



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Grado en Biología

Facultad de Ciencias

Influencia de HMGB1 en el contenido proteico de exosomas derivados de células cancerosas de ovario

Influencia de HMGB1 no contido proteico de
exosomas derivados de células de cancro de ovario

Influence of HMGB1 on the protein content of
exosomes derived from ovarian cancer cells

Cora Rey Souto

Director: Ángel José Vizoso Vázquez

Curso: 2021 – 2022 Convocatoria: Septiembre

ABREVIATURAS

ACN	acetonitrilo
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
BA	bicarbonato amónico
COE	cáncer de ovario epitelial
CV	coeficiente de variación
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DTT	ditiotreitol
ESI	ionización por electrospray
EVs	vesículas extracelulares
FA	ácido fórmico
FC	<i>fold change</i>
FDR	tasa de falsos positivos
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
GO	ontología de genes
HMG	grupo de alta movilidad
HPLC	cromatografía líquida de alta eficiencia
LC	cromatografía líquida
mA	miliamperios
MS	espectrometría de masas
MVB	cuerpos multivesiculares
PB	tampón fosfato
PBS-T	tampón fosfato salino-Tween
PVDF	floruro de polivinilideno
r.p.m.	revoluciones por minuto
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TAE	tampón tris-acetato-EDTA
TEM	microscopía electrónica de transmisión
TFA	ácido trifluoroacético
UV	ultravioleta
V	voltios
V _f	volumen final
Wt	<i>wild type</i>

RESUMEN

El cáncer de ovario es una de las neoplasias malignas ginecológicas más letales a nivel mundial. Puesto que no se dispone de métodos para su detección precoz, la mayoría de las pacientes son diagnosticadas en estadios avanzados (cuando ya existe metástasis), y los tratamientos actuales no son eficaces. Existe, por tanto, la necesidad urgente de investigar las causas subyacentes a la enfermedad, descubrir biomarcadores tempranos y desarrollar nuevos fármacos. Los exosomas son un tipo de vesículas extracelulares caracterizadas por presentar un contenido molecular muy diverso que pueden transferir a células adyacentes o distantes, desempeñando un papel clave en la regulación de multitud de procesos fisiológicos o patológicos. En distintos tipos de cáncer, entre los que se incluye el de ovario, se ha visto que las células cancerosas liberan más exosomas que las sanas y que transportan moléculas oncogénicas que participan en la progresión tumoral. Además, se encuentran altas concentraciones de exosomas en varios fluidos corporales, por lo que podrían ser útiles en biopsia líquida. Por otra parte, la proteína HMGB1 es foco de atención en la investigación del cáncer de ovario, se encuentra sobreexpresada en células tumorales ováricas y contribuye a una gran variedad de las características distintivas del cáncer. Bajo este contexto, el presente trabajo se centra en analizar la influencia de HMGB1 en el contenido proteico de exosomas derivados de células de cáncer de ovario.

Palabras clave: cáncer de ovario; exosomas ; hHMGB1; proteómica

RESUMO

O cancro de ovario é unha das neoplasias malignas xinecolóxicas máis letais a nivel mundial. Debido a que non se dispón de métodos para a súa detección precoz, a maioría das pacientes son diagnosticadas en estadios avanzados (cando xa existe metástases), e os tratamentos actuais non son eficaces. Existe, por tanto, a necesidade urxente de investigar as causas subxacentes á enfermidade, descubrir biomarcadores temperáns e desenvolver novos fármacos. Os exosomas son un tipo de vesículas extracelulares caracterizadas por presentar un contido molecular moi diverso que poden transferir a células adxacentes ou distantes, desempeñando un papel cruce na regulación de multitude de procesos fisiolóxicos ou patolóxicos. En distintos tipos de cancro, entre os que se inclúe o de ovario, viuse que as células cancerosas liberan máis exosomas que as sás e que transportan moléculas oncoxénicas que participan na progresión tumoral. Ademais, atópanse altas concentracións de exosomas en varios fluídos corporais, polo que poderían ser útiles en biopsia líquida. Por outra banda, a proteína HMGB1 é foco de atención na investigación do cancro de ovario, atópase sobreexpresada en células tumorales ováricas e contribúe a unha gran variedade das características distintivas do cancro. Baixo este contexto, o presente traballo céntrase en analizar a influencia de HMGB1 no contido proteico de exosomas derivados de células de cancro de ovario.

Palabras chave: cancro de ovario; exosomas; hHMGB1; proteómica

ABSTRACT

Ovarian cancer is one of the most lethal gynecological malignancies worldwide. Since there are no methods for early detection, most patients are diagnosed in advanced stages (when metastases already exist), and current treatments are not effective. There is therefore an urgent need to investigate the underlying causes of the disease, discover early biomarkers and develop new drugs. Exosomes are a type of extracellular vesicles characterized by having a very diverse molecular content that can be transferred to adjacent or distant cells, playing a key role in the regulation of many physiological or pathological processes. In different types of cancer, including ovarian cancer, it has been observed that cancer cells release more exosomes than healthy cells and that they transport oncogenic molecules that participate in tumor progression. Furthermore, high concentrations of exosomes are found in various body fluids, thus they could be useful in liquid biopsy. On the other hand, the HMGB1 protein is a focus of attention in ovarian cancer research, it is overexpressed in ovarian tumor cells and contributes to a wide variety of hallmarks of cancer. In this context, the present work focuses on analyzing the influence of HMGB1 on the protein content of exosomes derived from ovarian cancer cells.

Key words: ovarian cancer; exosomes; hHMGB1; proteomics

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. CÁNCER DE OVARIO	1
1.2. EXOSOMAS Y SU PAPEL EN EL CÁNCER	2
1.3. HMGB1 Y SU IMPLICACIÓN EN EL CÁNCER DE OVARIO.....	3
1.4. PROTEÓMICA.....	4
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAL Y MÉTODOS	8
3.1. CULTIVO CELULAR.....	8
3.2. PRODUCCIÓN Y AISLAMIENTO DE EXOSOMAS.....	8
3.3. CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS.....	9
3.3.1. Microscopía electrónica de transmisión	9
3.3.2. Western blot	10
3.4. ESTUDIO PROTEÓMICO	10
3.4.1. <i>SDS-PAGE con tinción con plata</i>	11
3.4.2. <i>Cuantificación de proteínas</i>	11
3.4.3. <i>Concentración de muestras proteicas por precipitación con acetona</i>	12
3.4.4. <i>Digestión de proteínas</i>	12
3.4.5. <i>Limpieza de péptidos</i>	12
3.4.6. <i>Análisis del componente proteico por LC-MS/MS</i>	13
3.4.7. <i>Anotación funcional</i>	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
4.1. CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS.....	15
4.2. ESTUDIO PROTEÓMICO	16
4.2.1. <i>Evaluación de las muestras proteicas por SDS-PAGE y Bradford</i>	16
4.2.2. <i>Análisis por LC-MS/MS</i>	18
4.2.2.1. Identificación.....	18
4.2.2.2. Cuantificación relativa por marcaje libre	19
4.2.3. <i>Análisis de datos</i>	22
5. CONCLUSIONES	26
6. BIBLIOGRAFÍA	29

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de ovario

El cáncer es un término genérico que comprende una amplia diversidad de enfermedades caracterizadas por la proliferación celular descontrolada, que deriva en la formación de una masa anormal de tejido y en la invasión a otras partes del cuerpo. Las principales propiedades que deben adquirir las células durante el proceso de carcinogénesis, conocidas como sellos distintivos del cáncer (*The hallmarks of cancer*, en inglés), son: señalización proliferativa sostenida, potencial replicativo ilimitado, insensibilidad a señales antiproliferativas, resistencia a la apoptosis (muerte celular programada), inducción de angiogénesis y capacidad invasiva y de metastatizar.¹

El cáncer suele ser clasificado en función del tejido u órgano afectado, siendo el cáncer de ovario la neoplasia maligna ginecológica más letal y el octavo tipo de cáncer más común en la población femenina a nivel mundial. Se estima que se han detectado 314.000 nuevos casos y que han fallecido 207.000 mujeres a causa de esta enfermedad en 2020.²

Según el tipo de célula en la que se desarrolla, se distingue entre cáncer de ovario epitelial, germinal y estromal. Dentro del cáncer de ovario epitelial (COE), responsable de más del 90% de los casos, se distingue entre tumores epiteliales de tipo I y de tipo II, siendo estos últimos los de peor pronóstico y desgraciadamente mayor prevalencia (constituyen el 75% de los COE). Los tumores de tipo I comprenden los tipos histológicos: seroso de bajo grado, endometroide, de células claras, mucinoso y tumor transicional. Por su parte, los tumores de tipo II incluyen los histotipos: seroso de alto grado, carcinosarcomas y tumores indiferenciados. Las diferencias histológicas están relacionadas con diferencias en el origen (puede originarse en otros tejidos ginecológicos y afectar posteriormente a los ovarios), patogenia, alteraciones moleculares y factores de riesgo genéticos y ambientales.³⁻⁵

El principal problema del cáncer de ovario es que, tratándose de un tumor de carácter asintomático durante su origen y desarrollo temprano, todavía no se disponen de métodos de detección precoz. Más del 70% de los casos son diagnosticados en estadios avanzados, que implican metástasis y una quimiorresistencia adquirida durante el curso del tratamiento. Pese a los intentos por desarrollar nuevos enfoques terapéuticos, hasta el

momento la cura de pacientes con cáncer de ovario en estadio avanzado tampoco ha mejorado sustancialmente. Esto conlleva a que supervivencia sea realmente baja, siendo la tasa relativa de supervivencia a 5 años de sólo el 30-40%. La clara ventaja que supone la detección temprana se evidencia en los casos diagnosticados en estadio I (cuando el tumor aun está localizado en los ovarios), donde la tasa asciende hasta aproximadamente el 90%. Ante este contexto, es urgente centrar esfuerzos en investigar las causas subyacentes a la enfermedad, descubrir biomarcadores tempranos y desarrollar fármacos contra nuevas dianas terapéuticas. ^{3,6,7}

