



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Grado en Biología

Facultad de Ciencias

Análisis y caracterización de la unión de la proteína humana HMGB1 a distintos lncRNAs asociados a cáncer de ovario

Análise e caracterización da unión da proteína humana HMGB1 a distintos lncRNAs asociados a cancro de ovario

Analysis and characterization of human HMGB1 protein binding to different lncRNAs associated to ovarian cancer

Cora Rey Souto

Director: Ángel José Vizoso Vázquez

Curso: 2020 – 2021 Convocatoria: Septiembre

ABREVIATURAS

µg	microgramo
µL	microlitro
°C	grado Celsius
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EMSA	ensayo de cambio de movilidad electroforética
FA	anisotropía de fluorescencia
g	gramo
h	hora
His	histidina
HMG	grupo de alta movilidad
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
L	litro
LB	Luria-Bertani
LBA	Luria-Bertani suplementado con ampicilina
M	molar
mg	miligramo
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanogramo
nM	nanomolar
OD ₆₀₀	densidad óptica a 600 nm
ORF	marco de lectura abierta
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pH	potencial de hidrógeno
pM	picomolar
r.p.m.	revoluciones por minuto
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Tris HCl	tris hidrocloreuro
UV	ultravioleta
V	voltios

RESUMEN

El cáncer de ovario presenta una tasa relativa de supervivencia a 5 años de sólo el 30-40% como consecuencia de su detección tardía. El diagnóstico en etapas tempranas eleva la tasa de supervivencia hasta más del 90%. Por ello, desarrollar nuevas herramientas de detección precoz supone un reto primordial y, con esta motivación, se investigan interacciones HMGB1-lncRNAs que puedan ser útiles como biomarcadores. HMGB1 es una proteína que se ha asociado repetidamente con varios tipos de cáncer, incluido el de ovario. Los lncRNAs, transcritos no codificantes de proteínas de más de 200 nucleótidos con la capacidad de regular la expresión génica a distintos niveles, se han visto desregulados en células tumorales ováricas. Esto, junto con su especificidad de tejido y etapa de desarrollo y la posibilidad de detectarse en fluidos corporales, los convierte en buenos candidatos como nueva clase de biomarcadores. Además, la estabilidad de los lncRNAs aumenta cuando forman complejos con proteínas. En el presente trabajo, se realiza una primera aproximación experimental a la capacidad de unión de HMGB1 al lncRNA BGas *in vitro* mediante las técnicas Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA, del inglés *Electrophoretic Mobility shift Assay*) y Anisotropía de fluorescencia (FA, del inglés *Fluorescence Anisotropy*).

Palabras clave: cáncer de ovario; hHMGB1; lncRNAs

ABSTRACT

Ovarian cancer has a 5-year survival rate of only 30-40% as a consequence of late detection. Early diagnosis raises the survival rate to more than 90%. Therefore, developing new tools for early detection is a major challenge and, with this motivation, HMGB1-lncRNAs interactions that may be useful as biomarkers are investigated. HMGB1 is a protein that has been repeatedly associated with several types of cancer, including ovarian cancer. LncRNAs, non-coding transcripts of proteins of more than 200 nucleotides with the ability to regulate gene expression at different levels, are deregulated in ovarian tumor cells. This, together with their tissue and developmental stage specificity and the possibility of being detected in body fluids, makes them good candidates as a new class of biomarkers. In addition, the stability of lncRNAs increases when form complexes with proteins. In the present work, a first experimental approach to the binding capacity of HMGB1 to BGas lncRNA *in vitro* is performed using the *Electrophoretic Mobility shift Assay* (EMSA) and *Fluorescence Anisotropy* (FA) techniques.

Key words: ovarian cancer; hHMGB1; lncRNAs

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer de ovario.....	1
1.2. ARN largos no codificantes (lncRNAs)	1
1.3. Proteína HMGB1	2
1.4. Interacciones HMGB1-lncRNAs asociados al cáncer de ovario	3
2. OBJETIVOS	4
3. MATERIAL Y MÉTODOS	5
3.1. Material biológico.....	5
3.2. Técnicas de manipulación y análisis de ácidos nucleicos	5
3.3. Expresión heteróloga y técnicas de manipulación y análisis de proteínas.....	9
3.4. Técnicas de análisis <i>in vitro</i> de interacciones proteína-ácido nucleico	10
3.5. Herramientas bioinformáticas.....	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4.1. Obtención de la proteína HMGB1 y sus dominios funcionales	12
4.2. Obtención y marcaje fluorescente del lncRNA BGas.....	15
4.3. Análisis <i>in vitro</i> de la interacción HMGB1-BGas	17
5. CONCLUSIONES	22
6. BIBLIOGRAFÍA	24

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de ovario

El cáncer de ovario es el octavo tipo de cáncer más común en mujeres. Se estima que se han diagnosticado 314.000 casos nuevos y que han fallecido 207.200 personas a causa de esta enfermedad en 2020 (Sung *et al.*, 2021). En función del tipo de célula en la que se desarrolla, se distingue entre cáncer de ovario germinal, estromal o epitelial, siendo este último el responsable de más del 90% de los casos. A su vez, dada la heterogeneidad histológica, el cáncer de ovario epitelial se clasifica en cinco histotipos: seroso de alto grado (incidencia del 70%), seroso de bajo grado (<5%), endometriode (10%), células claras (10%) y mucinoso (3%). Las diferencias histológicas están asociadas a diferencias en el origen (puede originarse en otros tejidos ginecológicos y afectar al ovario de forma secundaria), patogenia, alteraciones moleculares y factores de riesgo genéticos y ambientales (Reid, Permuth and Sellers, 2017; Stewart, Ralyea and Lockwood, 2019).

El principal reto frente al cáncer de ovario es conseguir una detección temprana. Generalmente, se diagnostica en un estadio avanzado de la enfermedad, lo que conlleva una tasa relativa de supervivencia a 5 años de sólo el 30-40%. Se debe a que, siendo un tumor de carácter asintomático durante su aparición y desarrollo inicial, no se dispone de métodos eficaces de detección precoz. La clara ventaja que supone el diagnóstico en una etapa temprana, cuando el tumor aún está localizado en los ovarios, se refleja en un aumento de la tasa hasta el 92% (Reid, Permuth and Sellers, 2017). Por ello, existe una necesidad urgente de descubrir biomarcadores que superen a los actuales basados en proteínas y, en este sentido, se postulan prometedores paneles de biomarcadores que combinen proteínas con ácidos nucleicos (Ueland, 2017).

1.2. ARN largos no codificantes (lncRNAs)

Con la llegada de las nuevas tecnologías de secuenciación se ha revelado que, a diferencia de lo que se había asumido, la mayor parte del genoma es transcrito a ARNs que no codifican proteínas (ARNs no codificantes) (Mattick, 2011). Los ARN largos no codificantes (lncRNAs, por sus siglas en inglés *Long non-coding RNAs*) son aquellos transcritos que se presume que no codifican proteínas que tienen una longitud superior a 200 nucleótidos. Inicialmente eran considerados como "ruido transcripcional", pero multitud de estudios han demostrado que tienen un papel crucial en la regulación de la expresión génica a distintos niveles (transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traduccional), siendo en muchos casos fundamental su interacción con proteínas (Wang and Chang, 2011; Mercer and Mattick, 2013; Yang *et al.*, 2018).

Se ha demostrado que los lncRNA son factores clave en el origen y desarrollo de diversos tipos de cáncer, pudiendo actuar como promotores o supresores tumorales (Huarte, 2015; Nandwani, Rathore and Datta, 2021). La expresión diferencial de lncRNAs en células tumorales suscitó su enorme interés como nueva clase de biomarcadores de cáncer, que se vio acentuado al descubrir que exhiben una alta especificidad de tejido y de etapa de desarrollo y son fácilmente detectables en fluidos corporales (Bolha, Ravnik-Glavač and Glavač, 2017; Gutschner *et al.*, 2018).

Concretamente en el contexto del cáncer de ovario, se ha descrito la asociación entre la disregulación de varios lncRNAs y diversos procesos como la proliferación, crecimiento tumoral, control del ciclo celular, apoptosis, migración, invasión, metástasis y angiogénesis. Además, se ha correlacionado dicha expresión aberrante con parámetros clinicopatológicos (el subtipos histológicos, la estadificación, el tamaño del tumor o la metástasis), así como con la supervivencia de los pacientes. Todo ello apoya su gran potencial como biomarcadores específicos de cáncer de ovario (Wang, Lu and Chen, 2019; Salamini-Montemurri *et al.*, 2020).

1.3. Proteína HMGB1

La proteína humana HMGB1, perteneciente a la familia *High Mobility Group Box* (HMGB), está compuesta por 215 residuos aminoácidos y se caracteriza por presentar dos dominios de unión a ADN en tándem, HMG box-A (aa 1-79) y HMG box-B (aa 89-163), y una cola acídica C-terminal (aa 186-215) (Figura 1) (Ugrinova and Pasheva, 2017).

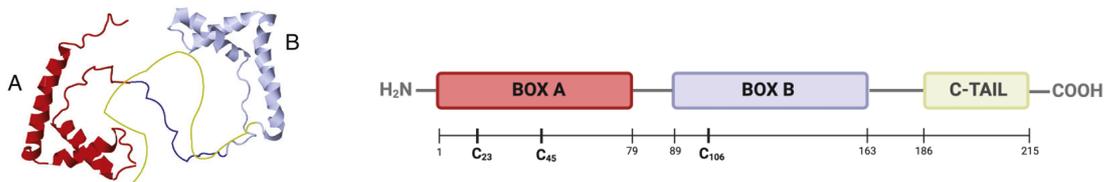


Figura 1. Esquema de la estructura de HMGB1. Contiene dos dominios HMG de unión a ADN, formados por tres α -hélices plegadas dando una característica forma de L, y una cola C-terminal, consistente en una sucesión consecutiva de glutamato y aspartato con una estructura extendida y flexible. Presenta tres residuos de cisteína susceptibles a redox.

HMGB1 fue descubierta por primera vez en el núcleo y se ha descrito convencionalmente como proteína cromosómica no histona, pero también se localiza en el citoplasma y en el medio extracelular. Se trata de una proteína multifuncional, que en el núcleo participa en procesos como la estabilidad genómica, la transcripción y la reparación de ADN, en el citoplasma promueve la autofagia y limita la apoptosis, y en una localización extracelular actúa como alarma de señalización al daño. Su liberación al medio extracelular puede producirse mediante la secreción activa por células inmunes estimuladas o la secreción pasiva por células necróticas. Además de depender de la ubicación, su actividad biológica está regulada por las modificaciones postraduccionales y el estado redox de los residuos de cisteína (Barreiro-Alonso *et al.*, 2016; Ugrinova and Pasheva, 2017).

