, K.M., Hogdall, E.V.S. (2017). Annexin A2 and cancer: A systematic review. *Int J Oncol.* 52(1): 5-18.
 30. Cooper, J. A., Kaneko, T., Li, S.S. (2015). Cell regulation by phosphotyrosine-targeted ubiquitin ligases. *Mol Cell Biol.* 35(11): 1886-1897.
 31. Dexter, D.L. (1977). N,N-Dimethylformamide-induced morphological differentiation and reduction of tumorigenicity in cultured mouse rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res.* 37(9): 3136-3140.
 32. Díaz-Díaz, A., Casas-País, A., Calamina, V., Castosa, R., Martínez-Iglesias, O., Roca-Lema, D., Santamarina, I., Valladares-Ayerbes, M., Calvo, C., Chantada, V., Figueroa, A. (2017). Proteomic analysis of the E3 ubiquitin-ligase Hakai highlights a role in plasticity of the cytoskeleton dynamics and in the proteasome system. *J Proteome Res.* 16(8): 2773-2788.
 33. Díaz-Díaz, A., Roca-Lema, D., Casas-País, A., Romay, G., Colombo, G., Concha, A., Graña, B., Figueroa, A. (2020). Heat shock protein 90 chaperone regulates the E3 ubiquitin-ligase Hakai protein stability. *Cancers (Basel).* 12(1): 215.
 34. Dong, X.D., Ito, N., Lotze, M.T., Demarco, R.A., Popovic, P., Shand, S.H., Watkins, S., Winikoff, S., Brown, C.K., Bartlett, D.L., Zeh, H.J. 3rd. (2007). High Mobility Group Box I (HMGB1) Release From Tumor Cells After Treatment: Implications for Development of Targeted Chemoimmunotherapy. *J Immunother (1997).* 30(6): 596-606.
 35. Duncan, R., Carpenter, B., Main, L.C., Telfer, C., Murray, G.I. (2008). Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 98(2): 426-433.
 36. Dunlop MG, Dobbins SE, Farrington SM, Jones AM, Palles C, Whiffin N, Tenesa A, Spain S, Broderick P, Ooi L-Y (2012) Common variation near CDKN1A, POLD3 and SHROOM2 influences colorectal cancer risk. *Nat Genet.* 44(7): 770-776.
 37. 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. *Clin Cancer Res.* 13(10): 2836-2848.
 38. Fearon ER, Vogelstein B (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61(5):759-767.
 39. Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 3(6): 453-458.
 40. Figueroa, A., Fujita, Y., Gorospe, M. (2009). Hacking RNA Hakai promotes tumorigenesis by enhancing the RNA-binding function of PSF. *Cell Cycle.* 8(22): 3648-3651. (B)
 41. Figueroa, A., Kotani, H., Toda, Y., Mazan-Mamczarz, K., Mueller, E.C., Otto, A., Disch, L., Norman, M., Ramdasi, R.M., Keshtgar, M., Gorospe, M., Fujita, Y. (2009). Novel roles of Hakai in cell proliferation and oncogenesis. *Mol Biol Cell.* 20(15): 3533-3542. (A)

42. Frame, M. C., Fincham, V. J., Carragher, N. O., & Wyke, J. A. (2002). v-Src's hold over actin and cell adhesions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(4): 233-245.
43. Frayling, I., Arends, M. (2013). Adenomatous Polyposis Coli. In: Maloy S, Hughes K (eds) Brenner's Encyclopedia of Genetics, vol 1, 2ª edición. Academic, San Diego, pp. 27-29.
44. Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H., Behrens, J., Sommer, T., Birchmeier, W. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol.* 4(3): 222-231.
45. Gong, E.Y., Park, E., Lee, K. (2010). Hakai acts as a coregulator of estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Cancer Sci.* 101(9): 2019-2025.
46. Gou, D., Mishra, A., Weng, Su, L., Chintagari, N.R., Wang, Z., Zhang, H., Gao, L., Wang, P., Stricker, H.M., Liu, L. (2008). Annexin A2 interactions with Rab14 in alveolar type II cells. *J Biol Chem.* 283(19): 13156-13164.
