



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grado en Bioloxía

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Construción de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* para análisis de Doble Híbrido

Construcción dunha cepa de *Saccharomyces cerevisiae* para análises de Dobre Híbrido

Construction of a *Saccharomyces cerevisiae* strain for Double Hybrid analysis

Nerea Veira Varela

Curso: 2019 - 2020.

Convocatoria: Julio

Directores: Mónica Lamas Maceiras

María Esperanza Cerdán Villanueva

Índice

Resumen/Resumo/Abstract	
Introducción.....	5
HMGB1.....	5
NOP53.....	6
Relación entre HMGB1 y NOP53.....	7
Doble Híbrido.....	7
Material y métodos.....	9
Cepas.....	9
Vectores.....	9
Medios de cultivo.....	10
Técnicas.....	11
Resultados y discusión.....	14
Clonación de NOP53M en el plásmido pGBD-C2.....	14
Transformación de levaduras.....	21
Conclusiones/Conclusiones/Conclusions.....	22
Bibliografía.....	23
Anexo.....	26

Resumen

HMGB1 es una proteína humana, localizada en numerosos compartimentos celulares, así como en el espacio extracelular, relacionada con muchas enfermedades asociadas a procesos inflamatorios como la aterosclerosis, la artritis o el cáncer. En este último caso se encuentra involucrada prácticamente en todos los procesos esenciales que conducen a la formación y progresión de un tumor. Por su parte NOP53 (proteína relacionada con la formación de ribosomas) también está involucrada en el cáncer, pero en su caso su papel fundamental es como supresora de tumores, asociada a procesos de apoptosis y autofagia. Por ello sería interesante determinar si ambas proteínas interactúan físicamente. Para analizar esta posibilidad se puede utilizar la técnica del Doble Híbrido en levaduras. En este trabajo se ha construido una cepa de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* que expresa en una misma célula estas dos proteínas que se podrá utilizar en experimentos futuros de Doble Híbrido para determinar si ambas proteínas interactúan.

Palabras clave: NOP53, HMGB1, *Saccharomyces cerevisiae*, Doble Híbrido.

Resumo

HMGB1 é unha proteína humana, situada en numerosos compartimentos celulares, así como no espazo extracelular, relacionada con moitas enfermidades asociadas a procesos inflamatorios como aterosclerose, artrite ou cancro. Neste último caso, está implicado en practicamente todos os procesos esenciais que levan á formación e progresión dun tumor. Pola súa banda, NOP53 (proteína relacionada coa formación de ribosomas) tamén está implicada no cancro, pero no seu caso o seu papel fundamental é como un supresor do tumor, asociado a procesos de apoptose e autofagia. Polo tanto, sería interesante determinar se ambas proteínas interactúan físicamente. Para analizar esta posibilidade, pódese empregar a técnica Double Hybrid en levadura. Neste traballo, construíuse unha cepa de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* que expresa estas dúas proteínas na mesma célula que podense usar nos futuros experimentos de Dobre Híbrido para determinar se ambas proteínas interactúan.

Palabras clave: NOP53, HMGB1, *Saccharomyces cerevisiae*, Dobre Híbrido.

Abstract

HMGB1 is a human protein, located in numerous cellular compartments, as well as in the extracellular space, related to many diseases associated with inflammatory processes such as atherosclerosis, arthritis or cancer. In the latter case, it is involved in practically all the essential processes that lead to the formation and progression of a tumor. NOP53 (protein related to ribosome formation) is also involved in cancer, but in its case its fundamental role is as a tumor suppressor, associated with apoptosis and autophagy. Therefore, it would be interesting to determine if both proteins interact physically. To analyze this possibility, the technique of the Double Hybrid in yeast can be used. In this work, a *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain has been constructed when these two proteins are expressed in the same cell. In future this strain can be used to determine if these proteins interact by Double Hybrid experiments.