La sobreexpresión de HMGB1 está fuertemente asociada con los sellos distintivos del cáncer (*Hallmarks of cancer*, en inglés) en distintos tipos de cáncer, entre los que se incluye el de ovario (Tang *et al.*, 2010; Ranzato, Martinotti and Patrone, 2015; Barreiro-Alonso *et al.*, 2016). De hecho, HMGB1 se ha propuesto repetidamente como un biomarcador de diagnóstico y pronóstico del cáncer de ovario (Lee and Song, 2013; Wang *et al.*, 2015; Paek *et al.*, 2016; Machado *et al.*, 2017).

Por otra parte, cabe destacar que, si bien HMGB1 es una proteína bien establecida como proteína de unión a ADN, un número creciente de estudios revela su capacidad para interactuar con distintos tipos de ARN (Bell *et al.*, 2008; Yanai *et al.*, 2009; Castello *et al.*, 2016; Sofiadis *et al.*, 2021), incluidos lncRNAs (Saayman *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2017). Profundizar en su novedoso papel como proteína de unión a ARN es fundamental para ampliar el conocimiento sobre sus mecanismos moleculares e implicaciones fisiológicas y patológicas.

1.4. Interacciones HMGB1-lncRNAs asociados al cáncer de ovario

Conocer las interacciones de una proteína asociada a una enfermedad proporciona una herramienta valiosa para comprender los mecanismos moleculares de patogéneiss y determinar nuevos biomarcadores. Particularmente en el caso de HMGB1 con relación al cáncer de ovario, es de gran relevancia la identificación de sus interacciones específicas en un contexto ovárico, teniendo en cuenta que es una proteína con múltiples funciones involucrada en otras muchas enfermedades (Ugrinova and Pasheva, 2017). Por otra parte, se ha visto que los lncRNAs son moléculas implicadas en el cáncer de ovario, y numerosos estudios subrayan que la formación de complejos con proteínas es fundamental en términos de mejora de su estabilidad y desarrollo de sus funciones (Salamini-Montemurri *et al.*, 2020). Por tanto, la investigación de interacciones HMGB1-lncRNAs asociadas a cáncer de ovario puede ser útil en la búsqueda de nuevos biomarcadores, y a su vez podría permitir el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas.

Saayman *y col.* (2016) identificaron un lncRNA antisentido de 240 pb localizado en el intrón 11 del gen *CFTR*, designado como BGas (BG213071), que contribuye a la patogénesis de la fibrosis quística a través de la regulación transcripcional de *CFTR*. Por otra parte, a partir de un experimento tipo *pull-down* en células CFPAC-1 en el que utilizaron BGas como cebo, encontraron su asociación con HMGB1 y otras proteínas del grupo de alta movilidad. Por ello, han propuesto que el lncRNA BGas interactúa con estas proteínas para reclutarlas en el locus *CFTR*, donde actúan como remodeladoras de la cromatina causando la interrupción de la actividad de la RNA polimerasa II (Saayman *et al.*, 2016). Se postula que BGas puede estar implicado a su vez en la regulación de otros genes a través de su interacción con HMGB1, no obstante, por ahora se desconoce si es directa o mediada por otra moléculas.

En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio preliminar *in vitro* de la interacción entre HMGB1 y el lncRNA BGas, con el que se inició la puesta a punto de una metodología dirigida a la caracterización funcional y estructural de interacciones HMGB1-lncRNAs.

2. OBJETIVOS

El presente Trabajo de Fin de Grado, desarrollado en el grupo EXPRELA (Regulación de la expresión génica y aplicaciones), tiene como objetivos principales **determinar la capacidad de HMGB1 para unirse al lncRNA BGas *in vitro* y analizar la implicación de los dominios HMG-box** (comparando la interacción de la proteína de longitud completa, del didominio HMG-box y de los dominios individuales HMG-boxA y HMG-BoxB). Referido a los objetivos específicos, se propone:

- **Obtener la proteína HMGB1 de longitud completa, los dos dominios HMG-box en tándem (tándem-AB) y los dominios individuales HMG-boxA y HMG-boxB.** En el proceso de producción de las proteínas recombinantes se incluyen las etapas de clonaje, sobreexpresión heteróloga y purificación.
- **Obtener el lncRNA BGas sin marcar y marcado con fluorescencia.** Para ello se realiza el clonaje, la transcripción *in vitro*, la purificación del ARN y su marcaje fluorescente.
- **Analizar las interacciones proteína-lncRNA *in vitro*** mediante las técnicas Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA, del inglés *Electrophoretic Mobility shift Assay*) y Anisotropía de fluorescencia (FA, del inglés *Fluorescence Anisotropy*).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

3.1.1. Cepas bacterianas

Para la propagación de plásmidos se utilizó la cepa de *E. coli* ECOS™ Blue [XL1-Blue] de YEASTERN Biotech (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proABlacIqZDM15 Tn10 (TetR)]).

Para el clonaje mediante la tecnología *Gateway*® (Thermo Fisher Scientific) se utilizó la cepa de *E. coli* One Shot™ OmniMAX™ 2 T1R de Thermo Fisher Scientific (F' {proAB lacIq lacZΔM15 Tn10(TetR) Δ(ccdAB)} mcrA Δ(mrr hsdRMS-mcrBC) Φ 80(lacZ) ΔM15Δ (lacZYA-argF) U169endA1 recA1 supE44 thi1 gyrA96 relA1 tonA panD).

Para la expresión heteróloga de proteínas recombinantes se utilizaron las cepas de *E. coli* BL21(DE3) de Novagen (F' ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3)) y B834(DE3)pLysS de Novagen (F' ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm met (DE3)).

3.1.2. Vectores plasmídicos

Para el clonaje de proteínas mediante la tecnología *Gateway* (Thermo Fisher Scientific) se utilizó el vector donante pDONR™221 (kan^r cm^r ccdB ori) (Thermo Fisher Scientific) y los vectores destino pDest-527 (amp^r cm^r ccdB ori T7 promoter 6xHis) (Addgene #11518) y pDest-566 (amp^r cm^r ccdB ori T7 promoter 6xHis-MBP) (Addgene #11517).

Para el clonaje del lncRNA mediante *CloneJET PCR Cloning Kit* (Thermo Fisher Scientific) se utilizó el vector pJET1.2/blunt (amp^r eco47IR ori).

3.1.3. Medios de cultivo

Las bacterias se cultivaron en los medios Luria-Bertani (LB; 1% bactotripton, 0.5% extracto de levadura, 0.5% NaCl) o Terrific-Broth (TB; 1.2% bactotripton, 2.4% extracto de levadura, 0.4% glicerol) suplementados con el antibiótico de selección adecuado (ampicilina 100 μg/mL o kanamicina 30 μg/mL). En el caso de requerir medios sólidos se complementaron con Bacto-Agar al 1.5%.

3.2. Técnicas de manipulación y análisis de ácidos nucleicos

3.2.1. Aislamiento y purificación de ADN

Las extracciones de ADN genómico y ADN plasmídico se realizaron mediante los kits comerciales *NZY Tissue gDNA Isolation kit* (NZYTech) y *GeneJET Plasmido Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific), respectivamente, siguiendo las indicaciones suministradas por el fabricante.

En el caso del ADN utilizado como molde en reacciones de PCR para la comprobación de colonias transformantes (PCR de colonias), se aisló sometiendo la suspensión celular a 95°C durante 5 min para producir la lisis bacteriana, agitando en *vórtex* 3 s y centrifugando durante 5 min a 13.000 rpm, para finalmente recoger el sobrenadante.

La purificación de productos de PCR se realizó mediante el kit comercial *NZYGelpure kit* (NZYTech) o a través del método tradicional de precipitación con alcohol en presencia de concentraciones moderadas de cationes monovalentes. En este último caso el protocolo a seguir fue: añadir a la muestra de ADN un 10% (v/v) de acetato sódico y 10 volúmenes de etanol 100%, recuperar el ADN precipitado por centrifugación, someterlo a un lavado con etanol al 70%, recentrifugar, secar y resuspender en tampón Tris-EDTA (Tris-HCl 10mM, pH 8,0, EDTA 1mM).

3.2.2. Cuantificación y evaluación de la pureza de ácidos nucleicos

Las muestras de ADN o ARN se cuantificaron mediante la medida de absorbancia a 260 nm empleando el espectrofotómetro *Eppendorf BioPhotometer® D30* (Eppendorf). Para evaluar la pureza se consideraron los parámetros A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} .

3.2.3. Reacción en cadena polimerasa (PCR)

En reacciones de PCR de colonias se utilizó la ADN polimerasa *NZYTaq II DNA Polymerase* (NZYTech), mientras que para el resto de las aplicaciones (amplificación de ADN para clonación, mutagénesis dirigida por PCR o amplificación de ADN molde para transcripción *in vitro*), en las que se requirió una alta fidelidad, se utilizó la ADN polimerasa con actividad correctora 3' exonucleasa *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific).

La mezcla de reacción estándar para las amplificaciones con la polimerasa *Taq* fue: NZYTaq II 2× Colourless Master Mix (1X), cebadores (0,4 uM) y ADN molde (~50 ng). Con el uso de *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* la mezcla consistió en: *buffer HF o GC Phusion* (1X; 1.5 mM MgCl₂), mezcla de dNTPs (200 uM), cebadores (0,5 uM), ADN molde (~50 ng) y *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (2U).

La programación general fue la siguiente: (1) una etapa de desnaturalización inicial a 98°C (*Phusion pol*) o 95°C (*Taq pol*) durante 3 min; (2) 34 ciclos compuestos por una fase de desnaturalización de 15 s a 98°C (*Phusion pol*) o 95°C (*Taq pol*), una fase de hibridación de 30 s a una temperatura dependiente de la temperatura de fusión de los cebadores y una fase de extensión a 72°C de una duración dependiente de la longitud del fragmento a amplificar y la procesividad de la polimerasa; (3) una etapa de elongación final a 72°C durante 10 min.

Los cebadores empleados, suministrados por Eurofins, se recogen en la *Tabla 1*.

Tabla 1 Oligonucleótidos empleados en reacciones de PCR. Las letras W y C hacen referencia a la cadena Watson y a la cadena Crick, respectivamente.