47. Grady, W.M., Carethers, J.M. (2008). Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology.* 135(4): 1079-1099.
48. Gumbiner, B.M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(8): 622-634.
49. Han, F., Shrestha, S., Huang, H., Lv, H.Y., Nie, C., Lin, L., Lu, M.L. (2017). Expression of annexin II in gastric carcinoma and its role in gastric cancer metastasis. *World J Gastroenterol.* 23(38): 7009-7015.
50. Hanahan, D. y Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The Next Generation. *Cell.* 144(5): 646-674.
51. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell.* 100(1): 57-70.
52. Harris, T.J.C., Tepass, U. (2010). Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(7): 502-514.
53. Hayes, M.J., Moss, S.E. (2009). Annexin 2 has a dual role as regulator and effector of v-Src in cell transformation. *J Biol Chem.* 284(15): 10202-10210.
54. Hazan, R.B., Qiao, R., Keren, R., Badano, I., Suyama, K. (2004). Cadherin switch in tumor progression. *Ann NY Acad Sci.* 1014(1): 155-163.
55. He, Q., Liang, C.H., Lippard, S.J. (2000). Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(11): 5768-5772.
56. Hock, R., Furusawa, T., Ueda, T., Bustin, M. (2007). HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol.* 17(2): 72-79.
57. Horiuchi, K., Kawamura, T., Iwanari, H., Ohashi, R., Naito, M., Kodama, T., Hamakubo, T. (2013). Identification of Wilms' tumor 1-associating protein complex and its role in alternative splicing and the cell cycle. *J Biol Chem.* 288(46): 33292-33302.
58. Hugo, H., Ackland, M.L., Blick, T., Lawrence, M.G., Clements, J.A., Williams, E.D., Thompson, E.W. (2007). Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol.* 213(2): 374-383.
59. Hunter, T. (2007). The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell.* 28(5): 730-738.
60. Janda, E., Nevolo, M., Lehmann, K., Downward, J., Beug, H., Grieco, M. (2006). Raf plus TGFbeta-dependent EMT is initiated by endocytosis and lysosomal degradation of E-cadherin. *Oncogene.* 25: 7117-7130.
61. Javaherian, K., Sadeghi, M., Liu, L.F. (1979). Nonhistone proteins HMG1 and HMG2 unwind DNA double helix. *Nucleic Acids Res.* 6(11): 3569-3580.
62. Joshi, S.R., Ghattamaneni, R.B., Scovell, W.M. (2011). Expanding the paradigm for estrogen receptor binding and transcriptional activation. *Mol Endocrinol.* 25(6): 980-994.
63. Jung, H., Kim, J.S., Kim, W.K., Oh, K.J., Kim, J.M., Lee, H.J., Han, B.S., Kim, D.S., Seo, Y.S., Lee, S.C., Park, S.G., Bae, K.H. (2015). Intracellular annexin A2 regulates NF-κB signaling by binding to the p50 subunit: implications for gemcitabine resistance in pancreatic cancer. *Cell Death Dis.* 6(1): e1606.
64. Kaido, M., Wada, H., Shindo, M., Hayashi, S. (2009). Essential requirement for RING finger E3 ubiquitin ligase Hakai in early embryonic development of *Drosophila*. *Genes Cells.* 14(9): 1067-1077.
65. Kang, H.J., Lee, H., Choi, H.J., Youn, J.H., Shin, J.S., Ahn, Y.H., Yoo, J.S., Paik, Y.K., Kim, H. (2009). Non-histone nuclear factor HMGB1 is phosphorylated and secreted in colon cancers. *Lab Invest.* 89(8): 948-959.

66. Kang, R., Chen, R., Zhang, Q., Hou, W., Wu, S., Cao, I., Huang, J., Yu, Y., Fan, X.G., Yan, Z., Sun, X., Wang, H., Wang, Q., Tsung, A., Billiar, T.R., Zeh, H.J. 3rd, Lotze, M.T., Tang, D. (2014). HMGB1 in health and disease. *Mol Aspects Med.* 40: 1-116.