1.2. Exosomas y su papel en el cáncer

Una gran variedad de células liberan vesículas de pequeño tamaño compuestas por membranas de bicapa lipídica que se conocen como vesículas extracelulares (EVs). Las EVs se clasifican tradicionalmente en tres categorías: cuerpos apoptóticos (provenientes de células apoptóticas; de 1000 a 5000 nm de diámetro), microvesículas (secretadas directamente de la membrana plasmática; de 200 a 1000 nm de diámetro) y exosomas (derivados de cuerpos multivesiculares (MVB) tras su fusión con la membrana plasmática; de 30 a 150 nm de diámetro). Los exosomas presentan un contenido molecular tremendamente diverso, pueden transportar proteínas, ADN, ARN mensajero, ARN largos no codificantes, microARN, lípidos, partículas virales, etc. Su finalidad principal es servir como herramienta en la comunicación célula-célula, tanto entre células vecinas como entre células distantes (a través de la endocitosis o interacciones receptor-ligando), pudiendo entregar moléculas bioactivas de forma estable. Los exosomas desempeñan, por tanto, un papel clave en la regulación de multitud de procesos fisiológicos y patológicos. Además, tienen la capacidad de superar barreras físicas como la membrana peritoneal y la barrera hematoencefálica. ⁸⁻¹⁰

En los últimos años, los exosomas se han convertido en uno de los principales focos de atención en la investigación del cáncer. Se ha visto que las células cancerosas liberan una mayor cantidad de exosomas que las células sanas, estando además alteradas sus composiciones moleculares y sus propiedades. Los exosomas derivados de tumores, a través de la transferencia de su carga particular asociada a la enfermedad, participan en la generación de un microambiente adecuado para el desarrollo del cáncer, promoviendo la diseminación, la evasión de la respuesta inmunitaria o la resistencia a medicamentos. Por otra parte, el aislamiento de exosomas a partir de biopsia líquida representa una

novedosa estrategia no invasiva para detectar nuevos biomarcadores, ya que los exosomas se encuentran en distintos fluidos corporales, como plasma o suero sanguíneo, ascitis, saliva, orina o leche materna.¹¹⁻¹⁴

En concreto en el cáncer de ovario, la evidencia científica ha revelado que los exosomas derivados de células cancerosas de ovario contienen moléculas oncogénicas que desempeñan un papel esencial en procesos como inmunosupresión, la formación de un nicho premetastático, la diseminación peritoneal, la angiogénesis, la conversión de fibroblastos asociados al cáncer o la eliminación de células mesoteliales. Por tanto, la investigación de los exosomas y su papel en el cáncer de ovario podría ayudarnos en la comprensión de los mecanismos patogénicos y en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento.^{11,12,15,16}

1.3. HMGB1 y su implicación en el cáncer de ovario

La proteína HMGB1 pertenece a la superfamilia HMG (High Mobility Group) y se incluye dentro de la familia HMGB (*High Mobility Group Box*), la cual se caracteriza por presentar al menos un dominio HMG-box. A su vez se distinguen dos subfamilias: una formada por proteínas que disponen de un único dominio HMG-box con afinidad por ADN de secuencia específica, y otra formada por proteínas con más de un dominio HMG-box que se unen a ADN con baja o nula especificidad de secuencia. Dentro de esta última subfamilia se encuentra HMGB1, que presenta dos dominios HMG-box en tándem (HMG-box A y HMG-box B) cargados positivamente, y una cola acídica en el extremo carboxi-terminal constituida por una sucesión de residuos de glutamato y aspartato (Figura 1). Tanto HMG-box A como HMG-box B están formados por tres tres α -hélices que se pliegan dando una característica forma de L y la cola acídica presenta una estructura extendida y flexible.^{17,18}

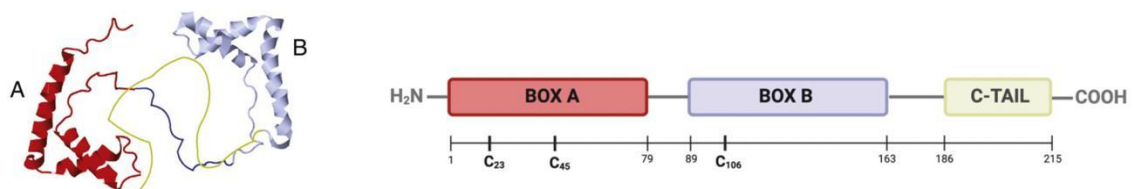


Figura 1. Esquema de la estructura de HMGB1. Presenta dos dominios HMG de unión a ADN (HMG-boxA y HMG-boxB) y una cola C-terminal. Contiene tres residuos cisteína susceptibles a redox.

HMGB1 es una proteína multifuncional que fue descubierta por primera vez en el núcleo, pero también puede encontrarse en el citosol o en el medio extracelular. Su localización y función están determinadas en gran medida por las distintas modificaciones postraduccionales que puede sufrir (acetilación, metilación, glicosilación o fosforilación) y por el estado redox de sus tres residuos de cisteína. En el núcleo, HMGB1 puede interactuar con el ADN y con otras proteínas, estando involucrada en la estabilidad genómica, en mecanismos de reparación de ADN o en la transcripción. En el citoplasma, se ha descrito que participa en procesos como la autofagia o la apoptosis. Fuera de la célula, HMGB1 puede actuar como alarmina de señalización al daño, promoviendo una respuesta inmunitaria.^{17,20}

La amplia diversidad de funciones que desempeña HMGB1 explican su relación con una gran variedad de enfermedades, entre las que se incluye el cáncer de ovario. Se ha visto que se encuentra sobreexpresada en células tumorales ováricas y se ha descrito su asociación con distintos procesos tumorales en el cáncer de ovario, lo que ha llevado a que se haya propuesto como biomarcador de diagnóstico y pronóstico y como posible diana terapéutica.²⁰⁻²⁴

1.4. Proteómica

La proteómica es el área de la biología que se encarga del estudio de los proteomas, es decir, del estudio a gran escala de las proteínas expresadas por un organismo o una parte de él. El desarrollo de la proteómica fue en gran parte impulsado por la genómica (que estudia los genomas), ya que sentó la base de la investigación de biomoléculas a gran escala, y además reveló que la información obtenida a partir de la secuenciación de los genomas aporta una información muy insuficiente para llegar a comprender la complejidad de un organismo, haciendo evidente la necesidad de conocer el papel de las proteínas (expresión, modulación e interacciones). No obstante, pese a los enormes avances en los últimos años, se debe tener en consideración que la proteómica es una disciplina que presenta grandes limitaciones: (1) un único gen puede dar lugar a varias proteínas, de forma que los 20.000 genes humanos se corresponden con cientos de miles de proteínas, (2) los proteomas son muy variables, dependen del tipo celular y del ambiente, (3) existe un enorme rango de abundancia en las proteínas ($>10^{10}$), lo cual dificulta enormemente el estudio de aquellas que son minoritarias (pues no existe un método de amplificación, como para el ADN) y (5) las proteínas sufren gran cantidad de modificaciones que afectan a su función.²⁵

En cuanto a las estrategias de investigación en proteómica, generalmente constan de los siguientes pasos: la obtención del extracto proteico (ya sea de un fluido, una célula, una vesícula extracelular, etc.), la digestión enzimática de las proteínas (aunque puede no

hacerse, lo que se conoce como proteómica *top-down*), la separación de los péptidos o proteínas, y, por último, la identificación por espectrometría de masas (MS). El hecho de realizar la digestión enzimática se debe a las ventajas que los péptidos presentan sobre las proteínas: se separan más fácilmente y presentan una mejor ionización y la fragmentación es predecible (siendo estos dos últimos aspectos importantes para el análisis por MS).²⁵

La separación puede realizarse únicamente mediante electroforesis en gel (lo cual se conoce como proteómica basada en gel), pero el método de separación más ampliamente utilizado es la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés *High Performance Liquid Chromatograph*). La cromatografía es una técnica de separación basada en la distribución diferencial o reparto de los analitos a separar entre dos fases, una móvil y otra estacionaria, por las que exhiben distintas afinidades. En el HPLC la fase móvil es un líquido que es bombeado a alta presión a través de la columna donde se dispone la fase estacionaria. En proteómica típicamente los péptidos se inyectan en una columna de fase reversa (más apolar que la fase móvil) disueltos en una solución acuosa acidificada y se va aumentando gradualmente la concentración del disolvente orgánico empleado en la fase móvil (normalmente acetonitrilo) con el fin de conseguir su separación (gracias a las diferencias en el tiempo de elución).²⁵

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que permite la identificación de los analitos a través de la relación masa/carga (m/z) de sus iones. Los espectrómetros de masas constan de 3 componentes básicos: una fuente de ionización que convierte los analitos en iones en fase gaseosa, un analizador de masas que separa los analitos ionizados en función de su relación m/z y un detector que registra el número de iones de cada uno de los valores m/z .^{25,26}

La identificación de proteínas puede conseguirse a través de la denominada huella peptídica de la proteína, que se trata del espectro de masas (MS) correspondiente a los péptidos derivados de la digestión enzimática de la proteína. Si bien, para una mejor identificación, se puede realizar la fragmentación de los péptidos (cuya fragmentación es predecible) y obtener así un espectro de masas de los fragmentos (el espectro de masas en tándem (MS/MS) de la proteína). Finalmente, la identificación se consigue a través de la comparación de los espectros de MS o de MS/MS obtenidos con espectros de digestión *in silico* disponibles en una base de datos.^{25,26}

Por otra parte, la espectrometría de masas también permite la cuantificación. En proteómica es muy común realizar cuantificaciones relativas, donde se mide la expresión diferencial de las proteínas que existe entre dos condiciones biológicas distintas. La

cuantificación relativa puede llevarse a cabo mediante métodos que implican un marcaje metabólico o químico de los péptidos o proteínas, pero también es posible y cada vez está más extendido el uso de técnicas de cuantificación sin marcaje, que se conocen como técnicas “*label-free*”. Este enfoque se fundamenta en que cuánto mayor sea la cantidad de proteína en la muestra, más péptidos de esa proteína se localizarán en el análisis por espectrometría de masas. En base a esto, la cuantificación relativa se puede llevar a cabo a través de la comparación de la intensidad máxima del mismo péptido o mediante el conteo espectral (es decir, contando el número de espectros MS/MS acumulados para cada proteína).²⁷

En el presente Trabajo de Fin de Máster se aplicaron técnicas proteómicas para realizar un estudio preliminar sobre la influencia de HMGB1 en el contenido proteico a nivel exosomal de una línea celular de cáncer de ovario.