Nombre	Secuencia	Hebra
AJVV001f	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGCAAGCTCTTCTGAA AA CCTGTATTTCCAGGGCATGGGCAAAGGAGATCCTAAGAAGCCG-3'	W
AJVV002r	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTATTATTCATCATCAT CATCTTCTTTCATCTTCATCTTC-3'	C
AJVV003f	5'-CCCAAAGGGTAGTTTAAAGACCCAGCTTTCTGTACAAAGTGGTGA TATCG-3'	W
AJVV004r	5'-TTAAAACTACCCTTTGGGAGGGATATAGGTTTTTCATTTCTTTCAT AACGGG-3'	C
AJVV005f	5'-CAGGGCATGAAGTTCAAGGATCCCAATGCACCCAAGAGGCCTCC-3'	W

AJVV006r	5'-CTTGAACCTTCATGCCCTGGAAATACAGGTTTTTCAGAAGAGCTTGCG AAGC-3'	C
AJVV007f	5'-TATCGAGCTTAGTTTTAAGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTGAT ATCG-3'	W
AJVV008r	5'-TTAAAACCTAAGCTCGATATGCAGCAATATCCTTTTCGTATTTTCCTT CAGC-3'	C
AJVV127f	5'-TTCCAAGTCTAGATGTAATATATTAAGAAACAGATCAAC-3'	W
AJVV132r	5'-TGGGCAACAAGGCGAGACTCTCAAAGAGGATATACTTCATTCCTCAA AAGGCCTTCTCCAGGAATAGTATTCATAAC-3'	C
AJVV188f	5'-TTTCATAACAGAATCCTTGATGGTTAAGCAGCTGGTGCCAGCAC-3'	W
AJVV189r	5'-AAGGATTCTGTTATGAAATACTATTCCTGGAAGAAGGCCTTTTGAGG-3'	C
AJVV140f	5'-TAATACGACTCACTATAGGGTTCCAAGTCTAGATGTAATATATTAAG AAACAGATCAAC-3'	W
T7f	5'-TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCG-3'	W
T7r	5'-AGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	C

3.2.4. Digestión con enzimas de restricción

La digestión con *DpnI* se realizó incubando productos de PCR (50 μ l) con 2 μ l de *DpnI* de NZYTech (500 U) a 37°C durante 1h 30 min.

3.2.5. Transformación de bacterias mediante choque térmico

Las células químicamente competentes (50 μ l) se descongelaron en hielo y se añadieron ~0,5 ng del ADN. Al cabo de 30 min de incubación en hielo, las células fueron sometidas a un choque térmico a 42°C durante 45 s y se mantuvieron 2 min en hielo nuevamente. La recuperación se realizó por incubación en LB a 37°C con agitación (200 r.p.m.) durante 1h para, finalmente, ser sembradas en placas selectivas con el antibiótico adecuado.

3.2.6. Técnicas de clonaje

La tecnología de clonación *Gateway* (Thermo Fisher Scientific) se basa en dos reacciones de recombinación: reacción BP y reacción LR. La reacción BP se llevó a cabo incubando a 25°C durante 3 h la mezcla de reacción constituida por 1 μ l del producto attB-PCR (75-100 ng/ μ l), 1 μ l del vector pDONR221™ (50 ng/ μ l) y 0,5 μ l de BP Clonase II Master. La reacción LR transcurrió incubando a 25°C durante 3 h la mezcla de reacción constituida por 1 μ l del vector de entrada (50 ng/ μ l), 1 μ l del vector destino (50 ng/ μ l) y 0,5 μ l de BP Clonase II Master. Tras cada reacción se realizó la transformación en células competentes One Shot OmniMAX™ 2-T1^R y se cultivaron en medio LB suplementado con el antibiótico adecuado.

El clonaje utilizando el kit *CloneJET PCR Cloning Kit* (Thermo Fisher Scientific) consistió en incubar a 22°C durante 3 horas la siguiente mezcla de reacción: 5 μ l 2X tampón de reacción, 0,5 μ l Ligasa de ADN T4, 25 ng pJET1.2/blunt (50 ng/ μ l), hasta 4 μ l inserto (encontrándose en proporción 5:1 (inserto:vector)) y H₂O para un volumen final de 10 μ l. El producto de ligación se transformó en células *E. coli* ECOSBlue sembradas en placas de LB con ampicilina (LBA).

3.2.7. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

El análisis de muestras de ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7-2% (dependiendo del rango de tamaño de las moléculas a separar) preparados en tampón TAE (Tris 40mM, EDTA 1mM, acetato sódico 20 mM, ácido acético 30mM). El tampón de carga empleado fue el 6X NZYDNA Loading Dye (NZYTech) y para la visualización del ADN se utilizó el fluoróforo intercalante *GelGreenTM* (Biotium). Como referencia de tamaños moleculares se seleccionó según convenía el marcador *GeneRulerTM 1kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific) o el marcador *NZYDNA Ladder V* (NZYTech). El revelado se realizó exponiendo los geles a luz UV en un transiluminador *Molecular Imager Gel Doc XR+* (BioRad) y se utilizó el programa *Image Lab* (BioRad).

3.2.8. Anillamiento de oligonucleótidos

Para obtener moléculas de ADN dúplex a partir de los oligonucleótidos complementarios, una mezcla equimolar de los mismos se calentó a 95°C y se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente en oscuridad. Los oligonucleótidos fueron adquiridos en Eurofins y sus secuencias se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos complementarios empleados para obtener ADN dúplex. Las letras W y C hacen referencia a la cadena Watson y a la cadena Crick, respectivamente.

Nombre	Secuencia	Hebra	Fluoróforo
AVV234	5'-GAAGAGCGATATCGCGTGCG-3'	W	5'-FAM
AVV234NO	5'-GAAGAGCGATATCGCGTGCG-3'	W	-
AVV235	5'-CGCACGCGATATCGCTCTTC-3'	C	-

3.2.9. Transcripción *in vitro*

La síntesis de ARN con el kit *HiScribeTM T7 High Yield RNA Synthesis* (NEB) se realizó mediante la incubación a 37°C durante 24 h de la siguiente mezcla de reacción: 10 µl de NTP Buffer Mix, 2 µl de T7 RNA Polymerase Mix, 1 µg de ADN molde y H₂O hasta un volumen final de 30 µl. Para eliminar el ADN molde, se incubó la muestra 1h a 37°C con 2 µl de DNasa (casa comercial) y 45 µl de H₂O.

3.2.10. Purificación de ARN

Para la purificación de ARN se utilizó el kit *Monarch RNA Cleanup Kit T2050* (NEB), siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante.

3.2.11. Electroforesis capilar

El análisis de muestras de ARN se realizó mediante electroforesis capilar en el SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación) de la UDC, empleando el bioanalizador *Bioanalyzer Agilent 2100* con el kit *Agilent RNA 6000 Pico Kit* de Agilent Technologies.

3.2.12. Marcaje fluorescente de ARN

El marcaje de ARN transcrito *in vitro* con Fluoresceína-5-maleimida (adquirida en MedChemExpress) se realizó con *5' EndTag™ Nucleic Acid Labeling System* (Vector Laboratories). En primer lugar, se incubó durante 30 min a 37°C la siguiente mezcla: 1 μ l tampón de reacción, 4 μ l de ARN (~0.6 nmoles de *5' ends*), 1 μ l fosfatasa alcalina y H₂O hasta V_f=10 μ l. A continuación, se adicionaron 2 μ l de buffer de reacción, 1 μ l de ATP γ S, 2 μ l de polinucleótido quinasa de T4 y H₂O hasta V_f=20 μ l, y la mezcla resultante se incubó a 37°C durante 30 min. Para realizar el marcaje se incubó durante 30 min a 65°C con 10 μ l de Fluoresceína-5-maleimida. Transcurrido dicho tiempo, se añadieron 70 μ l de H₂O y 100 μ l de fenol, se centrifugó y se recogió la fase acuosa superior, a la que se añadieron 5 μ l de precipitante y 270 μ l de etanol al 95%. Tras mantener la mezcla a -80°C durante 30 min, el ARN se precipitó por centrifugación a 13.000 r.p.m durante 30 min, se lavó con etanol al 75% y de nuevo se precipitó a 13.000 r.p.m durante 10 min. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y la muestra se resuspendió en 50 μ l de H₂O.

3.3. Expresión heteróloga y técnicas de manipulación y análisis de proteínas

3.3.1. Expresión heteróloga de proteínas

Las bacterias *E. coli* fueron transformadas con el vector de expresión y sembradas en medio LBA. Para llevar a cabo la expresión, se cultivaron en el medio líquido escogido (suplementado con ampicilina) a 37°C con agitación (200 r.p.m) y al alcanzar una densidad celular correspondiente a una OD₆₀₀=0,8 se adicionó el IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido). Tras 3 o 24 h a 37°C y 200 r.p.m de agitación, las células se recogieron por centrifugación a 5.000 r.p.m durante 10 min y se conservaron a -80°C.

3.3.2. Purificación de proteínas recombinantes

Los pellets celulares se resuspendieron en 5 volúmenes de buffer de lisis (Tris-HCl 50mM pH 8, NaCl 250mM, DTT 1mM, lisozima 0,5 mg/mL (Lysozyme BioChemica) e inhibidores de proteasas 0,2M (fluoruro de fenilmetilsulfónido, pepstatina A y benzamidina)). A continuación, la suspensión celular fue sometida a un proceso de lisis mediante sonicación durante 5 min realizando ciclos de sonicación de 2 s al 70% de amplitud con descansos de 7 s. Tras la clarificación por centrifugación a 18.000 rpm durante 1 h, el sobrenadante se filtró a través de filtros jeringa de PVDF hidrofílico de tamaño de poro 0,22 μ m (Filter-LAB). Para llevar a cabo la purificación por cromatografía de afinidad, el filtrado obtenido se cargó en una columna HisTrap HP 5mL (GE Healthcare) equilibrada con *Wash Buffer A* (Tris-HCl 50mM pH8, NaCl 250mM, DTT 1mM, Glicerol 5%) mediante una bomba peristáltica (GE Healthcare). La elución se llevó a cabo con el sistema ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare) mediante un gradiente lineal de 0% a 100% de *Elution buffer B* (Tris-HCl 50mM pH8, NaCl 250mM, DTT 1mM, Glicerol 5%, 300 mM Imidazol). Las fracciones seleccionadas se concentraron por ultrafiltración mediante filtros de centrifuga Ultra Ultracell-3K (Amicon). A continuación, se purificaron por cromatografía de exclusión molecular utilizando la columna HiLoad 16/600 Superdex 75 pg (GE Healthcare) acoplada al sistema ÄKTA Prime plus (GE Healthcare), equilibrada con la fase móvil (buffer Tris-HCl pH8 25mM, NaCl 50mM, DTT 1mM). De nuevo, las proteínas fueron concentradas empleando filtros de centrifuga Ultra Ultracell-30K (Amicon).

3.3.3. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante la medida de absorbancia a 280 nm empleando el espectrofotómetro *Eppendorf BioPhotometer® D30* (Eppendorf).