67. Krynetskaia, N.F., Phadke, M.S., Jadhav, S.H., Krynetskiy, E.Y. (2009). Chromatin-associated proteins HMGB1/2 and PDIA3 trigger cellular response to chemotherapy-induced DNA damage. *Molecular Cancer Therapeutics.* 8(4): 864-872.
68. Krynetski, E.Y., Krynetskaia, N.F., Bianchi, M.E., Evans, W.E. (2003). A Nuclear Protein Complex Containing High Mobility Group Proteins B1 and B2, Heat Shock Cognate Protein 70, ERp60, and glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Is Involved in the Cytotoxic Response to DNA Modified by Incorporation of Anticancer Nucleoside Analogues. *Cancer Res.* 63(1): 100-106.
69. Kwon, J.H., Kim, J., Park, J.Y., Hong, S.M., Park, C.W., Hong, S.J., Park, S.Y., Choi, Y.J., Do, I.G. Joh, J.W., Kim, D.S., Choi, K.Y. (2010). Overexpression of high-mobility group 2 is associated with tumor aggressiveness and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 16(22): 5511-5521.
70. Lange, S.S., Vasquez, K.M. (2009). HMGB1: the jack-of-all-trades protein is a master DNA repair mechanic. *Molecular Carcinogenesis.* 48(7): 571-580.
71. Leidovitz, A., Stinson, J.C., McCombs, W.B., McCoy, C.E., Mazur, K.C., Mabry, N.D. (1976). Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 36(12): 4562-4569.
72. Li, B., Shi, H., Wang, F., Hong, D., Lv, W., Xie, X., Cheng, X. (2016). Expression of E-, P- and NCadherin and Its Clinical Significance in Cervical Squamous Cell Carcinoma and Precancerous Lesions. *PLoS One.* 11(5): e0155910.
73. Li, M., Sun, L., Luo, Y., Xie, C., Pang, Y., Li, Y. (2014). High-mobility group box 1 released from astrocytes promotes the proliferation of cultured neural stem/progenitor cells. *Int J Mol Med.* 34(3): 705-714.
74. Li, Y., Kumar, K.G., Tang, W., Spiegelman, V.S., Fuchs, S.Y. (2004). Negative regulation of prolactin receptor stability and signaling mediated by SCF (beta-TrCP) E3 ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol.* 24(9): 4038-4048.
75. Liu, Y., Xie, C., Zhang, X., Huang, D., Zhou, X., Tan, P., Qi, L., Hu, G., Tian, Y., Qiu, Y. (2010). Elevated expression of HMGB1 in squamous-cell carcinoma of the head and neck and its clinical significance. *Eur J Cancer.* 46(16): 3007-3015.
76. Lohr, N., Molleston, J.O., Strauss, K.A., Torres-Martinez, W., Sherman, E.A., Squires, R.H., Rider, N.L., Chikwara, K.R., Cummings, O.W., Morton, D.H., Puffenberger, E.G. (2010). Human ITCH E3 ubiquitin ligase deficiency causes syndromic multisystem autoimmune disease. *Am J Hum Genet.* 86(3): 447-453.
77. López-Otín, C., Matrisian, L.M. (2007). Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer.* 7(10): 800-808.
78. Lotze, M.T., Tracey, K.J. (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol.* 5(4): 331-342.
79. Maeda, S., Hikiba, Y., Shibata, W., Ohmae, T., Yanai, A., Ogura, K., Yamada, S., Omata, M. (2007). Essential roles of high-mobility group box 1 in the development of murine colitis and colitis-associated cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 360(2): 394-400.
80. Majumdar, A., Brown, D., Kerby, S., Rudzinski, I., Polte, T., Randhawa, Z., Seidman M.M. (1991). Sequence of human HMG2 cDNA. *Nucleic Acids Res.* 19(23): 6643.
81. Maniatis, T. (1999). A ubiquitin ligase complex essential for the NF-kappaB, Wnt/Wingless, and Hedgehog signaling pathways. *Genes Dev.* 13(5): 505-510.
82. Mantovani, A. (2009). Cancer: Inflaming metastasis. *Nature.* 457(7225): 36-37.
83. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature.* 454(7203): 436-444.