2. OBJETIVOS

La demostrada asociación entre la proteína HMGB1 y el cáncer de ovario, junto con la creciente relevancia que han adquirido los exosomas en la investigación del cáncer, hacen que resulte de interés estudiar cómo afecta HMGB1 al perfil proteico característico de exosomas derivados de células cancerosas de ovario. Bajo estas premisas, se estableció como objetivo principal analizar diferencias en el contenido proteico de exosomas provenientes de células de la línea cancerosa de ovario SKOV-3 y su derivada *knockout* en el gen *HMGB1*. Referido a los objetivos específicos, se propuso:

- Expansión y cultivo de las mencionadas líneas celulares para la producción de exosomas.
- Aislamiento de exosomas mediante ultracentrifugación combinada con filtración.
- Caracterización de exosomas mediante microscopía electrónica de transmisión (*TEM*, por sus siglas en inglés *Transmission Electron Microscopy*) y *Western blot*.
- Estudio proteómico de los exosomas aislados basado en espectrometría de masas. El proceso consiste en una evaluación inicial de las muestras proteicas a través de la técnica SDS-PAGE y el método Bradford, la preparación de las mismas (digestión de las proteínas y limpieza de los péptidos), el análisis por LC-MS/MS y la interpretación de los resultados.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cultivo celular

Las dos líneas celulares de estudio (SKOV-3 y SKOV-3 *knockout* en *HMGB1*) se cultivaron en placas Petri de 150 mm de diámetro (p150) empleando como medio de cultivo DMEM suplementado con un 10% de suero bovino fetal y un 1% de una mezcla de penicilina-estreptomicina. Todos los procedimientos de cultivo celular se llevaron a cabo en una cámara de flujo laminar previamente esterilizada por radiación UV utilizando material estéril y las células se incubaron en una cámara de atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37 °C. Con el fin de conseguir el número de placas deseado con una confluencia del 90-100% se necesitaron sucesivos pases celulares. El protocolo para realizar un pase celular consiste en eliminar el medio de cultivo a las células, lavar con suero salino, añadir tripsina (proteasa que permite romper las uniones de las células a la placa de cultivo) y, a continuación, añadir medio (mínimo relación 1:3 tripsina:DMEM para conseguir la inactivación de la enzima) y homogenizar bien para, finalmente, trasladar la mezcla a nuevas placas (a las que previamente se les añadió el volumen de medio requerido).

3.2. Producción y aislamiento de exosomas

Para la producción de exosomas se cultivaron las células en medio DMEM no suplementado durante tres días. Tras dicho tiempo, se recogió el medio condicionado para proceder con el aislamiento de exosomas. En primer lugar, se realizó una centrifugación a 1,000 x g durante 10 min con el objetivo de eliminar células muertas, cuerpos apoptóticos y debris. El sobrenadante se centrifugó a 16,000 x g durante 60 min para separar microvesículas y el sobrenadante recuperado se filtró a través de un filtro de 0.22 µm para eliminar partículas en suspensión que pudieran quedar presentes. A continuación, se centrifugó a 100,000 x g durante 2 h y el *pellet* (que debía contener EVs de tamaño ~100 nm) se sometió a dos lavados (resuspendiendo en PBS y centrifugando a 100,000 x g durante 2 h). Finalmente, el *pellet* obtenido se resuspendió en: (1) PB (tampón fosfato) 0.1M para la caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y (2) tampón de lisis de Urea_2M/Tiourea_6M (en bicarbonato amónico 25 mM) para la realización del *Western Blot* y el estudio proteómico.

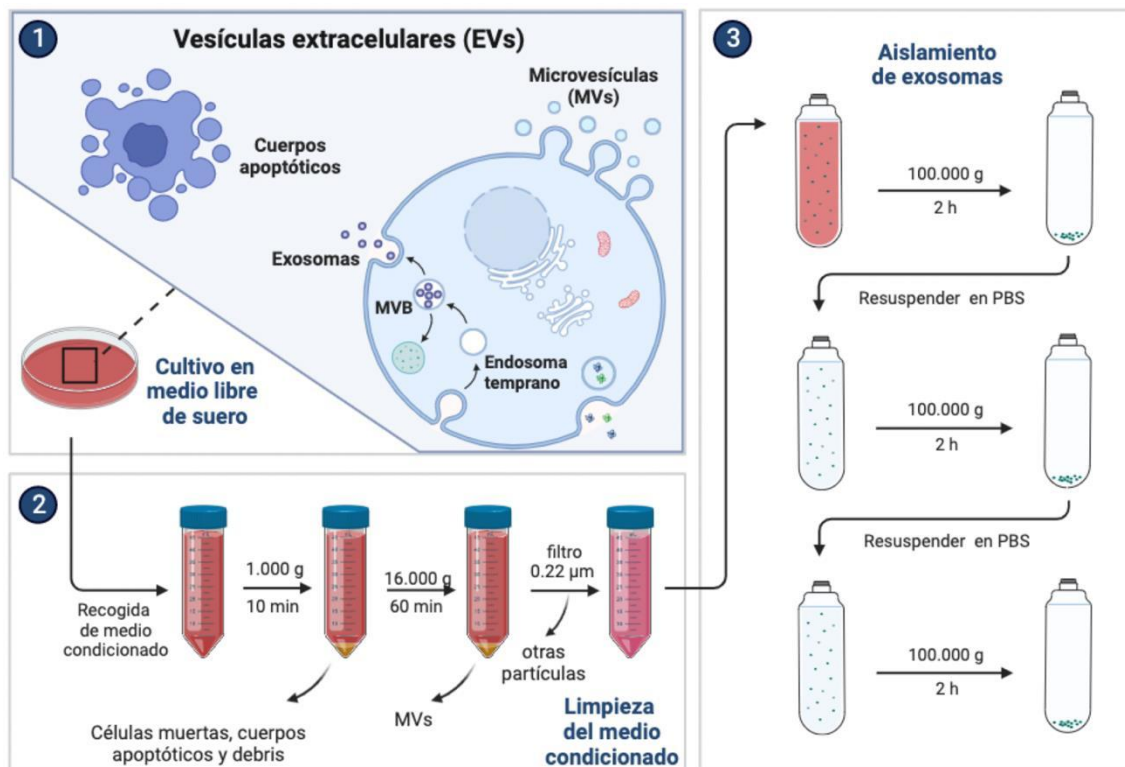


Figura 2. Esquema del procedimiento experimental para aislar exosomas a partir de cultivo celular.

3.3. Caracterización de exosomas

La caracterización de exosomas se realizó por microscopía electrónica de transmisión, que permite analizar su forma y tamaño, y por *Western Blot*, técnica con la que se pueden detectar marcadores proteicos específicos de exosomas.

3.3.1. Microscopía electrónica de transmisión

Las imágenes de los exosomas por microscopía electrónica de transmisión fueron tomadas y proporcionadas por el SAI (Servicios de Apoyo a la Investigación) de la UDC. No obstante, fue necesario realizar previamente en el laboratorio la fijación de las muestras. Para ello, se añadió sobre los exosomas (resuspendidos en PB 0.1M) glutaraldehído para obtener a una concentración final del 2.5%, y se mantuvo con agitación durante 2h a temperatura ambiente. A continuación, con el objetivo de eliminar el glutaraldehido, se realizó una centrifugación a 100,000 x g durante 2h y el *pellet* obtenido se resuspendió en PB 0.1M.

3.3.2. *Western blot*

La obtención de los extractos proteicos se llevó a cabo sometiendo a los exosomas resuspendidos en el tampón de lisis de Urea_{6M}/Tiourea_{2M} a un *vórtex* durante 20 min, seguido de un spin a 1,000 rpm, luego un tratamiento con ultrasonidos durante 10 min y finalmente un último spin a 14,000 rpm. A las muestras se les añadió tampón de carga Laemmli 5x (Tris-HCl 200mM pH 6.8, SDS 10%, glicerol 50%, beta-mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0,1%) para obtener una concentración final 1x y la desnaturalización de proteínas se llevó a cabo a 95°C durante 5 min. A continuación, se sometieron a una electroforesis monodimensional en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El gel separador se preparó al 10% de acrilamida y el concentrador al 4% con un grosor de 0.75 mm. Se empleó como marcador NZYColour Protein Marker II (NZYTech) y la electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 140 V utilizando el tampón de electroforesis (Tris-Base 0.02M, glicina 0.2M y SDS 0.003M). Finalizada la electroforesis, se realizó la transferencia a una membrana de fluoruro de polivinilo (previamente activada con metanol durante 15 s y lavada con agua durante 5 min) en el tampón de transferencia (Tris-Base 25 mM; glicina 192 mM y metanol 20%) aplicando 250 mA durante 1h. Tras bloquear la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con leche en polvo al 5% (p/v) disuelta en PBS-T (PBS suplementado con Tween 20 al 0.1%) para evitar uniones inespecíficas, se incubó con el anticuerpo primario FLOTILLIN-1 (1:1000, sc-74566, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 10 min con PBS-T, y se incubó la membrana con proteína G (dilución 1:5000 en la solución de bloqueo) durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, tras tres lavados con PBS-T, se reveló con un kit de quimioluminiscencia en el fotodocumentador de geles Molecular Imager Gel Doc XR+ (BioRad).

3.4. Estudio proteómico

Los extractos proteicos en Urea/Tiourea (descrita su obtención en el apartado 3.2. *Western Blot*) se utilizaron para realizar, en primer lugar, una cuantificación proteica mediante el método Bradford y un SDS-PAGE con tinción de plata. Los resultados obtenidos sirvieron para decidir qué cantidad de los mismos se debía emplear en la digestión con tripsina de las proteínas, la cuál se llevó a cabo una vez fueron reducidos y alquilados los residuos cisteína (para conseguir un despliegue óptimo de las proteínas

rompiendo de forma irreversible los enlaces disulfuro). A continuación, se realizó la limpieza de los péptidos mediante columnas C-18 en formato pipeta y, finalmente, el análisis LC-MS/MS.