3.3.4. Electroforesis desnaturizante de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El análisis de proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) con el método Laemmli empleando un sistema *Mini PROTEAN(3) 3 Cell* (BioRad). El gel concentrador se preparó al 5% de acrilamida y el gel separador entre el 12-15%. Las muestras fueron desnaturizadas en el tampón de carga Laemmli buffer x4 (250mM Tris-HCl(pH 6.8), 8% SDS, 40% glycerol, 8% beta-mercaptoethanol, and 0.02% bromophenol blue, 500 mM DTT) mediante una incubación a 95°C de 10 min. La electroforesis se llevó a cabo en el tampón Tris-glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 0,2 M, SDS 0,1%) y se utilizó como marcador de pesos moleculares *NZYColour Protein Marker II* (NZYTech). La tinción de geles se realizó con una solución de tinción comercial *ProBlue Safe Stain* (Coomassie) (GiottoBiotech) y para su visualización se utilizó el equipo *Molecular Imager Gel Doc XR+* (BioRad) y el software ImageLab (BioRad).

3.4. Técnicas de análisis *in vitro* de interacciones proteína-ácido nucleico

3.4.1. Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

En el ensayo con BGas las mezclas de reacción (25 μ l) se prepararon con 10 μ l de BGas marcado con 5'-5-MF y distintas cantidades de HMGB1 (1 μ g y 2 μ g). En el ensayo con ADN^{TA} (5'-GAAGAGCGATATCGCGTGCG-3') las mezclas de reacción (25 μ L) se prepararon con 50 nM de ADN^{TA} marcado con 5'FAM y distintas concentraciones de la proteína HMGB1 (0,8 y 8,2 μ M), utilizando como competidores ADN^{TA} (100 μ M) o lncRNA BGas (55 μ M) no marcados. El buffer empleado fue en todos los casos *Lambert Binding Buffer* (Tris-HCl 4 mM pH8, MgCl₂ 4 mM, KCl 100 mM). Tras incubar las muestras durante 30 min a 4°C, se analizaron mediante un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 5% en buffer TBE (100 mM Tris base, 100 mM ácido bórico, 2mM EDTA) llevando a cabo la electroforesis a 100 V durante 40 min a temperatura ambiente. La detección del fluoróforo FAM se realizó en un equipo *Typhoon FLA 7000* (GE Healthcare), utilizando el láser de 473 nm y el filtro Y520. Los softwares utilizados fueron Typhoon FLA 7000 Control Software v1.2 (GE Healthcare) e ImageQuant TL (GE Healthcare).

3.4.2. Anisotropía de fluorescencia (FA)

Los ensayos de anisotropía de fluorescencia se llevaron a cabo utilizando placas *384-well Well Low Volume Black Round Bottom Polystyrene NBS™ Microplate* (Corning) con 15 μ l de muestra por pocillo y el equipo en *Multi-modal Synergy™ H1 plate reader* (Biotek®). Las medidas se realizaron con el filtro de polarización de fluorescencia instalado y con longitudes de onda de excitación y detección de 485 y 528 nm, respectivamente. En ensayos de saturación se midió la anisotropía de fluorescencia utilizando una concentración fija del 5'FAM-ADN^{TA} (50 nM) con concentraciones crecientes de proteína (HMGB1, tándem-AB, HMG-BoxA o HMG-BoxB). En ensayos de competición se midió la anisotropía empleando concentraciones fijas de 5'FAM-ADN^{TA} (50 nM) y proteína (HMGB1, tándem-AB, HMG-BoxA y HMG-BoxB) con

concentraciones crecientes del ligando competidor (lncRNA BGas). El período de incubación establecido fue de 30 min a 4°C. A partir de los valores de anisotropía se representó el porcentaje de ligando unido en función de la concentración de proteína o de competidor. Utilizando el *software* Graphpad Prism 7.0 se realizó, en ensayos de unión, el ajuste al modelo *saturation-binding* con regresión no lineal y la determinación de K_D y, en ensayos de competencia, el ajuste al modelo *competitive-binding* con regresión no lineal y la determinación de IC_{50} .

3.5. Herramientas bioinformáticas

Las secuencias se obtuvieron del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para el diseño de oligonucleótidos se utilizaron los programas OligoCalc de Biotoools (<http://biotoools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) y NetPrimer de PREMIER Biosoft (<https://www.premierbiosoft.com/netprimer/>).

Los parámetros físicos y químicos de las proteínas se obtuvieron con la herramienta ProtParam de ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de la proteína HMGB1 y sus dominios funcionales

La producción de las proteínas recombinantes involucró las siguientes etapas: clonaje de la secuencia de interés en un vector de expresión, transformación en las células hospedadoras e inducción de la expresión para, finalmente, someter la proteína a un proceso de purificación.

En el presente trabajo se llevó a cabo la producción proteica en *Escherichia coli* mediante un sistema de expresión basado en el promotor y la RNA polimerasa del fago T7. En los vectores de expresión empleados la expresión heteróloga estaba dirigida por el promotor T7 y las cepas de *E. coli* hospedadoras contenían el profago λ DE3, el cual transporta el gen de la T7 RNA polimerasa bajo control del promotor *lacUV5* inducible por IPTG (Figura 2).

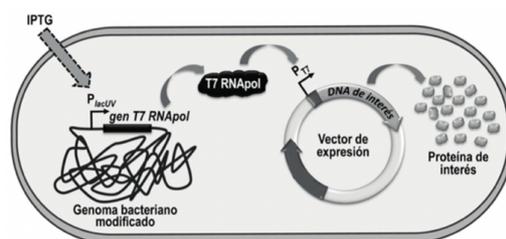


Figura 2. Sistema de expresión basado en el promotor y RNA pol del fago T7. El inductor IPTG se une al represor *lacI* estimulando la producción de la T7 RNA pol, que dirige la transcripción del gen bajo control del promotor T7 para, finalmente, obtener la proteína correspondiente.

La estrategia de purificación de las proteínas obtenidas consistió en el uso combinado de cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión molecular. Los vectores de expresión estaban diseñados para expresar las proteínas fusionadas a una cola de poli-histidinas con el propósito de poder ser purificadas por cromatografía de afinidad con un metal inmovilizado (*Immobilized Metal Affinity Chromatography* o IMAC), basada en la afinidad de múltiples histidinas en tándem por iones metálicos como el Ni^{2+} . Con la cromatografía de exclusión molecular se pretendía mejorar el grado de pureza al permitir separar las proteínas en función de su radio hidrodinámico (propiedad determinada por el tamaño y la forma).

4.1.1. Obtención de los vectores de expresión

Para la construcción de los vectores de expresión se seleccionó el plásmido pDest527, diseñado para la expresión heteróloga en *E. coli* de proteínas fusionadas con la etiqueta His_6 (en el extremo N-ter) bajo el control del promotor T7.

La construcción pDest527-HMGB1 (codificante de la proteína HMGB1 de longitud completa; residuos 1-215) se obtuvo mediante la tecnología Gateway, que se basa en dos reacciones de recombinación:

- Reacción BP (Figura 3): Consistió en la transferencia de la ORF de HMGB1 (flanqueada por sitios *attB*) al vector donante pDONR221 (que contiene sitios *attP*) (kan^r) para generar el vector de entrada (con el inserto flanqueado por sitios *attL*). El gen letal *ccdB* del vector donante es sustituido por el gen de interés evitando la aparición de falsos positivos. La ORF de HMGB1

flanqueada por sitios attB se obtuvo previamente por PCR empleando como molde la construcción pGBKT7-AD-HMGB1 (cedida por Dra. Aída Barreiro Alonso) y los cebadores AJVV001f y AJVV002r. La transformación del vector de entrada se realizó en células competentes One Shot OmniMAX 2-T1^R (sensibles al producto proteico del gen ccdB) y se llevó a cabo la selección de transformantes en medio LB suplementado con kanamicina, para seguidamente extraer el ADN plasmídico.

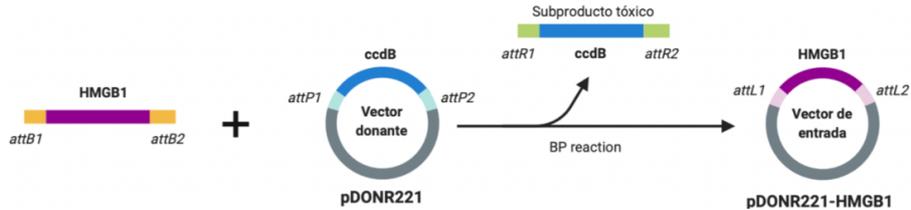


Figura 3. Esquema de la reacción de clonaje BP.

- Reacción LR (Figura 4): Permite la transferencia de la ORF de HMGB1 desde el vector de entrada al vector destino pDest527 (que contiene sitios attR) (amp^r) para crear el vector de expresión pDest527-HMGB1 (con el inserto flanqueado por sitios attB). El gen letal ccdB del vector destino es sustituido por el gen de interés evitando la aparición de falsos positivos. De nuevo se realizó la transformación en células One Shot OmniMAX 2-T1^R, los recombinantes se seleccionaron en medio LB suplementado con ampicilina (LBA) y se aisló el ADN plasmídico.

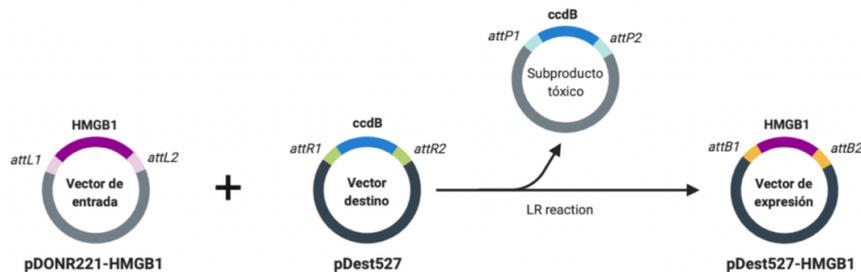


Figura 4. Esquema de la reacción de clonaje LR.

Tanto el producto attB-PCR, como el ADN plasmídico obtenido tras cada reacción de recombinación, fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa y su concentración y pureza fueron determinadas por espectrofotometría.

Las construcciones pDest527-AB (codificante del tándem-AB; residuos 1-163) y pDest527-A (codificante del dominio individual HMG-boxA; residuos 1-79) se obtuvieron por PCR inversa empleando los cebadores AJVV007f-AJVV008r y AJVV003f-AJVV004r, respectivamente, y la construcción pDest527-HMGB1 como ADN molde. Consistió en un método de mutagénesis por PCR basado en el uso de cebadores que hibridan en los dos extremos de la región a amplificar (i.e, adyacentes a la secuencia a eliminar) pero en orientaciones divergentes. Finalizadas las reacciones de PCR, los productos se digirieron con la endonucleasa de restricción *DpnI* (que actúa selectivamente sobre ADN metilado) para eliminar el vector utilizado como molde. Tras el análisis del tamaño y la integridad de las construcciones por electroforesis en gel de agarosa, se realizaron las transformaciones en células *E. coli* ECOS Blue y las colonias transformantes fueron seleccionadas en medio LBA. La cuantificación y evaluación de la pureza del ADN plasmídico extraído se realizó por espectrofotometría.