Keywords: NOP53, HMGB1, *Saccharomyces cerevisiae*, Double Hybrid

Introducción

HMGB1

La proteína HMGB1 pertenece a la familia de las HMGB, que se denominan como *High Mobility Group* y están formadas por uno o más dominios HMG-BOX. El dominio HMG-BOX (65-85 aminoácidos) contiene 3 hélices alfa plegadas en forma de L (Vizoso et al., 2017). Centrándonos en HMGB1 podemos decir que es una proteína compuesta por 215 aminoácidos, con dos dominios HMG-B: la caja A y la caja B (relacionadas con la interacción con el DNA y proteínas) (Yang et al., 2010) y un dominio carboxilo-terminal ácido, de estructura flexible que interacciona con las cajas HMG de manera reversible (Rowell et al., 2012). Esta proteína se encuentra presente en numerosos compartimentos celulares como es el endosoma, el núcleo, el citoplasma, la membrana plasmática o la región extracelular y la localización influye en la función.

En el núcleo esta relacionada con el DNA, interviene en la replicación y reparación del DNA, funciona como un factor transcripcional y esta relacionada con la estructura de la cromatina y el control epigenético.

En el citoplasma está relacionada fundamentalmente con la autofagia, la mitofagia y la apoptosis. También interacciona con TLR9, una proteína transmembrana, en respuesta al daño, como lesiones en los tejidos, o condiciones de estrés lo que provoca la activación de la respuesta inmune (Avgousti et al., 2016).

Extracelularmente actúa como una citoquina proinflamatoria. HMGB1 interacciona con dos receptores extracelulares que son TLR4 y RAGE. RAGE se localiza en diferentes tipos de células como es en monocitos, macrófagos, neuronas, células endoteliales y muchas células tumorales (Ellerman et al., 2007) y su interacción con HMGB1 esta relacionada con el cáncer y otras enfermedades (Sims et al., 2010). TLR4, pertenece a la familia de los receptores TLR los cuales funcionan como transductores en la señalización proinflamatoria, al unirse a los ligandos extracelulares (Wang et al., 2016).

HMGB1 puede sufrir diversas modificaciones postraduccionales que influyen en sus funciones. Para que esta proteína, fundamentalmente nuclear, pase al citoplasma se producen fosforilaciones de sus residuos de serina o acetilaciones en las lisinas de las NLS (*Nuclear Localization Sequence*) (Young et al., 2006). Otras modificaciones son la reducción/oxidación de residuos de cisteína Cys-23,

Cys-45 y Cys-106 y la formación de un enlace de disulfuro que involucra a Cys-23 y Cys-45, que generan diferentes formas redox de la proteína las cuales tienen diferentes funciones según el compartimento celular en el que se encuentre (Antoine et al., 2014) (FIGURA 1).

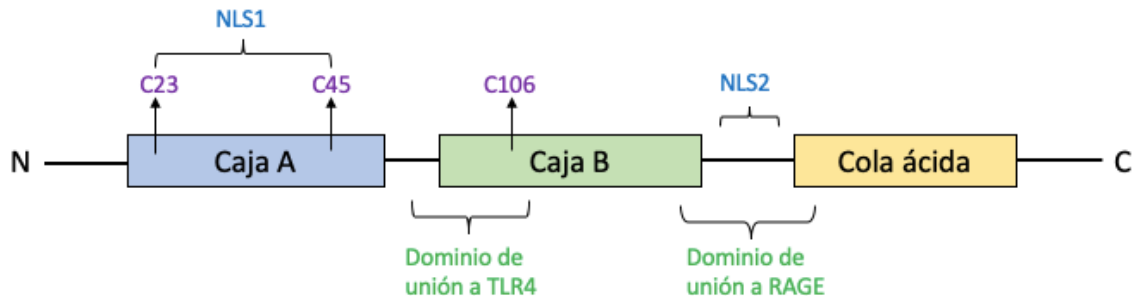


Figura 1: Estructura de HMGB1, en el que están representadas las dos cajas HMG, la caja A (posición 7 a 79), la B (89 a 162) y la cola ácida (186 a 215). En la figura se marcan los C23,45 y 106 son los residuos de cisteína, también se muestran tanto los dominios de unión tanto de TLR4 y RAGE como las señales de localización nuclear (NLS 1 y 2) (Aragón et al., 2019).