3.4.1. SDS-PAGE con tinción con plata

Para el análisis de las proteínas por SDS-PAGE se prepararon geles de 0.75 mm con el separador al 10% de acrilamida y el concentrador al 4%. A las muestras se les añadió tampón de carga Laemmli 5x (Tris-HCl 200mM pH 6.8, SDS 10%, glicerol 50%, beta-mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0,1%) para obtener una concentración final 1x y las proteínas fueron desnaturalizadas a 100°C durante 5 min. La electroforesis se llevó a cabo en el tampón TEF 1x (Tris-HCl 0.025 mM pH 8.3, glicina 0.2 mM, SDS 0.1%) a un voltaje constante de 140 V, utilizando como marcador de pesos moleculares PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher). Para realizar la tinción con plata, en primer lugar, se fijó durante 30 min con etanol al 40% (20 mL etanol absoluto, 5 mL ácido acético glacial y 25 mL H₂O). Tras dos lavados de 5 min con 50 mL de H₂O cada uno, se sensibilizó durante 1 min con tiosulfato sódico 0.02% (100 µl de NaTiO₂ al 10% y 50 mL H₂O) y se realizaron de nuevo dos lavados con 50 mL de H₂O durante 1 min. A continuación, se tiñó el gel con 50 mL de una solución 0.2% p/v de nitrato de plata (100 mg AgNO₃, 37 µl formaldehído 37% y 50 mL H₂O). Transcurridos 30 min, se reveló el gel con la solución de revelado (1.5 g Na₂CO₃, 6.25 µl NaTiO₂ 10% p/v, 12.5 µl formaldehído 37% y 50 mL H₂O) hasta la aparición de bandas (3-10 min). Finalmente, se realizaron dos lavados de 10 s con 50 mL de H₂O y se paró la reacción con la solución de parada (1.5 g Tris Base, 5 mL ácido acético glacial y 45 mL H₂O).

3.4.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método Bradford (modificado con HCl). Para ello, se prepararon la curva estándar de BSA (8 puntos de 0 a 3 µg/µl en un volumen final de 10 µl) y las muestras (dilución 1/10 en un volumen final de 10 µl) por triplicado. A continuación, se les añadió 90 µl de HCl diluido (9.9 µl HCl 1N en 8.99 mL H₂O), se agitaron durante 5 min, se añadieron 150 µl de reactivo de Bradford diluido 1:2 y, tras agitar de nuevo durante 5 min, se realizaron las medidas de absorbancia a 570 nm en un lector de multiplacas.

3.4.3. Concentración de muestras proteicas por precipitación con acetona

Se añadieron a las muestras de proteínas 6 volúmenes de acetona, se mantuvieron a -20°C *overnight* y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 30 min a 4°C. En este caso, tras retirar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en una dilución ½ del tampón de lisis Urea_2M/Tiourea_6M en agua, aplicando un *vórtex* durante 20 min y ultrasonidos durante 5 min.

3.4.4. Digestión de proteínas

Las muestras se sometieron a una reducción con DTT 10 mM en bicarbonato amónico (BA) 25mM durante 1h a 37°C y posteriormente a una alquilación con iodoacetamida 50 mM en BA 25mM durante 45 min a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, se diluyeron con BA 25 mM hasta conseguir una concentración final de urea por debajo de 1 M. Con ayuda de papel indicador de pH se comprobó que el pH fuera entorno a 8, fundamental para la actividad de la tripsina. Una vez comprobado, se realizó la digestión incubando con tripsina (relación enzima:proteína 1:40) durante 16 h a 37°C. La reacción enzimática se detuvo acidificando con ácido trifluoroacético 10% y de nuevo se comprobó el pH ácido empleando papel indicador. Finalmente, las muestras se concentraron hasta un volumen final de 20-30 µl en una centrífuga a vacío.

3.4.5. Limpieza de péptidos

Para eliminar sales y posibles contaminantes que pudieran interferir en los análisis de espectrometría de masas se emplearon columnas NuTip C-18. En primer lugar, se limpió la resina de C18 con la *Releasing Solution TFA* (acetonitrilo (ACN) 60%, ácido trifluoroacético (TFA) 0.1%) mediante 5 lavados de 50 µl y se acondicionó pasando 3 veces 50 µl de *Binding solution TFA* (TFA 0.1%). A continuación, se pasó la muestra 60 veces con el objetivo de que los péptidos quedaran retenidos. Al terminar, se realizaron 5 lavados de 50 µl de *Binding solution TFA* (TFA 0.1%) y otros 5 de 50 µl de *Binding solution FA* (ácido fórmico (FA) 0.1%). Finalmente, se llevó a cabo la elución con la *Releasing solution FA* (ACN 60%, FA 0.1%) y las muestras se secaron totalmente en una centrífuga de vacío.

3.4.6. Análisis del componente proteico por LC-MS/MS

Las muestras de péptidos secas se reconstituyeron en 2% de ACN y 0.1% de FA en agua. Aproximadamente 200 ng de la mezcla de péptidos se inyectó en un sistema nanoLC (nanoElute, Bruker Daltonics) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (timsTOF Pro, Bruker Daltonics) con una fuente de ionización por electrospray (ESI) (CaptiveSpray, Bruker Daltonics). La cromatografía líquida (nanoLC) se llevó a cabo a 50°C con un flujo constante de 500 nL/min en una columna de fase reversa de C18. La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando un gradiente lineal de 2-35 % de tampón B (100% ACN, 0.1 % FA) durante 20 min en un tiempo de elución total de 25 minutos (Tabla 1). Tras la separación, los péptidos fueron ionizados y analizados en el espectrómetro de masas.

Tiempo (min)	% B
0	2
20	35
20.5	95
25	95

Tabla 1. Gradiente utilizado en el sistema nanoLC.

Los archivos de datos resultantes se procesaron con PEAKSPro Studio 10.6 20201221 (Bioinformatics solutions Inc.). La identificación de proteínas se realizó utilizando la bases de datos UniProtKB/Swiss-Prot database_2021_02_20383_human. La tasa de falsos positivos (FDR) se fijó en menos del 1% para las coincidencias del espectro de los péptidos y la identificación de los grupos de proteínas. Para cuantificar la abundancia relativa de e proteínas entre las dos condiciones, se utilizó la función de cuantificación de marcaje libre del software PEAKS. La normalización de las muestras se hizo empleando la señal del cromatograma de todos los iones (TIC) de cada muestra entre la TIC de una muestra de referencia que es automáticamente seleccionada por el *software*. Las proteínas a cuantificar debían estar identificadas por más de 3 péptidos y se estableció una significancia de 20 (p valor < 0.01) y un ratio entre las diferentes condiciones (fold change) > 4. La cuantificación relativa se hizo utilizando el área suma de los tres péptidos únicos con mayor intensidad. Se empleó un FDR < 1% y se aplicó un test ANOVA.

3.4.7. Anotación funcional

Con los datos obtenidos por espectrometría de masas se realizó un análisis de anotación funcional empleando las herramientas proporcionadas por DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de exosomas

La caracterización de los exosomas aislados de la línea SKOV-3 y su derivada *knockout* en HMGB1 se realizó por microscopía electrónica de transmisión y por *Western blot*.

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (Figura 3A) permitieron comprobar la presencia de vesículas de forma redondeada con la distribución de tamaños esperada para exosomas (40-200 nm), pudiendo considerar que el protocolo de ultracentrifugación empleado para su aislamiento es adecuado. No obstante, se observan otro tipo de partículas contaminantes que, aunque aparecen en muy baja proporción, llevan a concluir que debería ser optimizado para obtener los exosomas con mayor grado de pureza. Por otra parte, es preciso indicar que no se puede garantizar la total ausencia de otro tipo de vesículas extracelulares con la metodología utilizada.

Para confirmar la identidad bioquímica y la integridad de los exosomas obtenidos se llevó a cabo la identificación por *Western Blot* de flotilina-1, una proteína transmembranal típicamente considerada marcador de exosomas (se muestra un ejemplo representativo en la Figura 3B) ²⁸. Existen otras muchas proteínas características de exosomas cuya identificación apoyaría el resultado, como pueden ser proteínas de la familia de las tetraspaninas (CD9, CD63 o CD81, entre otras), pero podrán ser identificadas posteriormente en el estudio proteómico.²⁸

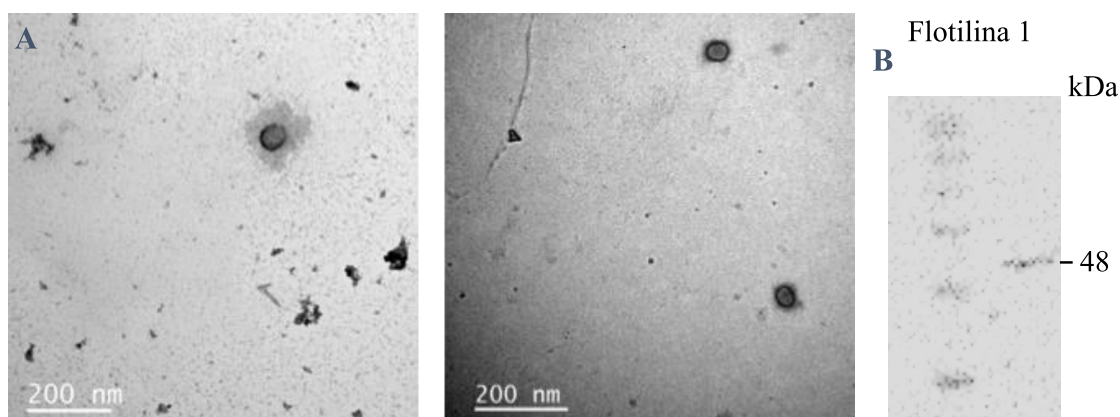


Figura 3. Caracterización de exosomas. (A) Imagen de microscopía electrónica de los exosomas aislados de la línea celular SKOV-3 y de su derivada *knockout* en HMGB1. (B) Western blot de Flotilina-1 (marcador de exosomas).