84. Mantovani, F., Banks, L. (2003). Regulation of the discs large tumor suppressor by a phosphorylation-dependent interaction with the beta-TrCP ubiquitin ligase receptor. *J Biol Chem.* 278(43): 42477-42486.
85. Martínez-Iglesias, O., Casas-País, A., Castosa, R., Díaz-Díaz, A., Roca-Lema, D., Concha, A., Cortés, A., Gago, F., Figueroa, A. (2020). Hakin-1, a new specific small-molecule inhibitor for the E3 ubiquitin-ligase Hakai, inhibits carcinoma growth and progression. *Cancers (Basel).* 12(5): 1340.
86. McGranahan, N., Swanton, C. (2017). Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future. *Cell.* 168(4): 613-628.
87. Merenmies, J., Pihlaskari, R., Laitinen, J., Wartiovaara, J., Rauvala, H. (1991). 30kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane. *J Biol Chem.* 266(25): 16722-16729.

88. Molinari, C., Marisi, G., Passardi, A., Matteucci, L., De Maio, G., Ulivi, P. (2018). Heterogeneity in Colorectal Cancer: A Challenge for Personalized Medicine? *Int J Mol Sci.*, 19(12): 3733.
89. Mukherjee, M., Chow, S.Y., Yusoff, P., Seetharaman, J., Cherlyn, Ng, Saravanan, S., Xiao Woon Koh, Nur Farehan M Asgar, Li, D., Yim, D., Jackson, R.A., Jingxi Yew, Jingru Quian, Iyu, A., Yoon Pin Lim, Xingding Zhou, Siu Kwan Sze, Graeme R Guy, Sivaraman, J. (2012). Structure of a novel phosphotyrosine-binding domain in Hakai that targets E-cadherin. *EMBO J.* 31(5): 1308-1319.
90. Müller, M.F., Ibrahim, A.E.K., Arens, M.J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv.* 469:125-134.
91. Muller, S., Scaffidi, P., Degryse, B., Bonaldi, T., Ronfani, L., Agresti, A., Beltrame, M., Bianchi, M.E. (2001). The double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J.* 20(16): 4337-4340.
92. Munkholm, P. (2003). The incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 18(2):1-5.
93. Nagatani, G., Nomoto, M., Takano, H., Ise, T., Kato, K., Imamura, T., Izumi, H., Makishima, K., Kohno, K. (2001). Transcriptional activation of the human HMG1 gene in cisplatin-resistant human cancer cells. *Cancer Res* 61(4): 1592-1597.
94. Nieto, M.A. (2013). Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science.* 342(6159): 1324850
95. Ogino, S., Goel, A. (2008). Molecular classification and correlates in colorectal cancers. *J Mol Diagn.* 10(1): 13-27.
96. Ogino, S., Nowak, J.A., Hamada, T., Phipps, A.I., Peters, U., Milner, D.A. Jr., Giovannucci, E.L., Nishihara, R., Giannakis, M., Garrett, W.S., Song, M. (2018). Integrative Analysis of Exogenous, Endogenous, Tumour and Immune Factors for Precision Medicine. *Gut.* 67(6): 1168-1180.
97. Ouellet, V., Le Page, C., Guyot, M.C., Lussier, C., Tonin, P.N., Provencher, D.M., Mes-Masson, A.M. (2006). SET complex in serous epithelial ovarian cancer. *In J Cancer.* 119(9): 2119-2126.
98. Palacios, F., Tushir, J.S., Fujita, Y., D'Souza-Shoney, C. (2005). Lysosomal targeting of E-cadherin: a unique mechanism for the down-regulation of cell-cell adhesion during epithelial to mesenchymal transition. *Mol Cell Biol.* 25(1): 389-402.
99. Pardo, M., García, A., Thomas, B., Piñeiro, A., Akoulitchev, A., Dwek, R.A., Zitzmann, N. (2006). The characterization of the invasion phenotype of uveal melanoma tumour cells shows the presence of MUC18 and HMG-1 metastasis markers and leads to the identification of DJ-1 as a potential serum biomarker. *Int J Cancer* 119(5): 1014-1022.
100. Perez-Moreno, M., Jamora, C., Fuchs, E. (2003). Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell.* 112(4): 535-548.