Para crear el vector de expresión pDest527-B (codificante del dominio HMG-BoxB; residuos 89-163) se siguió el protocolo descrito para pDest527-AB y pDest527-A, pero empleando como molde de la PCR inversa la construcción pDest527-AB y los cebadores AJVV005f y AJVV006r. No obstante, aunque se conseguía expresión del polipéptido HMG-boxB, no era posible obtenerlo tras el proceso de purificación, posiblemente por su inestabilidad o por agregar en cuerpos de inclusión. Ante este resultado, se propuso como alternativa incrementar la solubilidad mediante el uso de la etiqueta MBP (proteína de unión a maltosa), por lo que se creó el vector pDest566-B (que permite la expresión de la proteína de fusión His₆-MBP). Para ello, en primer lugar, se obtuvo la construcción pDest566-HMGB1 como resultado de: la reacción LR Gateway entre el vector de entrada pDONR221-HMGB1 y el vector destino pDest566 (amp^r), la transformación en células One Shot OmniMAX 2-T1^R y la selección en placas LBA. A continuación, se utilizó pDest566-HMGB1 como molde de una PCR inversa para obtener pDest566-AB (con los cebadores AJVV007f y AJVV008r), que fue utilizada como molde de una PCR inversa para obtener finalmente pDest566-B (con los cebadores AJVV005f y AJVV006r). Tras cada PCR se sigue el procedimiento anteriormente descrito, que incluye la digestión con *DpnI*, transformación en *E. coli* ECOS Blue y selección en LBA.

Para verificar la presencia del inserto de interés en cada vector de expresión (pDest527-HMGB1, pDest527-AB, pDest527-A y pDest566-B), se sometieron a reacciones de PCR empleando cebadores T7 y se analizó el resultado por electroforesis en gel de agarosa (Figura 5a). Los tamaños concordaron con lo esperado, siendo mayor el amplicón correspondiente a la proteína HMGB1 (de longitud completa) que el del tándem-AB, y este mayor que el de HMG-boxA. El amplicón correspondiente a HMG-boxB presenta el mayor tamaño debido a la etiqueta MBP.

4.1.2. Expresión y purificación de las proteínas

Con el fin de determinar el sistema de expresión y las condiciones de cultivo que resultaran en un mayor rendimiento en la producción proteica, se llevaron a cabo ensayos de expresión con cada una de las construcciones. Se evaluaron diferentes cepas *E. coli* (BL21(DE3), Rosetta 2(DE3) pLys, BL21-CodonPlus(DE3)-RIL y B834(DE3)pLys), varios medios de cultivo (LB, TB y NZY), diferentes concentraciones de IPTG (0.2, 0.5 y 1 mM) y tiempos de inducción (3h o 24h), así como varios escalados (desde los 10 mL hasta 1 L de cultivo) variando el ratio (1:2 o 1:4; medio de cultivo: volumen Erlenmeyer).

El análisis de las pruebas de expresión mediante SDS-PAGE con tinción con azul Coomassie llevó a la elección de las siguientes condiciones para la expresión a gran escala:

- pDest527-HMGB1: cepa de *E. coli* BL21 (DE3), medio LB, 1 mM de IPTG durante 3 horas, 37°C y un volumen de 200 mL en matraces de 1 L.
- pDest527-AB: cepa de *E. coli* B834(DE3), medio LB, 0.2 mM de IPTG durante 3 horas, 37 °C y un volumen de 1 L en matraces de 2 L.
- pDest527-A: cepa de *E. coli* B834(DE3), medio TB, 0.2 mM de IPTG durante 24 horas, 37° y un volumen de 1 L en matraces de 2 L.
- pDest566-B: cepa de *E. coli* B834(DE3), medio TB, 0.2 mM de IPTG durante 24 horas, 37°C y un volumen de 100 mL en matraces de 500 mL.

Cabe señalar que en el caso de HMG-BoxB sólo se muestran las condiciones empleadas con la construcción pDest566-B, dado que, como se indicó anteriormente, con el vector pDest527-B no se llegaba a obtener proteína purificada.

Tras la expresión a gran escala con las variables optimizadas, se comprobó por SDS-PAGE la correcta expresión de las proteínas de interés y los pellets celulares se conservaron a -80°C hasta proceder a la purificación. Llegado el momento, se aisló el extracto proteico (mediante lisis, clarificación de lisado y filtración) y se llevaron a cabo la cromatografía de afinidad (utilizando una columna con níquel) y la cromatografía de exclusión molecular. Tras cada método cromatográfico se comprobó el tamaño molecular de los polipéptidos mediante SDS-PAGE y se concentraron por ultrafiltración empleando filtros de centrífuga. Finalmente, se cuantificaron las proteínas mediante la medida de absorbancia a 280 nm y se conservaron a -80°C .

Para evidenciar la obtención de las proteínas purificadas que serán utilizadas en el presente trabajo se muestra en la Figura 5b su análisis por SDS-PAGE.

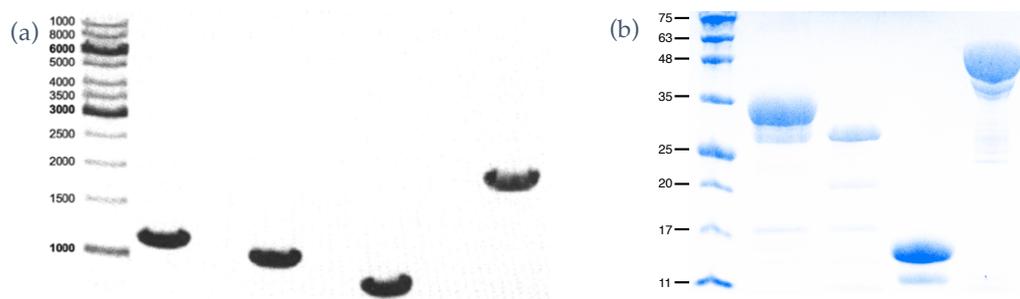


Figura 5. (a) Electroforesis en gel de agarosa con productos de PCR obtenidos utilizando los cebadores T7 y como ADN molde los vectores de expresión pDest527-HMGB1 (carril 2), pDEST527-AB (carril 3), pDest527-A (carril 4) y pDest566-B (carril 5). El 1^{er} carril corresponde con el marcador. (b) SDS-PAGE de las proteínas HMGB1 de longitud completa (carril 2; 24,9 kDa), tándem-AB (carril 3; 18,9 kDa), HMG-boxA (carril 4; 9,6 kDa) y HMG-boxB (carril 5; 8,8 kDa). Presentan un peso molecular superior al de las proteínas nativas debido al peso molecular adicional de las etiquetas (His₆ y a mayores MBP en HMG-boxB), el sitio de corte de la proteasa TEV y aminoácidos derivados de la técnica de clonaje. El 1^{er} carril corresponde con el marcador.

4.2. Obtención y marcaje fluorescente del lncRNA BGas

El lncRNA BGas se obtuvo por transcripción *in vitro* mediante la T7 RNA polimerasa, para lo cual fue necesario conseguir previamente el ADN molde (que consiste en la secuencia de interés aguas abajo de la región promotora T7). Además, se llevó a cabo el marcaje fluorescente del lncRNA para utilizar en ensayos EMSA.

4.2.1. Obtención del ADN molde para la transcripción *in vitro*

En primer lugar, se amplificó el gen *BGAS* por PCR empleando como molde el ADN genómico de la línea celular tumoral SKOV3 (previamente extraído) y los cebadores AJVV127f y AJVV132r. El producto de PCR fue purificado, se comprobó su tamaño por electroforesis en gel de agarosa y se cuantificó mediante la medida de A_{260} .

A continuación, utilizando el kit de clonación *CloneJET PCR Cloning Kit* (Thermo Fisher Scientific), se realizó la ligación del gen *BGAS* mediante la ADN ligasa T4 en el plásmido

pJET1.2/blunt. Este vector contiene el gen β -lactamasa, que confiere resistencia a la ampicilina, y el gen letal *eco47IR*, que es interrumpido en caso de que la ligación se realice con éxito, lo cual permite la selección positiva de bacterias transformantes. El producto de ligación se transformó en células *E. coli* ECOSBlue y se sembraron en medio selectivo LBA. La comprobación de la presencia de la construcción pJET1.2/blunt-BGAS en las colonias candidatas se realizó por PCR de colonias y el resultado se analizó por electroforesis en gel de agarosa. Una colonia positiva se cultivó en LBA para, seguidamente, aislar el ADN plasmídico, cuya concentración y pureza se determinó espectrofotométricamente.

Para obtener la construcción con la secuencia de ADN codificante del transcrito lncRNA Bgas era necesario deleccionar el intrón del gen *BGAS*. Esto se consiguió mediante PCR inversa utilizando pJET1.2/blunt-BGAS como molde y cebadores divergentes (AJVV188f y AJVV189r) diseñados de manera que, a la hora de amplificar la construcción por PCR, la reacción incluyera todo el vector excepto la secuencia intrónica a deleccionar. Posteriormente, se llevó a cabo una digestión con *DpnI* para eliminar el ADN molde residual, se analizó el producto de PCR digerido por electroforesis en gel de agarosa y se realizó la transformación en células *E. coli* ECOS Blue, que fueron sembradas en medio LBA. De nuevo la comprobación de colonias candidatas se realizó por PCR de colonias y se extrajo el ADN plasmídico de una colonia positiva.

Finalmente, se obtuvo el ADN molde para la transcripción *in vitro* (secuencia de interés aguas abajo del promotor T7) mediante PCR, utilizando como molde el vector creado anteriormente (que contiene la secuencia exónica) y los cebadores AJVV140f (cebador *forward* que incluye el promotor T7 en el extremo 5') y AJVV132r. El producto de PCR fue purificado por el método de precipitación con alcohol en presencia de concentraciones moderadas de cationes monovalentes y se comprobó el tamaño esperado (240 pb) por electroforesis en gel de agarosa (Figura 6a). La cuantificación y evaluación de pureza se realizó por espectrofotometría.

4.2.2. Síntesis y purificación del lncRNA BGas

Para llevar a cabo la transcripción *in vitro* del lncRNA BGas mediante la enzima ARN T7 pol a partir del ADN molde se utilizó el kit *HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit # E2050* (NEB). Finalizada la reacción de síntesis, se hizo un tratamiento con DNasa para eliminar el ADN molde, se purificó el ARN empleando el kit *Monarch RNA Cleanup Kit # T2050S* (NEB) y se determinó su concentración mediante la medida de absorbancia a 260 nm. La obtención del lncRNA BGas (con un tamaño esperado de 243 nt) se verificó por electroforesis capilar empleando el bioanalizador *Bioanalyzer Agilent 2100* (Agilent) con el kit *Agilent RNA 6000 Pico Kit* (Agilent) (Figura 6b).