4.2. Estudio proteómico

4.2.1. Evaluación de las muestras proteicas por SDS-PAGE y Bradford

Los extractos proteicos (en urea/tiourea) derivados de los exosomas aislados se evaluaron en términos de calidad y cantidad con el fin de decidir cómo llevar a cabo su preparación para la técnica LC-MS/MS. Para dicha evaluación se hizo uso de la técnica SDS-PAGE (con tinción de plata) y del método de cuantificación proteica de Bradford.

En un inicio se disponía de dos extractos proteicos de cada condición, es decir, dos procedentes de exosomas aislados de la línea celular SKOV-3 y dos de SKOV-3 *knockout* en HMGB1 (a los que se hará referencia con los términos WT y KO, respectivamente). En la Figura 4 se proporciona el gel de poliacrilamida resultante de la electroforesis (Figura 4A) y la concentración proteica y cantidad de proteína total disponible de cada muestra (Figura 4B). Los resultados obtenidos revelaron que la calidad de todas las muestras era adecuada (no se aprecia un grado de degradación significativo). No obstante, la concentración en las dos muestras WT era demasiado baja, ya que se debe partir de un volumen pequeño (~10-20 μ l) para realizar la preparación de la muestra para el análisis LC-MS/MS, que supondría una cantidad de proteína final no suficiente. Una posible explicación a la diferencia de concentración proteica entre las muestras WT y KO es que las células de la línea celular SKOV-3 *knockout* en HMGB1 liberen más exosomas. Dicha hipótesis deberá ser testada, pero hasta el momento lo que parece más plausible es que la diferencia se deba a errores técnicos durante el procedimiento experimental para aislar los exosomas de la línea celular SKOV-3.

Con el objetivo de conseguir una muestra proteica de la condición WT de pequeño volumen y concentrada, los dos extractos proteicos se juntaron para someterlos al método de precipitación con acetona y el precipitado resultante se disolvió en un volumen de 20 μ l. El análisis por electroforesis SDS-PAGE de la muestra WT finalmente obtenida (Figura 5A) mostró que la concentración proteica seguía siendo baja, por lo que se decidió emplear todo el volumen disponible (15 μ l) para proceder con la digestión (no realizando la cuantificación por el método Bradford para evitar perder más muestra). Es preciso indicar que, pese a la gran sensibilidad de la técnica LC-MS/MS, la cantidad de proteína de la muestra no era suficiente para garantizar que el análisis proteómico se desarrollara correctamente. Por otra parte, en cuanto a la condición KO, se decidió concentrar sólo

uno de los extractos proteicos por el mismo método, resuspendiendo el precipitado en un volumen final de 20 μ l. Su análisis, tanto por SDS-PAGE (Figura 5A) como por el método Bradford (Figura 5B), indicó que la muestra era adecuada para llevar a cabo la digestión (se disponía de \sim 11 μ g de proteína en un volumen final de 16 μ l).

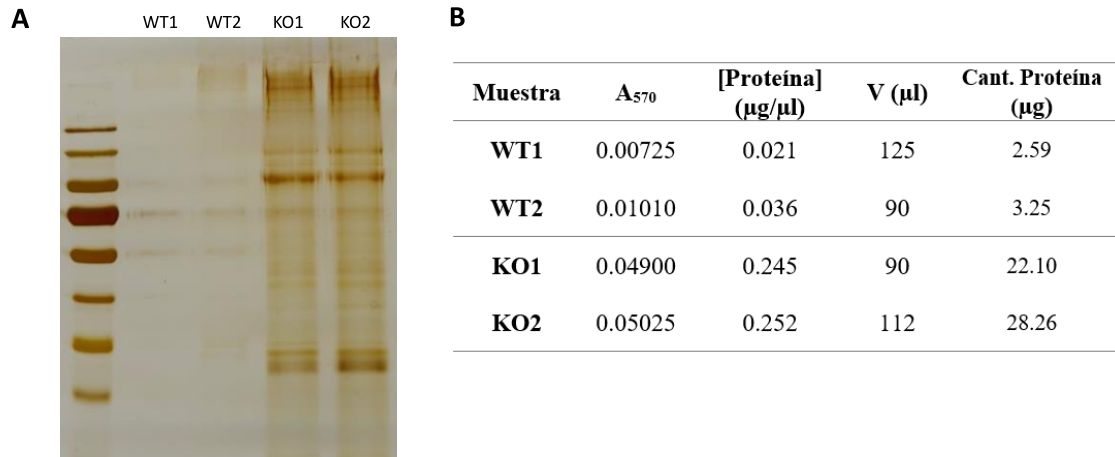


Figura 4. Gel SDS-PAGE (acrilamida al 10%, tinción con plata) que ilustra el perfil proteico representativo de las muestras WT (8 μ l en Vf=10 μ l) y KO (8 μ l en Vf=10. **B.** Cuantificación mediante el método Bradford (modificado con HCl) de la concentración proteica y cálculo de la cantidad de proteína total disponible.

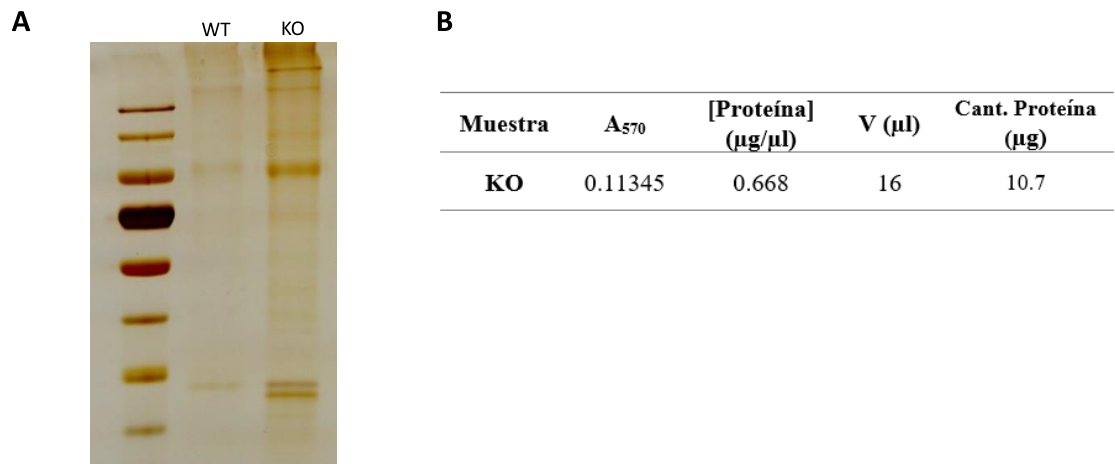


Figura 5. Gel SDS-PAGE (acrilamida al 10%, tinción con plata) que ilustra el perfil proteico representativo de la muestra WT (5 μ l en Vf=10 μ l) y KO (2 μ l en Vf=10) tras la precipitación de las proteínas con acetona. **B.** Cuantificación mediante el método Bradford (modificado con HCl) de la concentración proteica de la muestra KO y cálculo de la cantidad de proteína total disponible.

4.2.2. Análisis por LC-MS/MS

Tras la preparación de las muestras WT y KO, que conllevó la digestión enzimática y la limpieza de los péptidos, se analizaron por LC-MS/MS dos réplicas técnicas de cada una. Cabe señalar que al analizar sólo una réplica biológica de cada condición los resultados obtenidos no son representativos y, por tanto, no se pueden extraer conclusiones fidedignas. No obstante, esta primera aproximación permite, por un lado, valorar si el proceso de obtención de la muestra fue adecuado y, por otro, aprender a manejar los datos y a utilizar herramientas de análisis y de interpretación de los resultados.

4.2.2.1. Identificación

Se identificaron 1721 proteínas totales en la condición WT (proteínas de exosomas aislados de la línea celular SKOV-3) y 2834 proteínas totales en la condición KO (proteínas de exosomas aislados de la línea celular SKOV-3 *knockout* en HMGB1), teniendo en consideración las dos réplicas técnicas para cada condición. En la Tabla 2 se muestran la cantidad de péptidos, grupos de proteínas (que comparten dos o más péptidos) y proteínas totales identificados en cada caso. El hecho de que se haya obtenido un número similar de proteínas totales identificadas en las réplicas técnicas (CV<5%) valida la alta reproducibilidad del sistema LC-MS/MS.

Tabla 2. Péptidos, grupos de proteínas y proteínas totales en muestras WT y KO identificadas mediante LC-MS/MS. R: réplica de cada muestra; CV: coeficiente de variación (%) de las proteínas totales identificadas para cada réplica.

Muestra	Péptidos	Proteínas		CV(%)
		Grupos	Totales	
WT_R1	7195	1284	1568	1,384
WT_R2	7450	1297	1599	
WT	8412	1407	1721	
KO_R1	15221	2230	2627	1,359
KO_R2	14965	2176	2577	
KO	17788	2418	2834	

La gran diferencia en el número de proteínas identificadas entre la condición WT y KO (~1000 proteínas) se puede atribuir a la diferencia en la calidad de las muestras. Como se comentó en el apartado 4.2.3. *Evaluación de las muestras proteicas por SDS-PAGE*, la limitada cantidad de proteína disponible de la condición WT podía derivar en pérdida de información en el análisis por LC-MS/MS.

Para analizar posibles diferencias entre las dos condiciones, se decidió ser estricto con la identificación seleccionando sólo aquellas proteínas que hubieran sido identificadas con al menos tres péptidos. En la Figura 6, se muestra el diagrama de Venn que indica que, entre las proteínas identificadas con ≥ 3 péptidos, hay 97 proteínas que están presentes únicamente en la condición WT, 657 que son exclusivas de la condición KO y 566 que son comunes a ambas. Se observa, por tanto, que exosomas de células SKOV-3 *knockout* en HMGB1 presentan un mayor número de proteínas específicas respecto a exosomas de células SKOV-3 Wt. Esto reflejaría que la ausencia de HMGB1 en la línea celular SKOV-3 resulta en un cambio importante en el contenido proteico de sus exosomas. Si bien, al disponer de sólo una réplica biológica de cada condición y sospechar de la calidad de la muestra WT, estos resultados sólo pueden ser tomados como una referencia.