101. Pezzella, F., Harris, A.L., Tavassoli, M., Gatter, K.C. (2015). Blood vessels and cancer much more than just angiogenesis. *Cell Death Discov.* 1:15064.
102. Pouligiannis, G., Ichimura, K., Hamoudi, R.A., Luo, F., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Harrison, D.J., Wyllie, A.H., Arends, M.J. (2010). Prognostic relevance of DNA copy number changes in colorectal cancer. *J Pathol.* 220(3): 338-347.
103. Pusterla, T., de Marchis, F., Palumbo, R., Bianchi, M.E. (2009). High mobility group B2 is secreted by myeloid cells and has mitogenic and chemoattractant activities similar to high mobility group B1. *Autoimmunity.* 42(4): 308-310.
104. Reymond, N., d'Agua, B.B., Ridley, A.J. (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer.* 13(12): 858-70.
105. Rodríguez-Quiroga, M. Análisis de la expresión de la proteína CD26 en relación con otros marcadores de células madre tumorales y estudios funcionales en líneas celulares de cáncer de colon [Tesis Doctoral]. Vigo: Facultad de Biología, Universidad de Vigo; 2017.
106. Rodríguez-Rigueiro, T., Valladares-Ayerbes, M., Haz-Conde, M., Aparicio, L.A., Figueroa, A. (2011). Hakai reduces cell-substratum adhesion and increases epithelial cell invasion. *BMC Cancer.* 11: 474. (A)
107. Rodríguez-Rigueiro, T., Valladares-Ayerbes, M., Haz-Conde, M., Blanco, M., Aparicio, G., Fernández-Puente, P., Blanco, F.J., Lorenzo, M.J., Aparicio, L.A., Figueroa, A. (2011). A novel procedure for protein extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Proteomics* 11(12): 2555-2559. (B)
108. Scaffidi, P., Misteli, T., Bianchi, M.E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 418(6894): 191-195.
109. Sharma, A., Ramanjaneyulu, A., Ray, R., Rajeswari, M.R. (2009). Involvement of high mobility group B proteins in cisplatin-induced cytotoxicity in squamous cell carcinoma of skin. *DNA and cell biology.* 28(7): 311-318.

110. Sharma, A., Ray, R., Rajeswari, M.R. (2008). Overexpression of high mobility group (HMG) B1 and B2 proteins directly correlates with the progression of squamous cell carcinoma in skin. *Cancer Invest.* 26(8): 843-851.
111. Sheflin, L.G., Fucile, N.W., Spaulding, S.W. (1993). The specific interactions of HMG1 and HMG2 with negatively supercoiled DNA are modulated by their acidic C-terminal domains and involve cysteine residues in their HMG 1/2 boxes. *Biochemistry*, 32(13): 3238-3248.
112. Shen, Y., Hirsch, D.S., Sasiela, C.A., Wu, W.J. (2007). CDC42 regulates E-cadherin ubiquitination and degradation through an EGF receptor to SRC-mediated pathway. *J Biol Chem.* 283(8): 5127-5137.
113. Shenoy, S.K., McDonald, P.H., Kohout, T.A., Lefkowitz, R.J. (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated B2-adrenergic receptor and B-arrestin. *Science.* 294(5545): 1307-1313.
114. Shin, Y.J., Kim, M.S., Lee, J., Kang, M., Jeong, J.H. (2013). High-mobility group box 2 (HMGB2) modulates radioresponse and is downregulated by p53 in colorectal cancer cell. *Cancer Biol Ther.* 14(3): 213-221.
115. Shirakawa, H., Yoshida, M. (1992). Structure of a gene coding for human HMG2 protein. *J Biol Chem.* 267(10): 6641-6645.
116. Singh, J., Dixon, G.H. (1990). High mobility group proteins 1 and 2 function as general class II transcription factors. *Biochemistry.* 29(26): 6295-6302.
117. Stebbins, C.E., Russo, A.A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F.U., Pavletich, N.P. (1997). Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: Targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell.* 89(2): 239-250.