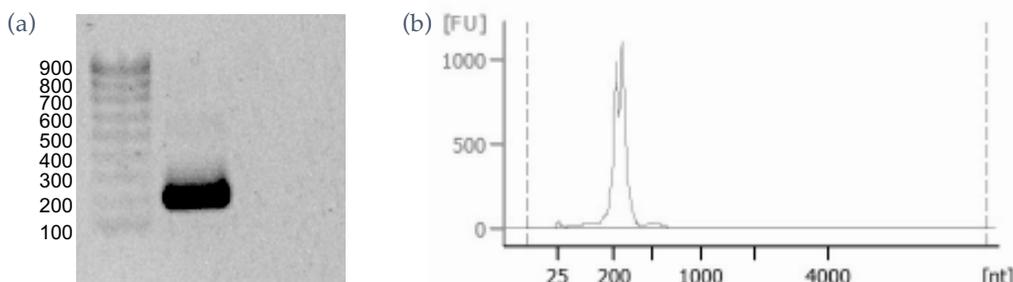


Figura 6. (a) Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del ADN molde utilizado para la transcripción *in vitro* (secuencia de ADN codificante de BGas aguas abajo del promotor T7). (b) Electroferograma resultante de la electroforesis capilar de BGas empleando *Agilent RNA 6000 Pico Kit*.

4.2.3. Marcaje fluorescente del lncRNA BGas

El marcaje del lncRNA BGas con Fluoresceína-5-maleimida se realizó con el sistema *5' EndTag™ Nucleic Acid Labeling System* (Vector Laboratories). Siguiendo el protocolo descrito en *Material y Métodos*, se consiguió: (1) la eliminación del grupo fosfato 5' del lncRNA mediante una fosfatasa alcalina, (2) la transferencia de un grupo tiofosfato del ATP γ S al grupo hidroxilo 5' del lncRNA mediante la polinucleótido quinasa de T4 (PN4) y (3) el acoplamiento químico de la sonda fluorescente (5-MF) mediante la reacción click maleimida-tiol (Figura 7).

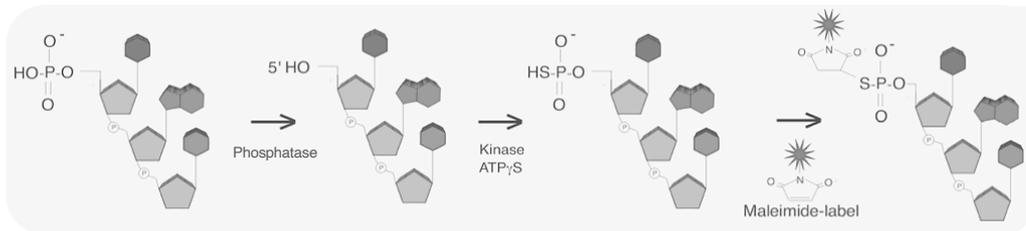


Figura 7. Esquema del proceso seguido para marcar el lncRNA con una sonda fluorescente.

4.3. Análisis *in vitro* de la interacción HMGB1-BGas

4.3.1. Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

Obtenidas las biomoléculas de estudio, el primer propósito era determinar si la proteína HMGB1 (de longitud completa) era capaz de unirse al lncRNA BGas, para lo cual se realizaron Ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA, del inglés *Electrophoretic Movility shift Assay*).

La técnica EMSA posibilita la detección de complejos proteína-ácido nucleico por su menor migración con respecto al ácido nucleico libre en una electroforesis en condiciones nativas. Para permitir la visualización se emplea el ácido nucleico marcado, habitualmente a través de una sonda fluorescente. Además, se puede detectar indirectamente la unión de un ácido nucleico no marcado (que actúa como competidor) a la proteína a causa de los cambios que provoca en la movilidad electroforética del ácido nucleico marcado (Hellman and Fried, 2009).

En el presente estudio se realizaron, en primer lugar, ensayos EMSA con la proteína HMGB1 y el ligando ADN^{TA} marcado con FAM sin competidor, con ADN^{TA} (no marcado) como competidor o con el lncRNA BGas (no marcado) como competidor (Figura 8a). Los ligandos 5'FAM-ADN^{TA} (marcado) y ADN^{TA} (no marcado) se obtuvieron por hibridación de los oligonucleótidos complementarios AVV234-AVV235 y AVV234NO-AVV235, respectivamente. Con estos ensayos, se pretendía analizar si existía interacción entre HMGB1 y BGas, pero además comprobar la correcta funcionalidad de la proteína HMGB1 -mediante la demostración de su capacidad unión al ligando ADN^{TA} ya descrita- para dar validez al resultado.

Se demostró que HMGB1 era funcional porque se observa una migración retardada en las muestras de ADN^{TA} y HMGB1 con respecto a los controles negativo (ADN^{TA} libre), que indica que existe interacción. Si bien el retardo se produce con las dos concentraciones de proteína ensayadas, es mayor con la concentración de proteína más alta, debido posiblemente a la formación de complejos constituidos por más de una proteína (aunque se desconoce exactamente la estequiometría).

La especificidad de la interacción HMGB1-ADN se corroboró tras añadir como competidor ADN^{TA} no marcado. En la muestra con menor concentración de HMGB1, la unión del competidor a la proteína provoca el desplazamiento total del 5'-FAM-ADN^{TA} unido, de modo que sólo se detecta libre. Con mayor concentración de HMGB1, la unión del competidor causa la disminución del número de proteínas que formaban el complejo con 5'-FAM-ADN^{TA}, lo cual se traduce en una mayor movilidad electroforética.

Finalmente, se demostró que la proteína HMGB1 es capaz de unirse directamente al lncRNA BGas, puesto que su adición como competidor provocó la completa eliminación del complejo ADN-HMGB1 (con las dos concentraciones de proteína analizadas). Se hace patente al aparecer una única banda de migración correspondiente al ADN libre.

Por otro lado, se realizó un ensayo EMSA con el lncRNA BGas marcado con fluoresceína-5-maleimida y la proteína HMGB1, que se muestra en la Figura 8b. Dado que con este trabajo se inició la implantación de la técnica de marcaje fluorescente de ARN, resulta prometedor observar una banda en el carril asignado como control negativo, que indica que sí se ha conseguido marcar el lncRNA BGas. Si bien, aparece también una banda correspondiente a la fluoresceína-5-maleimida libre, por lo que será necesario mejorar el rendimiento de marcaje y purificar el ARN marcado antes de poder ser utilizado en ensayos de anisotropía de fluorescencia. Al añadir la proteína HMGB1 no se aprecia ninguna banda, lo que nos lleva a corroborar que se une a BGas provocando un retardo en su movilidad electroforética de tal magnitud que no permite su migración. No obstante, habrá que optimizar la concentración de proteína para obtener un resultado válido.

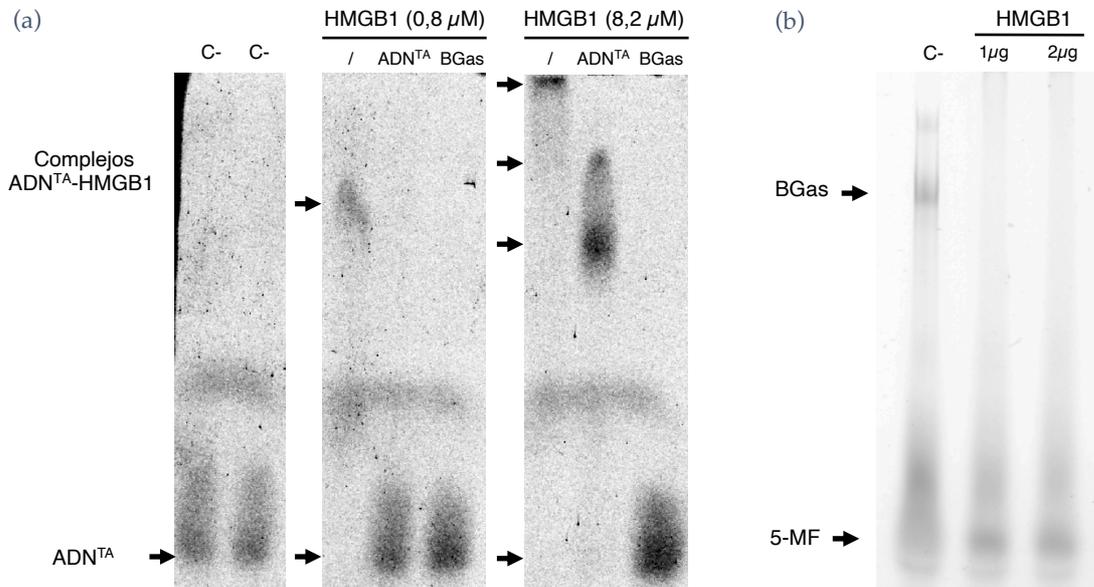


Figura 8. (a) Ensayos EMSA realizados con la proteína HMGB1 (0,8 μM o 8,2 μM) y el ligando 5'-FAM-ADN^{TA} (50 nM) sin competidor, con ADN^{TA} (100 μM) y con BGas (55 μM). Los controles negativos se corresponden con 5'-FAM-ADN^{TA} (carril 1) y 5'-FAM-ADN^{TA} combinado con la proteína MBP (carril 2). (b) Ensayo EMSA realizado con la proteína HMGB1 (1 μg y 2 μg) y el ligando 5'-5-MF-BGas (10 μl). El control negativo se corresponde con 5'-5-MF-BGas.

4.3.2. Anisotropía de fluorescencia (FA)

Para caracterizar la interacción HMGB1-BGAs e intentar elucidar la contribución de los dominios HMG-box, se realizaron ensayos de anisotropía de fluorescencia (FA, del inglés *Fluorescence Anisotropy*).

Cuando un ligando marcado con un fluoróforo se excita con luz polarizada, su rápida velocidad de rotación molecular (debido a su pequeño tamaño) hace que emita luz despolarizada. En cambio, si el ligando se une a una molécula de alto peso molecular, como una proteína, su volumen aumenta y consecuentemente la velocidad de rotación disminuye, provocando un incremento significativo en el grado de polarización de la luz emitida (Figura 9). Esta propiedad es en la que se basa la técnica de anisotropía de fluorescencia para realizar ensayos de unión (o saturación) y ensayos de competencia (o desplazamiento). En ensayos de unión, concentraciones crecientes de proteína se añaden a una concentración fija de ligando fluorescente, siendo la polarización de la luz emitida proporcional a la fracción de ligando unido. En ensayos de competencia, se mide la disminución de la polarización que se produce al añadir concentraciones crecientes de ligando competidor (no marcado) a concentraciones fijas de proteína y ligando fluorescente, como consecuencia del desplazamiento del ligando fluorescente (provocado por la unión del ligando no marcado a la proteína) (Moerke, 2009; Rossi and Taylor, 2011).