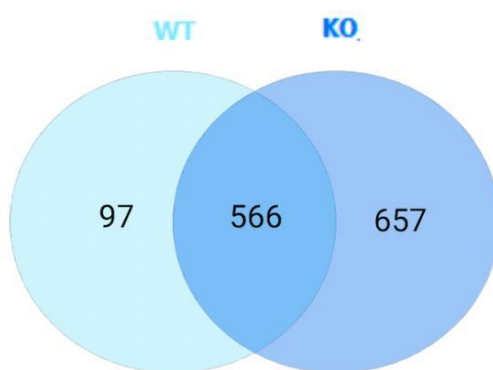


Figura 6. Diagrama de Venn con proteínas (identificadas utilizando ≥ 3 péptidos) diferenciales y comunes de exosomas aislados de células de la línea celular SKOV3 (WT) y células de la línea celular SKOV3 *knockout* en HMGB1 (KO).

4.2.2.2. Cuantificación relativa por marcaje libre

Se llevó a cabo una cuantificación relativa por marcaje libre de las proteínas entre las dos condiciones de estudio. Se escogieron sólo aquellas proteínas que hubieran sido identificadas con al menos 3 péptidos y se estableció una significancia superior a 20 y un

ratio (fold change) ≥ 4 (ver Volcano plot en la Figura 7). El denominado ratio (fold change) se trata del ratio que resulta de comparar la expresión de una proteína en cada condición (en este caso KO) con respecto a la condición control (en este caso WT), que el programa le asigna el valor de 1 como valor de referencia.

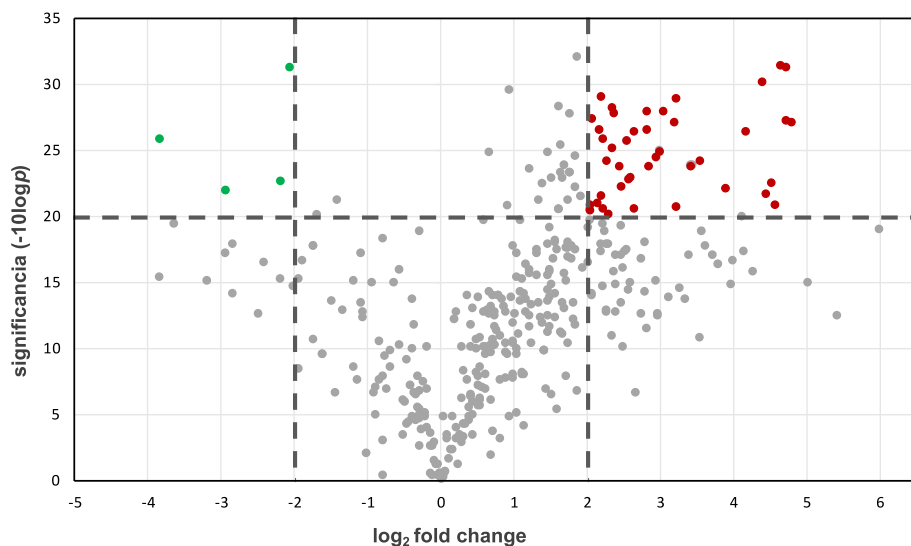


Figura 7. Volcano plot. Para cuantificar los niveles relativos de las proteínas entre las dos condiciones (WT y KO) se llevó a cabo la cuantificación por marcaje libre mediante el software PEAKS. La significancia se fijó en 20 ($p\text{-valor} < 0.01$) y el ratio (fold change; FC) ≥ 4 ($\log_2\text{FC} \geq 2$), empleando ≥ 3 péptidos.

En la Tabla 3 se muestra la lista de proteínas y el ratio correspondiente, junto una pequeña descripción de las mismas. Las proteínas son nombradas mediante un identificador único para cada una, conocido con el término inglés *accesión number*. De nuevo es preciso recalcar que los resultados obtenidos no son concluyentes, puesto que se carece de evidencia estadística. Es también por ese motivo por lo que se decidió mostrar sólo proteínas con una notable diferencia de abundancia entre las condiciones (se fijó un ratio ≥ 4), cuando podría ser interesante analizar proteínas con un ratio inferior.

Tabla 3. Lista de las proteínas cuantificadas y su ratio (*fold change*). Se seleccionaron proteínas identificadas con ≥ 3 péptidos, con una significancia ≥ 20 y un ratio ≥ 4 .

Accesion	Ratio	Descripción
Q16270	-14,29	Insulin-like growth factor-binding protein 7
P04264	-7,69	Keratin type II cytoskeletal 1
Q9H444	-4,55	Charged multivesicular body protein 4b
P06703	-4,17	Protein S100-A6
P28066	4,12	Proteasome subunit alpha type-5
O43865	4,13	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like protein 1
Q96HN2	4,13	Adenosylhomocysteinase 3
Q00610	4,24	Clathrin heavy chain 1
Q14517	4,43	Protocadherin Fat 1
P13497	4,49	Bone morphogenetic protein 1
Q86X29	4,57	Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor
P25398	4,58	40S ribosomal protein S12
P10253	4,67	Lysosomal alpha-glucosidase
Q13200	4,69	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2
P31939	4,79	Bifunctional purine biosynthesis protein ATIC
P60953	4,95	Cell division control protein 42 homolog
Q8WW15	5,06	Choline transporter-like protein 1
Q14849	5,09	StAR-related lipid transfer protein 3
Q969P0	5,22	Immunoglobulin superfamily member 8
Q08431	5,42	Lactadherin
P60900	5,51	Proteasome subunit alpha type-6
P28074	5,82	Proteasome subunit beta type-5
P63244	5,92	Receptor of activated protein C kinase 1
Q99653	6,04	Calcineurin B homologous protein 1
P25788	6,27	Proteasome subunit alpha type-3
P18084	6,29	Integrin beta-5
Q9P0M6	7,04	Core histone macro-H2A.2
P62906	7,04	60S ribosomal protein L10a
Q9UNF0	7,14	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2
P48643	7,78	T-complex protein 1 subunit epsilon
P68104	7,95	Elongation factor 1-alpha 1
Q5VTE0	7,95	Putative elongation factor 1-alpha-like 3
P14618	8,28	Pyruvate kinase PKM
P40227	9,16	T-complex protein 1 subunit zeta
P26006	9,28	Integrin alpha-3
P20618	9,33	Proteasome subunit beta type-1
Q14764	10,78	Major vault protein
P12956	10,8	X-ray repair cross-complementing protein 6
P62277	10,91	40S ribosomal protein S13
P06733	11,71	Alpha-enolase
P11166	14,88	Solute carrier family 2 facilitated glucose transporter member 1
P62873	17,99	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1
P10646	21,11	Tissue factor pathway inhibitor
P27487	21,67	Dipeptidyl peptidase 4
P23229	22,96	Integrin alpha-6
P29144	23,73	Tripeptidyl-peptidase 2
P62081	25,27	40S ribosomal protein S7
Q02809	26,24	Procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1
P21926	26,44	CD9 antigen
P62701	28,05	40S ribosomal protein S4 X isoform

4.2.3. Análisis de datos

En primer lugar, cabe indicar que HMGB1 es una de las proteínas identificadas en los exosomas aislados de la línea celular SKOV-3. Esto sugiere que HMGB1 podría ejercer un papel relevante en el cáncer de ovario a través de su actividad a nivel exosomal.

Las diferencias en el contenido proteico de los exosomas derivadas de deplecionar HMGB1 podrían ayudar a comprender sus implicaciones en la enfermedad. No obstante, como en este estudio no se dispone de un conjunto de datos representativos, no se pudo hacer un análisis en profundidad. De todas formas, con la motivación de familiarizarse con prácticas de análisis de datos proteómicos, se trató de interpretar los datos de identificación obtenidos, aunque sin una examinación exhaustiva ni una discusión detallada de los resultados (puesto que no eran concluyentes). Con los datos resultantes de la cuantificación por *label free* se decidió no llevar a cabo ningún análisis.

Los avances tecnológicos de experimentación a gran escala, donde se enmarca la proteómica basada en MS, posibilitaron la obtención de grandes conjuntos de datos, que a su vez crearon la necesidad de desarrollar herramientas bioestadísticas y bioinformáticas que permitieran comprender su significado biológico. En este sentido, aunque la interpretación de datos proteómicos sigue siendo una tarea desafiante, el uso de programas de anotación funcional se han convertido en una herramienta esencial. Forma parte de la anotación funcional de una proteína identificar procesos biológicos en los que puede estar implicada, su localización o localizaciones celulares, su función molecular, moléculas con las que interacciona fenotipos a los que está asociada, etc. Una de las estrategias de anotación funcional más extendidas se centra el uso de ontologías. En el presente Trabajo de Fin de Máster, se llevaron a cabo análisis de enriquecimiento basados en términos de ontología de genes (GO), que se centran en detectar cuáles son los términos GO que están más representados en una lista de proteínas de entrada (dentro de un tipo de categoría en concreto, ya sea por ejemplo Proceso biológico, Función molecular o Componente celular). Así, el análisis de enriquecimiento puede revelar procesos o rutas biológicas que están relacionadas con una condición biológica determinada, y encontrar diferencias entre distintas condiciones. Además, el estudio se complementó con información extraída directamente de la búsqueda bibliográfica y en bases de datos.²⁹

Atendiendo a la localización celular, se observó que el 76.3% de las proteínas presentes en ambas condiciones (en exosomas de la línea celular SKOV-3, tanto *wild type* como *knockout* en HMGB1) se enmarcan dentro del término Exosoma extracelular. Además de flotilin-1, que fuera previamente detectada por *Western Blot*, se identificaron proteínas consideradas típicos marcadores de exosomas como CD9, CD63, CD81, Hsp70, Hsp90, TSG101, anexina I o anexina II ²⁸. Con el análisis de las proteínas exclusivas de cada condición no se infirió ninguna diferencia destacable, pues en ambos casos hay una gran proporción de proteínas asociadas a una localización exosomal, pero también citoplasmática, nuclear o de membrana.