118. Stintzing, S., Tejpar, S., Gibbs, P., Thiebach, L., Lenz, H.J. (2017). Understanding the role of primary tumour localisation in colorectal cancer treatment and outcomes. *Eur J Cancer.* 84:69-80.
119. Stros, M. (2010). HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim Biophys Acta.* 1799(1-2): 101-103.
120. Sun, L., Yao, Y., Liu, B., Lin, Z., Lin, L., Yang, M., Zhang, W., Chen, W., Pan, C., Liu, Q., Song, E., Li, J. (2012). MiR-200b and miR-15b regulate chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition in human tongue cancer cells y targeting BMI1. *Oncogene.* 31(4): 432-445.
121. Talmadge, J.E., Fidler, I.J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 70(14): 5649-5669.
122. Tang, D., Kang, R., Zeh, H.J. 3rd, Lotze, M.T. (2010). High-mobility group box 1 and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1799(1): 131-140.
123. Tang, Y., Zhao, X., Antoine, D., Xiao, X., Wang, H., Andersson, U., Billiar, T.R., Tracey, K.J., Lu, B. (2016). Regulation of posttranslational modifications of HMGB1 during immune responses. *Antioxid Redox Signal.* 24(12): 620-634.
124. Testa, U., Pelosi, E., Castelli, G. (2018). Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. *Med Sci (Basel).* 6(2): 31.
125. Thomas, J.O., Travers, A.A. (2001). HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci.* 26(3): 167-174.
126. Tong, W., Jie, Y., Jie, Z., Tian, R., Ji, W., Zhou, Y., Yang, Y., Song, W., Zhang, F., Niu, R. (2015). Anxa2 binds to STAT3 and promotes epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells. *Oncotarget.* 6(31): 30975-30992.
127. Tsanou, E., Peschos, D., Batistatou, A., Charalabopoulos, A., Charalabopoulos, K. (2008). The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. *Anticancer Res.* 28(6A): 3815-26.
128. Umbas, R., Isaacs, W.B., Bringuier, P.P., Schaafsma, H.E., Karthaus, H.F., Oosterhof, G.O., Debruyne, F.M., Schalken, J.A. (1994). Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer Res.* 54(14): 3929-3933.
129. Vakkila, J., Lotze, MT. (2004). Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol.* 4(8): 641-648.
130. van Zijl, F., Krupitza, G., Mikulits, W. (2011). Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res.* 728(1-2): 23-34.
131. Varma, R.R., Hector, S.M., Clark, K., Greco, W.R., Hawthorn, L., Pendyala, L. (2005). Gene expression profiling of a clonal isolate of oxaliplatin-resistance ovarian carcinoma cell line A2780/C10. *Oncol Rep.* 14(4): 925-932.
132. Venerau, E., Casalgrandi, M., Schiraldi, M., Antoine, D.J., Cattaneo, A., De Marchis, F., Liu, J., Antonelli, A., Preti, A., Raeli, L., Shams, S.S., Yang, H., Varani, L., Andersson, U., Tracey, K.J., Bachi, A., Uguccioni, M., Bianchi, M.E.. (2012). Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J Exp Med.* 209(9): 1519-1528.

133. Vleminckx, K., Vakaet, L., Mareel, M., Fiers, W., van Roy, F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*. 66(1): 107-119.
134. Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A. Jr., Kinzler, K.W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science*. 339(6127): 1546-1558.
135. Wang, C.Y., Lin, C.F. (2014). Annexin A2: its molecular regulation and cellular expression in cancer development. *Dis Markers*. 2014: 308976.
136. Wang, L.L., Meng, Q.H., Jiao, Y., Xu, J.Y., Ge, C.M., Zhou, J.Y., Rosen, E.M., Wang, H.C., Fan, S.J. (2012). High-mobility group boxes mediate cell proliferation and radiosensitivity via retinoblastoma-interaction-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Biother Radiopharm*. 27(5): 329-335.