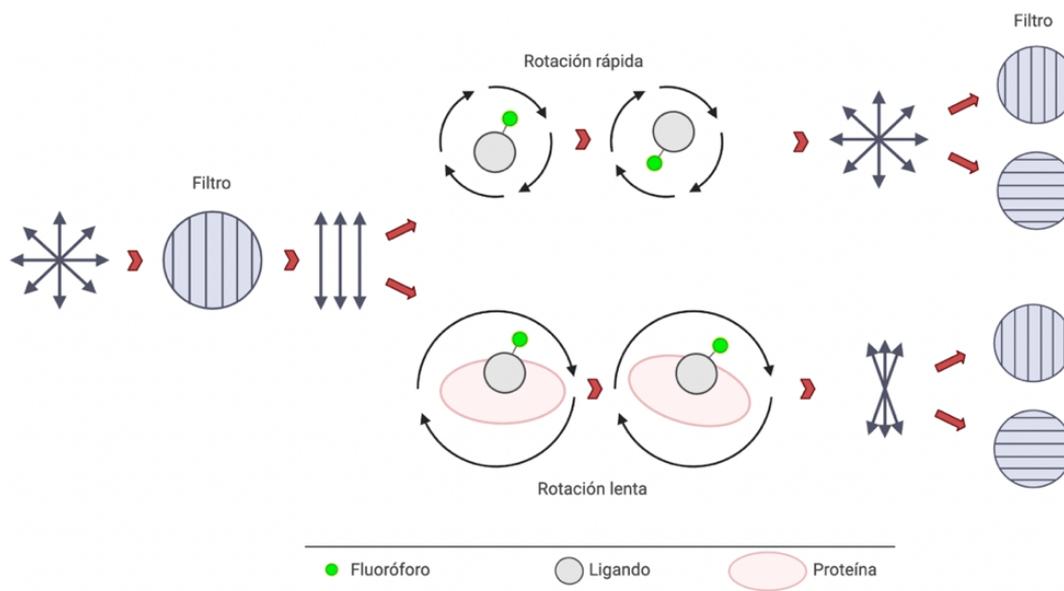


Figura 9. Esquema representativo del fundamento teórico de la técnica anisotropía de fluorescencia para medir interacciones proteína-ligando.

La magnitud utilizada para medir el grado de polarización de la luz emitida es la anisotropía de fluorescencia, que se calcula según la siguiente ecuación:

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Donde I_{\parallel} y I_{\perp} son las intensidades de luz de emisión detectadas en los planos paralelo y perpendicular, respectivamente, con respecto a la luz polarizada de excitación.

A partir de los valores de anisotropía se representa el porcentaje de ligando fluorescente unido en función de la concentración de proteína o de competidor. Los ensayos de unión permiten determinar fácilmente la afinidad de la interacción a través de K_D (constante de disociación), que se corresponde con la concentración de proteína a la cual el 50% del ligando está unido. En ensayos de competición se puede evaluar la afinidad de la interacción a través de IC_{50} , concentración de ligando competidor no marcado que provoca el desplazamiento del 50% del ligando marcado unido (Rossi and Taylor, 2011).

En el presente trabajo se propuso la realización de ensayos de competencia empleando lncRNA BGas como competidor de interacciones ADN^{TA}-proteína, siendo la proteína HMGB1, tándem-AB, HMG-BoxA o HMG-BoxB.

Previamente, se llevaron a cabo ensayos de unión de cada proteína con el ligando 5'FAM-ADN^{TA} (Figura 10). A partir de los mismos se estableció la concentración de proteína adecuada para utilizar en los ensayos de competición, puesto que si es muy alta la unión del competidor no se detecta y si es muy baja no se dispone de un intervalo de medida significativo. Por otro lado, se pretendía evaluar la correcta funcionalidad de los dominios HMG obtenidos (a través de su capacidad de unión al ADN), teniendo en cuenta que sólo se había comprobado la funcionalidad de la proteína de longitud completa a través de EMSA. Los resultados revelaron que sí se unían al ADN^{TA} el dominio individual HMG-boxA y el tándem-AB. Sin embargo, HMG-boxB no demostró la capacidad de unión a ADN, probablemente a causa de un mal plegamiento, lo que impidió estudiar su interacción con BGas.

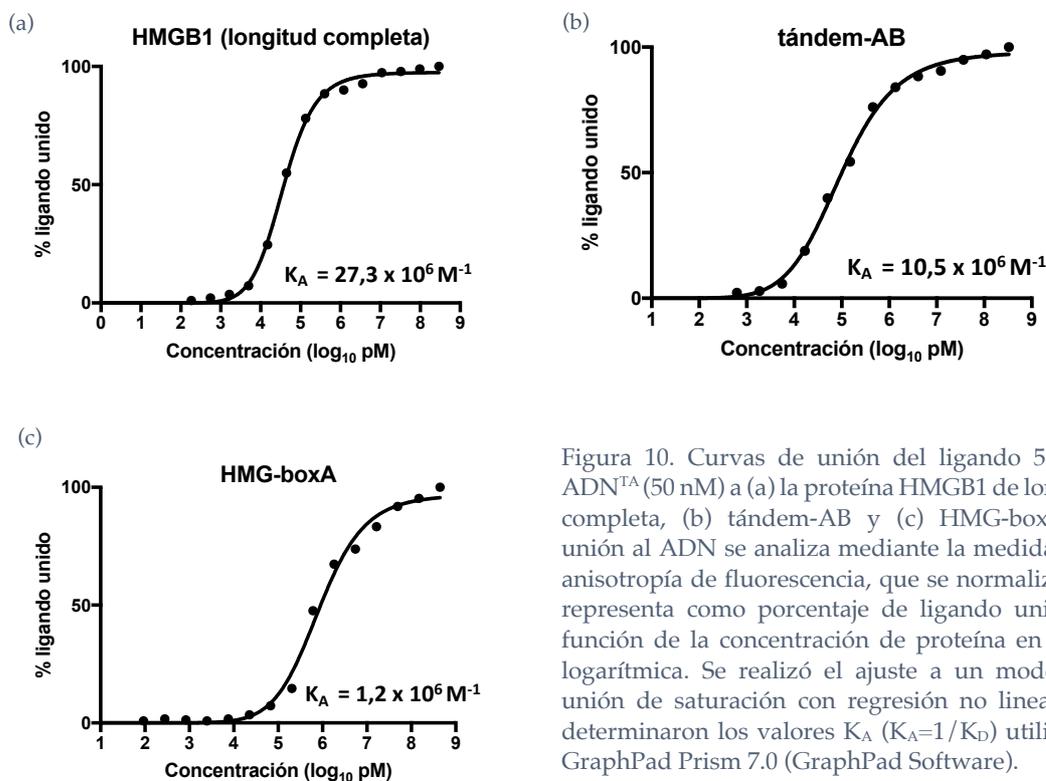


Figura 10. Curvas de unión del ligando 5'FAM-ADN^{TA} (50 nM) a (a) la proteína HMGB1 de longitud completa, (b) tándem-AB y (c) HMG-boxA. La unión al ADN se analiza mediante la medida de la anisotropía de fluorescencia, que se normaliza y se representa como porcentaje de ligando unido en función de la concentración de proteína en escala logarítmica. Se realizó el ajuste a un modelo de unión de saturación con regresión no lineal y se determinaron los valores K_A ($K_A=1/K_D$) utilizando GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software).

Por tanto, se procedió a los ensayos de competencia con la proteína HMGB1 de longitud completa, el tándem-AB y el dominio HMG-boxA. En los tres ensayos (Figura 11) se registró una disminución de la anisotropía de fluorescencia, lo cual implica que el lncRNA BGas (no marcado) se unió a los polipéptidos provocando el desplazamiento del ligando 5'FAM-ADN^{TA} unido. El hecho de que tándem-AB y HMG-boxA hayan demostrado capacidad de unión permite concluir que los dominios HMG-box de la proteína HMGB1 median en la interacción con el lncRNA BGas.

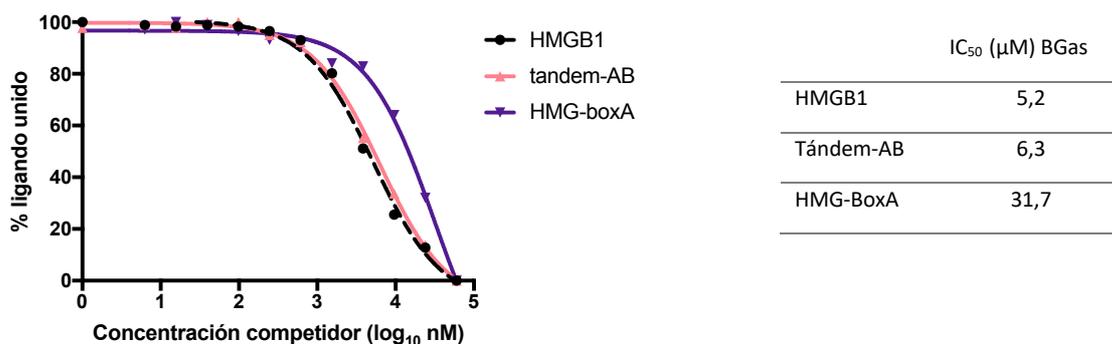


Figura 11. Curvas de desplazamiento del ligando 5'FAM-ADN^{TA} (50 nM) de la proteína HMGB1 de longitud completa, tándem-AB y HMG-boxA por el lncRNA BGas. La unión al ADN se analiza mediante la medida de la anisotropía de fluorescencia, que se normaliza y representa como porcentaje de ligando unido en función de la concentración de BGas en escala logarítmica. Se realizó el ajuste a un modelo de unión de saturación con regresión no lineal y se determinaron los valores K_A ($K_A=1/K_D$) utilizando GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software).

Con la intención de comparar la afinidad de la unión de cada proteína a BGas, se determinaron valores de IC₅₀.

La concentración de BGas necesaria para desplazar el 50% de ADN^{TA} unido a la proteína de longitud completa (IC₅₀=5,2 µM) fue ligeramente inferior a la necesaria para desplazar el 50% de ADN^{TA} unido a tándem-AB (IC₅₀=6,3 µM), lo cual parece sugerir que los dominios HMG son los principales responsables en mediar la interacción con BGas, pero que la cola ácida también participaría mejorando la afinidad.

Por otro lado, se observa que es cinco veces menor el IC₅₀ para el tándem-AB (IC₅₀=6,3 µM) que para el dominio HMG-boxA (IC₅₀=31,7 µM), es decir, que la combinación de los dos dominios HMG resultó en un claro aumento en la afinidad de unión a BGas respecto al dominio individual HMG-boxA, por lo que se concluye que HMG-boxB es necesario en la interacción. Si bien, se deben realizar estudios con el dominio HMG-boxB individual para conocer si podría interaccionar por sí solo o si es la disposición de ambos dominios en tándem es estrictamente necesaria para la interacción.

5. CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos y atendiendo a los objetivos propuestos, se recogen las siguientes conclusiones:

- La proteína HMGB1 de longitud completa, el didominio HMG-box en tándem y el dominio individual HMG-boxA se han obtenido satisfactoriamente mediante los procesos de producción de proteínas recombinantes establecidos. Sin embargo, el dominio individual HMG-boxB obtenido no es funcional.
- El lncRNA BGas se ha obtenido adecuadamente mediante transcripción *in vitro* y se ha conseguido marcar con fluorescencia, pero se debe mejorar el rendimiento de marcaje y purificarlo una vez marcado.
- Se ha demostrado que proteína HMGB1 se une directamente al lncRNA BGas *in vitro* mediante la técnica EMSA.
- Los ensayos de FA realizados sugieren que los dominios HMG-box de la proteína HMGB1 median la interacción con el lncRNA BGas.

Dada la duración limitada del presente Trabajo de Fin de Grado, no se ha podido caracterizar en profundidad la interacción HMGB1-BGas. Como continuación de este estudio se propone, en relación a las proteínas, la mejora del grado de pureza y la búsqueda de un nuevo método para obtener el dominio HMG-boxB funcional. En cuanto al ensayo EMSA con ADN-HMGB1 y el lncRNA BGas como competidor, se sugiere repetir con distintas concentraciones de este, así como intentar conocer la estequiometría de los complejos. El ensayo EMSA con BGas-HMGB1 realizado resultó prometedor pero debe ser optimizado. Para determinar valores más precisos de K_D e IC_{50} y estimar el error experimental, en los ensayos de FA deberían introducirse un mayor número de réplicas. Además, se recomienda utilizar dicha técnica para realizar ensayos de saturación empleando el lncRNA BGas marcado. Por otro lado, de cara al futuro, se propone realizar mutagénesis dirigida de la proteína o del lncRNA con el fin de determinar regiones de unión y hacer uso de técnicas complementarias como Calorimetría de titulación isotérmica (ITC, del inglés *Isothermal Titration Calorimetry*). También sería interesante calcular otras propiedades termodinámicas como la energía libre de Gibbs (ΔG), de entalpía (ΔH) y de entropía (ΔS).

CONCLUSIONS

In view of the results obtained and in accordance with the proposed objectives, the following conclusions are drawn:

- The full-length HMGB1 protein, the tandem HMG-box didomain and the HMG-boxA individual domain have been successfully obtained by the established recombinant protein production processes. However, the individual HMG-boxB domain obtained is not functional.
- The lncRNA BGas has been adequately obtained by *in vitro* transcription and its fluorescent labelling has been achieved, but the labelling yield needs to be improved and it must be purified.
- HMGB1 protein has been shown to bind directly to BGas lncRNA in vitro by EMSA technique.
- FA assays suggest that the HMG-box domains of the HMGB1 protein mediate the interaction with the lncRNA BGas.

Given the limited duration of this Final Degree Project, it has not been possible to characterise the HMGB1-BGas interaction in depth. As a continuation of this study, it is proposed, in relation to proteins, to improve the degree of purity and to search for a new method to obtain the functional HMG-boxB domain. As for the EMSA assay with HMGB1-DNA and the lncRNA BGas as competitor, it is suggested to repeat it with different concentrations of the BGas, as well as to try to determine the stoichiometry of the complexes. The EMSA assay with BGas-HMGB1 was promising but needs to be optimised. In order to determine more accurate K_D and IC_{50} values and to estimate the experimental error, a higher number of replicates should be introduced in the FA assays. Furthermore, it is recommended to use this technique to perform saturation assays using the labelled the lncRNA BGas. On the other hand, for the future, it is proposed to perform site-directed mutagenesis of the protein or lncRNA in order to determine binding regions and make use of complementary techniques such as Isothermal Titration Calorimetry (ITC). It would also be interesting to calculate other thermodynamic properties such as Gibbs free energy (ΔG), enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS).

6. BIBLIOGRAFÍA

- Barreiro-Alonso, A. *et al.* (2016) 'High Mobility Group B Proteins, Their Partners, and Other Redox Sensors in Ovarian and Prostate Cancer', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, pp. 1-17. doi: 10.1155/2016/5845061.
- Bell, A. J. *et al.* (2008) 'Interactions of recombinant HMGB proteins with branched RNA substrates', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377(1), pp. 262–267. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.09.131.
- Bolha, L., Ravnik-Glavač, M. and Glavač, D. (2017) 'Long Noncoding RNAs as Biomarkers in Cancer', *Disease Markers*, 2017, pp. 1-14. doi: 10.1155/2017/7243968.
- Castello, A. *et al.* (2016) 'Comprehensive Identification of RNA-Binding Domains in Human Cells', *Molecular Cell*, 63(4), pp. 696–710. doi: 10.1016/j.molcel.2016.06.029.
- Gutschner, T. *et al.* (2018) 'From biomarkers to therapeutic targets—the promises and perils of long non-coding RNAs in cancer', *Cancer and Metastasis Reviews*, 37(1), pp. 83–105. doi: 10.1007/s10555-017-9718-5.
- Hellman, L. M. and Fried, M. G. (2009) 'Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Detecting Protein-Nucleic Acid Interactions', 2(8), pp. 1849–1861. doi: 10.1038/nprot.2007.249.Electrophoretic.
- Huarte, M. (2015) 'The emerging role of lncRNAs in cancer', *Nature Medicine*, 21(11), pp. 1253–1261. doi: 10.1038/nm.3981.
- Lee, Y. H. and Song, G. G. (2013) 'Unco rre cte d Unco rre cte d', *Neoplasma*, 60(5), pp. 607–616. doi: 10.4149/neo.
- Ma, S. *et al.* (2017) 'A long noncoding RNA , lincRNA-Tnfaip3 , acts as a coregulator of NF- k B to modulate inflammatory gene transcription in mouse macrophages', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(3), pp. 1215–1225. doi: 10.1096/fj.201601056R.
- Machado, L. R. *et al.* (2017) 'High mobility group protein B1 is a predictor of poor survival in ovarian cancer', *Oncotarget*, 8(60), pp. 101215–101223. doi: 10.18632/oncotarget.20538.
- Mattick, J. S. (2011) 'The central role of RNA in human development and cognition', *FEBS Letters*, 585(11), pp. 1600–1616. doi: 10.1016/j.febslet.2011.05.001.
- Mercer, T. R. and Mattick, J. S. (2013) 'Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation', *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(3), pp. 300–307. doi: 10.1038/nsmb.2480.
- Moerke, N. J. (2009) 'Fluorescence Polarization (FP) Assays for Monitoring Peptide-Protein or Nucleic Acid – Protein Binding', *Current Protocols in Chemical Biology*, 1(1), pp. 1–15. doi: 10.1002/9780470559277.ch090102.
- Nandwani, A., Rathore, S. and Datta, M. (2021) 'LncRNAs in cancer: Regulatory and therapeutic implications', *Cancer Letters*, 501, pp. 162–171. doi: 10.1016/j.canlet.2020.11.048.
- Paek, J. *et al.* (2016) 'Clinical impact of high mobility group box 1 protein in epithelial ovarian cancer', *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 293(3), pp. 645–650. doi: 10.1007/s00404-015-3864-1.
- Ranzato, E., Martinotti, S. and Patrone, M. (2015) 'Emerging roles for HMGB1 protein in immunity, inflammation, and cancer', *ImmunoTargets and Therapy*, p. 101. doi: 10.2147/itt.s58064.
- Reid, B. M., Permuth, J. B. and Sellers, T. A. (2017) 'Epidemiology of ovarian cancer: a review', *Cancer Biology and Medicine*, 14(1), pp. 9–32. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084.

- Rossi, A. M. and Taylor, C. W. (2011) 'Analysis of protein-ligand interactions by fluorescence polarization', *Nature Protocols*, 6(3), pp. 365–387. doi: 10.1038/nprot.2011.305.
- Saayman, S. M. *et al.* (2016) 'Long Non-coding RNA BGas Regulates the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator', *Molecular Therapy*, 24(8), pp. 1351–1357. doi: 10.1038/mt.2016.112.
- Salamini-Montemurri, M. *et al.* (2020) 'The challenges and opportunities of lncRNAs in ovarian cancer research and clinical use', *Cancers*, 12(4), pp. 1–25. doi: 10.3390/cancers12041020.
- Sofiadis, K. *et al.* (2021) 'HMGB1 coordinates SASP-related chromatin folding and RNA homeostasis on the path to senescence', *Molecular Systems Biology*, 17(6), pp. 1–17. doi: 10.15252/msb.20209760.
- Stewart, C., Ralyea, C. and Lockwood, S. (2019) 'Ovarian Cancer: An Integrated Review', *Seminars in Oncology Nursing*, 35(2), pp. 151–156. doi: 10.1016/j.soncn.2019.02.001.
- Sung, H. *et al.* (2021) 'Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), pp. 209–249. doi: 10.3322/caac.21660.
- Tang, D. *et al.* (2010) 'High-mobility group box 1 and cancer', *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*, 1799(1–2), pp. 131–140. doi: 10.1016/j.bbagr.2009.11.014.
- Ueland, F. (2017) 'A Perspective on Ovarian Cancer Biomarkers: Past, Present and Yet-To-Come', *Diagnostics*, 7(1), p. 14. doi: 10.3390/diagnostics7010014.
- Ugrinova, I. and Pasheva, E. (2017) 'HMGB1 Protein: A Therapeutic Target Inside and Outside the Cell', *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 1st edn, vol 107. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.apcsb.2016.10.001.
- Wang, H. *et al.* (2015) 'Relationship between high-mobility group box I overexpression in ovarian cancer tissue and serum: A meta-analysis', *OncoTargets and Therapy*, 8, pp. 3523–3531. doi: 10.2147/OTT.S93357.
- Wang, J. yan, Lu, A. qing and Chen, L. juan (2019) 'LncRNAs in ovarian cancer', *Clinica Chimica Acta*, 490(December 2018), pp. 17–27. doi: 10.1016/j.cca.2018.12.013.
- Wang, K. C. and Chang, H. Y. (2011) 'Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs', *Molecular Cell*, 43(6), pp. 904–914. doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.018.
- Yanai, H. *et al.* (2009) 'HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses', *Nature*, 462(7269), pp. 99–103. doi: 10.1038/nature08512.
- Yang, L. *et al.* (2018) 'LncRNAs regulate cancer metastasis via binding to functional proteins', *Oncotarget*, 9(1), pp. 1426–1443. doi: 10.18632/oncotarget.22840.