Con respecto a los procesos biológicos, el análisis GO del contenido proteico común reveló que existen proteínas involucradas en multitud de procesos distintos, como la traducción, adhesión celular, transducción de señales, procesos apoptóticos, migración celular o estabilización de proteínas (Figura 8). Como se puede observar y cabía esperar al tratarse de exosomas derivados de células cancerosas, aparecen procesos que están estrechamente relacionados con el cáncer. De hecho, algunas de las proteínas identificadas ya habían sido descritas como proteínas presentes en exosomas con una clara implicación en el cáncer de ovario. Es el caso, entre otras, de la proteína CD44, que es transportada por exosomas de células cancerosas de ovario a células mesoteliales peritoneales para favorecer la capacidad invasiva ³⁰; EpCAM, que juega un papel crucial en la tumorigénesis y fue localizada en exosomas purificados a partir de líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario ³¹; o EGFR, que es una de las proteínas propuestas como biomarcador en exosomas de cáncer de ovario ³².

Analizando por separado las proteínas exclusivas de cada condición (Figura 8), se concluye que la ausencia de HMGB1 cambia el patrón de los procesos biológicos en los que los exosomas de la línea celular SKOV-3 podrían estar implicados. Se encontró que un porcentaje significativo de las proteínas únicas de los exosomas aislados de la línea celular SKOV-3 (WT) están relacionadas con el ensamblaje de nucleosomas, la transducción de señales, la regulación del silenciamiento génico, la epigenética, la organización del telómero o la replicación de ADN dependiente del ensamblaje de nucleosoma. Por su parte, en el análisis del contenido proteico único de los exosomas derivados de la línea *knockout* en HMGB1 (KO), resultaron tener una elevada representación los procesos de transducción de señales, transporte proteico, regulación negativa de apoptóticos, regulación positiva de proliferación celular, adhesión celular y

ubiquitinización de proteínas, entre otros. Un aspecto resaltable es que en los exosomas en los que HMGB1 está ausente están menos representados procesos relacionados con la remodelación de cromatina y regulación génica (por ejemplo, carecen de una serie de histonas sí presentes en exosomas con HMGB1). Otra observación a destacar es que en ellos se identificaron un mayor número de proteínas relacionadas con el cáncer, y en concreto con el cáncer de ovario, como puede ser TGFβ1³³, DNAJA1³⁴, NQO1³⁵ o CARM1³⁶, entre otras. No obstante, entre las proteínas únicas identificadas en exosomas derivados de la línea cancerosa WT también se encontraron proteínas asociadas al cáncer, siendo de interés por ejemplo ARG1, ya que los exosomas portadores de esta proteína aceleran el crecimiento del cáncer de ovario a través de la supresión de células T³⁷.

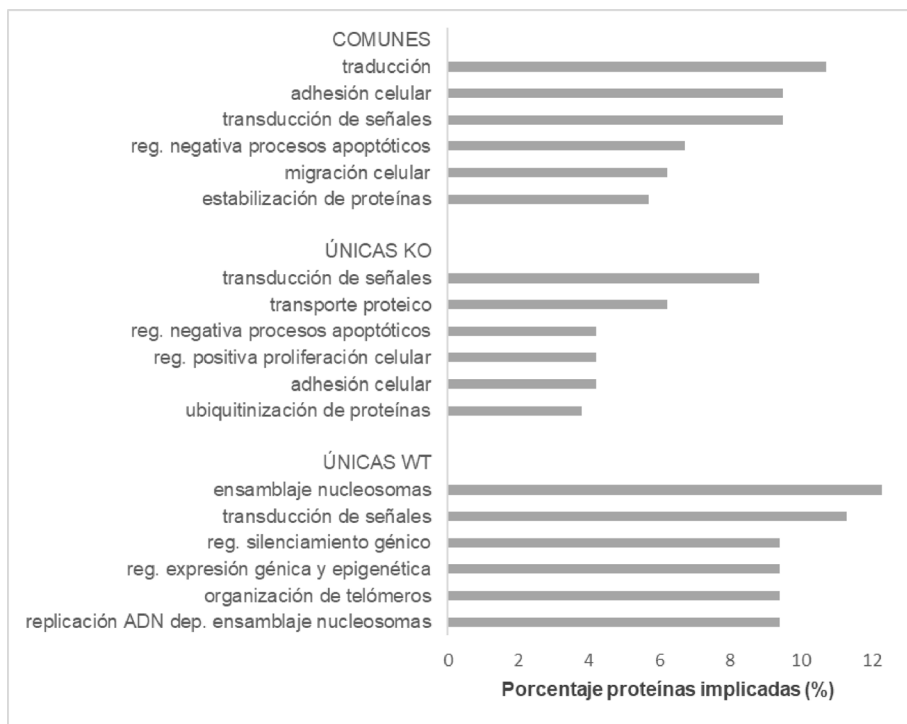


Figura 8. Análisis de enriquecimiento basado en GO en la categoría Procesos Biológicos de las proteínas comunes y diferenciales de exosomas aislados de SKOV-3 (WT) y SKOV-3 *knockout* HMGB1 (KO). Se utilizó el *software* DAVID. En el eje y aparecen los distintos términos de OG y el eje x representa el porcentaje de proteínas que están implicadas en cada término.

Otro enfoque que se podría haber aplicado para la interpretación de los datos es hacer uso de herramientas basadas en redes de interacción, que permiten deducir modelos de redes biológicas y vías bioquímicas, y que a su vez se pueden integrar con las anotaciones. Así,

sería útil determinar el interactoma de HMGB1 en exosomas de SKOV-3 y observar las repercusiones que tendría la ausencia de HMGB1. Por ejemplo, en este trabajo se vio que entre las proteínas exclusivas de exosomas de SKOV-3 se encontraba MAP1LC3B, proteína descrita como interactante de HMGB1, pero no entre las proteínas exclusivas de exosomas de SKOV-3 sin HMGB1. No obstante, se propone como estrategia de cara a la continuidad del estudio, cuando se consiga caracterizar en detalle el perfil proteico de los exosomas.

5. CONCLUSIONES

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

- Se ha conseguido aislar los exosomas derivados de las líneas celulares SKOV-3 y SKOV-3 *knockout* en HMGB1 mediante ultracentrifugación combinada con filtración.
- Tanto las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión, como la detección de una proteína considerada marcador de exosomas por *Western blot*, han permitido la caracterización de los exosomas aislados.
- El análisis por LC-MS/MS permitió identificar proteínas comunes y diferenciales de las dos condiciones de estudio, así como la cuantificación por técnicas de *label free*. Los resultados obtenidos sugieren que la ausencia de HMGB1 en los exosomas de SKOV-3 resulta en un cambio en el patrón de los procesos celulares en los que están involucrados derivado, en parte, del cambio en el perfil proteico.

Debido a que el estudio del papel de HMGB1 a nivel exosomal en cáncer de ovario se inició con el presente trabajo y que el tiempo de dedicación del mismo fue limitado, todavía se encuentra en una fase inicial. Como continuación del proyecto se propone, en primer lugar, optimizar el proceso de aislamiento de exosomas para aumentar el grado de pureza y obtener muestras con mayor cantidad de proteína. A partir de ese momento se podrá realizar un análisis de LC-MS/MS con un mayor número de réplicas biológicas para poder interpretar los datos en profundidad. Los resultados obtenidos deberán ser validados mediante otro tipo de estudios funcionales, haciendo uso de otras técnicas como *Western Blot*.

CONCLUSIÓNS

En vista dos resultados obtidos e atendendo aos obxectivos propostos, recóllense as seguintes conclusións:

- Conseguiuse illar os exosomas derivados das liñas celulares SKOV-3 e SKOV-3 *knockout* en HMGB1 mediante ultracentrifugación combinada con filtración
- Tanto as imaxes obtidas por microscopía electrónica de transmisión, como a detección dun proteína considerada marcador de exosomas por *Western blot*, permitiron a caracterización dos exosomas illados.
- A análise por LC-MS/MS permitiu identificar proteínas comúns e diferenciais das dúas condicións de estudo, así como a cuantificación por técnicas de *label free*. Os resultados obtidos suxiren que a ausencia de HMGB1 nos exosomas de SKOV-3 resulta nun cambio no patrón dos procesos celulares nos que están involucrados derivado, en parte, polo cambio no perfil proteico.

Debido a que o estudo do papel de HMGB1 a nivel exosomal en cancro de ovario iniciouse co presente traballo e que o tempo de dedicación do mesmo foi limitado, aínda se atopa nunha fase inicial. Como continuación do proxecto proponse, en primeiro lugar, optimizar o proceso de illamento de exosomas para aumentar o grao de pureza e obter mostras con maior cantidade de proteína. A partir dese momento poderase realizar unha análise de LC-MS/MS cun maior número de réplicas biolóxicas para poder interpretar os datos en profundidade. Os resultados obtidos deberán ser validados mediante outro tipo de estudos funcionais, facendo uso doutras técnicas como *Western Blot*.

CONCLUSIONS

Considering the obtained results and the proposed objectives, the following conclusions can be drawn:

- It has been possible to isolate the exosomes derived from the SKOV-3 and SKOV-3 knockout cell lines in HMGB1 by means of ultracentrifugation combined with filtration.
- The images obtained by transmission electron microscopy and the detection of a protein considered to be a marker of exosomes by Western blot have allowed the characterization of isolated exosomes.
- The analysis by LC-MS/MS allowed to identify common and differential proteins of the two study conditions, as well as the quantification by label free techniques. The results obtained suggest that the absence of HMGB1 in SKOV-3 exosomes results in a change in the pattern of the cellular processes in which they are involved, partially due to the change in the protein profile.