137. Wheelock, M.J., Johnson, K.R. (2003). Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 15(5): 509-514.
138. Whiffin, N., Hosking, F.J., Farrington, S.M., Palles, C., Dobbins, S.E., Zgaga, L., Lloyd, A., Kinnersley, B., Gorman, M., Tenesa, A., Broderick, P., Wang, Y., Barclay, E., Hayward, C., Martin, L., Buchanan, D.D., Win, A.K., Hopper, J., Jenkins, M., Lindor, N.M., Newcomb, P.A., Gallinger, S., Conti, D., Schumacher, F., Casey, G., Liu, T., Campbell, H., Lindblom, A., Houlston, R.S., Tomlinson, I.P., Dunlop, M.G. (2014). Identification of susceptibility loci for colorectal cancer in a genome-wide meta-analysis. *Hum Mol Genet* 23(17):4729-4737.
139. Wu, D., Ding, Y., Wang, S., Zhang, Q., Liu, L. (2008). Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) is associated with progression and poor prognosis in human nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol*. 216(2): 167-175.
140. Wu, Z.B., Cai, L., Lin, S.J., Xiong, Z.K., Lu, J.L., Mao, Y., Yao, Y., Zhou, L.F. (2013). High-mobility group box 2 is associated with prognosis of glioblastoma by promoting cell viability, invasion, and chemotherapeutic resistance. *Neuro Oncol*. 15(9): 1264-1275.
141. Yamoah, K., Brebene, A., Baliram, R., Inagaki, K., Dolios, G., Arabi, A., Majeed, R., Amano, H., Wang, R., Yanagisawa, R., Abe, E. (2008). High-mobility group box proteins modulate tumor necrosis factor-alpha expression in osteoclastogenesis is via a novel deoxyribonucleic acid sequence. *Mol Endocrinol*. 22(5): 1141-1153.
142. Yang, H., Ludbäck, P., Ottosson, L., Erlandsson-Harris, H., Venereau, E., Bianchi, M.E., Al-Abed, Y., Andersson, U., Tracey, K.J., Antoine, D.J. (2012). Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of HMGB1. *Mol Med*. 18: 250-259.
143. Yang, T., Peng, H., Wang, J., Yang, J., Nice, E.C., Xie, K., Huang, C. (2013). Prognostic and diagnostic significance of annexin A2 in colorectal cancer. *Colorectal Dis*. 15(7): e373-381.
144. Yao, X., Zhao, G., Yang, H., Hong, X., Bie, L., Liu, G. (2010). Overexpression of high mobility group box 1 correlates with tumor progression and poor prognosis in human colorectal carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 136(5): 677-684.
145. Ye, X., Weinberg, R.A. (2015). Epithelial-mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. *Trends Cell Biol*. 25(11): 675-686.
146. Zhang, F., Zhang, L., Zhang, B., Wei, X., Yang, Y., Qi, R.Z., Ying, G., Zhang, N., Niu, R. (2009). Anxa2 plays a critical role in enhanced invasiveness of the multidrug resistant human breast cancer cells. *J Proteome Res*. 8(11): 5041-5047. (A)
147. Zhang, J., McCauley, M.J., Maher, L.J. 3^{ed}, Williams, M.C., Israeloff, N.E. (2009). Mechanism of DNA flexibility enhancement by HMGB proteins. *Nucleic Acid Res*. 37(4): 1107-1114. (B)
148. Zhang, Y., Liu, Z., Hao, X., Li, A., Zhang, J., Carey, C.D., Falo, L.D., You, Z. (2018). Tumor-derived high-mobility group box 1 and thymic stromal lymphopoietin are involved in modulating dendritic cells to activate T regulatory cells in a mouse model. *Cancer Immunol Immunother*. 67(3): 353-366.
149. Zhao, Y., Yang, Z., Wu, J., Wu, R., Keshipeddy, S.K., Wright, D., Wang, L. (2017). High-mobility-group protein 2 regulated by microRNA-127 and small heterodimer partner modulates pluripotency of mouse embryonic stem cells and liver tumor initiating cells. *Hepato Comm*. 1(8): 816-830.
150. Zhu, Y., Yu, F., Jiao, Y., Feng, J., Tang, W., Yao, H., Gong, C., Chen, J., Su, F., Zhang, Y., Song, E. (2011). Reduced miR-128 in breast tumor-initiating cells induces chemotherapeutic resistance via Bmi-1 and ABCC5. *Clin Cancer Res*. 17(22): 7105-7115.