Due to the fact that the study of the role of HMGB1 at the exosomal level in ovarian cancer began with the present work and that the time dedicated to it was limited, it is still in an initial phase. As a continuation of the project, it is proposed, firstly, to optimize the exosome isolation process to increase the degree of purity and obtain samples with a greater amount of protein. From that moment on, an LC-MS/MS analysis can be carried out with a greater number of biological replicates in order to be able to interpret the data in depth. The results obtained must be validated through other types of functional studies, using other techniques such as Western Blot.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- (2) Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71* (3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- (3) Reid, B. M.; Permuth, J. B.; Sellers, T. A. Epidemiology of Ovarian Cancer: A Review. *Cancer Biol. Med.* **2017**, *14* (1), 9–32. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084>.
- (4) Stewart, C.; Ralyea, C.; Lockwood, S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin. Oncol. Nurs.* **2019**, *35* (2), 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.001>.
- (5) Momenimovahed, Z.; Tiznobaik, A.; Taheri, S.; Salehiniya, H. Ovarian Cancer in the World: Epidemiology and Risk Factors. *Int. J. Womens. Health* **2019**, *11*, 287–299. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S197604>.
- (6) Ueland, F. A Perspective on Ovarian Cancer Biomarkers: Past, Present and Yet-To-Come. *Diagnostics* **2017**, *7* (1), 14. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7010014>.
- (7) Lheureux, S.; Braunstein, M.; Oza, A. M. Epithelial Ovarian Cancer: Evolution of Management in the Era of Precision Medicine. *CA. Cancer J. Clin.* **2019**, 280–304. <https://doi.org/10.3322/caac.21559>.
- (8) Mashouri, L.; Yousefi, H.; Aref, A. R.; Ahadi, A. M.; Molaei, F.; Alahari, S. K. Exosomes: Composition, Biogenesis, and Mechanisms in Cancer Metastasis and Drug Resistance. *Mol. Cancer* **2019**, *18* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0991-5>.
- (9) Gurunathan, S.; Kang, M.; Jeyaraj, M.; Qasim, M.; Kim, J. Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells* **2019**, *8* (4), 307.
- (10) Yamamoto, T.; Kosaka, N.; Ochiya, T. Latest Advances in Extracellular Vesicles: From Bench to Bedside. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2019**, *20* (1), 746–757. <https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1629835>.
- (11) Shimizu, A.; Sawada, K.; Kimura, T. Pathophysiological Role and Potential Therapeutic

- Exploitation of Exosomes in Ovarian Cancer. *Cells* **2020**, *9* (4). <https://doi.org/10.3390/cells9040814>.
- (12) Ye, M.; Wang, J.; Pan, S.; Zheng, L.; Wang, Z. W.; Zhu, X. Nucleic Acids and Proteins Carried by Exosomes of Different Origins as Potential Biomarkers for Gynecologic Cancers. *Mol. Ther. - Oncolytics* **2022**, *24* (109), 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.12.005>.
- (13) Wang, J.; Sun, X.; Zhao, J.; Yang, Y.; Cai, X.; Xu, J.; Cao, P. Exosomes: A Novel Strategy for Treatment and Prevention of Diseases. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8* (JUN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00300>.
- (14) Dai, J.; Su, Y.; Zhong, S.; Cong, L.; Liu, B.; Yang, J.; Tao, Y.; He, Z.; Chen, C.; Jiang, Y. Exosomes: Key Players in Cancer and Potential Therapeutic Strategy. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5* (1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00261-0>.
- (15) Nakamura, K.; Sawada, K.; Kobayashi, M.; Miyamoto, M.; Shimizu, A.; Yamamoto, M.; Kinose, Y.; Kimura, T. Role of the Exosome in Ovarian Cancer Progression and Its Potential as a Therapeutic Target. *Cancers (Basel)*. **2019**, *11* (8), 1–16. <https://doi.org/10.3390/cancers11081147>.
- (16) Feng, W.; Dean, D. C.; Hornicek, F. J.; Shi, H.; Duan, Z. Exosomes Promote Pre-Metastatic Niche Formation in Ovarian Cancer. *Mol. Cancer* **2019**, *18* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1049-4>.
- (17) Ugrinova, I.; Pasheva, E. HMGB1 Protein: A Therapeutic Target Inside and Outside the Cell. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **2017**, *107*, 37–76. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2016.10.001>.
- (18) Štros, M. HMGB Proteins: Interactions with DNA and Chromatin. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **2010**, *1799* (1–2), 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.09.008>.
- (19) Ángel, V.-V.; Aida, B.-A.; Agustín, R.-D.; Mónica, L.-M.; Esther, R.-B.; Manuel, B.; Isabel, G.-S. M.; Esperanza, C. M. HMGB Proteins from Yeast to Human. Gene Regulation, DNA Repair and Beyond. *Old Yeasts - New Quest.* **2017**. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70126>.
- (20) Barreiro-Alonso, A.; Lamas-Maceiras, M.; Rodríguez-Belmonte, E.; Vizoso-Vázquez, Á.; Quindós, M.; Cerdán, M. E. High Mobility Group B Proteins, Their Partners, and Other

- Redox Sensors in Ovarian and Prostate Cancer. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5845061>.
- (21) Ranzato, E.; Martinotti, S.; Patrone, M. Emerging Roles for HMGB1 Protein in Immunity, Inflammation, and Cancer. *ImmunoTargets Ther.* **2015**, 101. <https://doi.org/10.2147/itt.s58064>.
- (22) Wang, H.; Li, Z.; Sun, Y.; Xu, Z.; Han, J.; Song, B.; Song, W.; Qin, C.; Yin, L. Relationship between High-Mobility Group Box I Overexpression in Ovarian Cancer Tissue and Serum: A Meta-Analysis. *Onco. Targets. Ther.* **2015**, 8, 3523–3531. <https://doi.org/10.2147/OTT.S93357>.
- (23) Paek, J.; Lee, M.; Nam, E. J.; Kim, S. W.; Kim, Y. T. Clinical Impact of High Mobility Group Box 1 Protein in Epithelial Ovarian Cancer. *Arch. Gynecol. Obstet.* **2016**, 293 (3), 645–650. <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3864-1>.
- (24) Machado, L. R.; Moseley, P. M.; Moss, R.; Deen, S.; Nolan, C.; Spendlove, I.; Ramage, J. M.; Chan, S. Y. T.; Durrant, L. G. High Mobility Group Protein B1 Is a Predictor of Poor Survival in Ovarian Cancer. *Oncotarget* **2017**, 8 (60), 101215–101223. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20538>.
- (25) Corrales; Fernando; Calvete, J. J. *Manual de Proteómica*; Sociedad Española de Proteómica: Navarra, 2014.
- (26) Aebersold, R.; Mann, M. Mass Spectrometry-Based Proteomics: Abstract: Nature. *Nature* **2003**, 422 (6928), 198–207.
- (27) Nahnsen, S.; Bielow, C.; Reinert, K.; Kohlbacher, O. Tools for Label-Free Peptide Quantification. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, 12 (3), 549–556. <https://doi.org/10.1074/mcp.R112.025163>.
- (28) Deng, F.; Miller, J. A Review on Protein Markers of Exosome from Different Bio-Resources and the Antibodies Used for Characterization. *J. Histotechnol.* **2019**, 42 (4), 226–239. <https://doi.org/10.1080/01478885.2019.1646984>.
- (29) Carnielli, C. M.; Winck, F. V.; Paes Leme, A. F. Functional Annotation and Biological Interpretation of Proteomics Data. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, 1854 (1), 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.10.019>.
- (30) Nakamura, K.; Sawada, K.; Kinose, Y.; Yoshimura, A.; Toda, A.; Nakatsuka, E.;

- Hashimoto, K.; Mabuchi, S.; Morishige, K. I.; Kurachi, H.; Lengyel, E.; Kimura, T. Exosomes Promote Ovarian Cancer Cell Invasion through Transfer of CD44 to Peritoneal Mesothelial Cells. *Mol. Cancer Res.* **2017**, *15* (1), 78–92. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0191>.
- (31) Runz, S.; Keller, S.; Rupp, C.; Stoeck, A.; Issa, Y.; Koensgen, D.; Mustea, A.; Sehouli, J.; Kristiansen, G.; Altevogt, P. Malignant Ascites-Derived Exosomes of Ovarian Carcinoma Patients Contain CD24 and EpCAM. *Gynecol. Oncol.* **2007**, *107* (3), 563–571. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.08.064>.
- (32) Zhang, P.; Zhou, X.; Zeng, Y. Multiplexed Immunophenotyping of Circulating Exosomes on Nano-Engineered ExoProfile Chip towards Early Diagnosis of Cancer. *Chem. Sci.* **2019**, 5495–5504. <https://doi.org/10.1039/c9sc00961b>.
- (33) Li, W.; Zhang, X.; Wang, J.; Li, M.; Cao, C.; Tan, J.; Ma, D.; Gao, Q. TGFβ1 in Fibroblasts-Derived Exosomes Promotes Epithelialmesenchymal Transition of Ovarian Cancer Cells. *Oncotarget* **2017**, *8* (56), 96035–96047. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21635>.
- (34) Hoter, A.; Naim, H. Y. Heat Shock Proteins and Ovarian Cancer : Important Roles and Therapeutic Opportunities. *Cancers (Basel)*. **2019**, 1–29.
- (35) Cui, X.; Li, L.; Yan, G.; Meng, K.; Lin, Z.; Nan, Y.; Jin, G.; Li, C. High Expression of NQO1 Is Associated with Poor Prognosis in Serous Ovarian Carcinoma. **2015**, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1271-4>.
- (36) Karakashev, S.; Zhang, R. Targeting CARM1 in Ovarian Cancer with EZH2 and PARP Inhibitors. *Mol. Cell. Oncol.* **2020**, *7* (4), 7–9. <https://doi.org/10.1080/23723556.2020.1760675>.
- (37) Czystowska-Kuzmich, M.; Sosnowska, A.; Nowis, D.; Ramji, K.; Szajnik, M.; Chlebowska-Tuz, J.; Wolinska, E.; Gaj, P.; Grazul, M.; Pilch, Z.; Zerrouqi, A.; Graczyk-Jarzynka, A.; Soroczynska, K.; Cierniak, S.; Koktysz, R.; Elishaev, E.; Gruca, S.; Stefanowicz, A.; Blaszczyk, R.; Borek, B.; Gzik, A.; Whiteside, T.; Golab, J. Small Extracellular Vesicles Containing Arginase-1 Suppress T-Cell Responses and Promote Tumor Growth in Ovarian Carcinoma. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10979-3>.