HMGB1 está relacionada con diversas enfermedades como la aterosclerosis, la artritis, la sepsis y el cáncer, todas ellas asociadas en mayor o menor medida a procesos inflamatorios. La asociación de HMGB1 con distintos tipos de cáncer es clara ya que en muchos (próstata, colón, ovario, mama...) se ha constatado su sobreexpresión en células cancerígenas comparándola con células sanas. Estudiando los procesos esenciales que conducen a la formación y progresión de un tumor, HMGB1 está relacionada con casi todos ellos: la proliferación celular, angiogénesis, evasión apoptótica o la inestabilidad genómica (Gnanasekar et al., 2013).

NOP53

Nop53, *Ribosome Biogenesis Factor* (también designada PICT-1/GLTSCR2) esta relacionada con la formación de ribosomas. Es una proteína nuclear de 60 kDa y esta formada por 478 aminoácidos. Se ha observado que porta al menos dos secuencias de localización nuclear funcional (NLS), las cuales se encuentran presentes en sus extremos amino y carboxilo (Kalt et al., 2012). En un momento de estrés ribosomal puede ser transportada al citoplasma o de este de nuevo al núcleo (Lee et al., 2018).

Entre las modificaciones postraduccionales que pueden regular los niveles de NOP53 está la fosforilación mediada por la actividad de la kinasa (JNK) que

provoca que se produzca un transporte de NOP53 del nucléolo al nucleoplasma y un incremento en su degradación mediante la vía de poliubiquitinación del proteasoma (Lee et al., 2016). Entre sus funciones principales se encuentra su papel en el proceso de biogénesis ribosomal favoreciendo la formación de la partícula ribosomal 5S RNP (Sloan et al., 2013). Dentro del proceso de biogénesis ribosomal NOP53 también participa en la transcripción del ARNr, el bloqueo de la transcripción y la pérdida de actividad de la vía AKT/mTOR/p70S6K. Además, en condiciones de estrés ribosómico NOP53 está relacionada con la estabilización de p53 (Lee et al., 2012). El papel de NOP53 en el cáncer es fundamentalmente la de un supresor de tumores muy relacionada con la autofagia y la apoptosis celular. Se ha observado que su sobreexpresión conduce a la apoptosis celular y reduce la proliferación celular (Lee et al., 2018). Así cuando se produce un daño en el ADN se observa una disminución de la proteína NOP53 ya que esta se degrada por ubiquitinación, lo que provoca la acumulación de p53 y favorece la apoptosis (Chen et al., 2016).

Relación entre HMGB1 y NOP53

HMGB1 y NOP53 están ambos relacionados con el supresor de tumores p53 y con los procesos cancerígenos. El complejo formado por HMGB1/p53 regula la autofagia y la apoptosis, decidiendo entre supervivencia o muerte celular. Así, la delección de p53 incrementa los niveles de HMGB1 citosólicos e induce la autofagia, mientras que la delección de HMGB1 incrementa los niveles de p53 citosólicos que reduce la autofagia (Livesey et al., 2012). Se ha demostrado que ambas proteínas interaccionan físicamente a través del dominio TTD de p53 y los residuos N63-144 y C347-437 de NOP53 y que esta interacción estabiliza p53 inhibiendo su degradación por ubiquitinación y reduciendo diversos procesos asociados con el cáncer como la proliferación celular (Lee et al., 2012). Por último, en estudios de proteómica se ha detectado una posible interacción directa o indirecta entre NOP53 y HMGB1 (Barreiro-Alonso, 2018).

Doble híbrido

El método de doble híbrido es una técnica utilizada en genética molecular la cual sirve para detectar la interacción física proteína-proteína de cualquier origen (animal, planta, levadura...), mediante la utilización de una levadura, como célula huésped. Es un método que, aunque posee limitaciones, actualmente se

caracteriza por su sencillez y sensibilidad.

A la hora de realizar la técnica del doble híbrido una de las proteínas de interés se une al dominio de unión de DNA del factor transcripcional de levaduras Gal4 y es la que se conoce como cebo. La otra proteína se une a un dominio de activación del mismo factor transcripcional de Gal4 y se la conoce como presa. Ambas proteínas recombinantes se expresan en la misma célula huésped de levadura y si ambas interaccionan físicamente, Gal4 se reconstituye y activa la transcripción de los genes reporteros, esta activación es visible con una señal fenotípica (FIGURA 2).

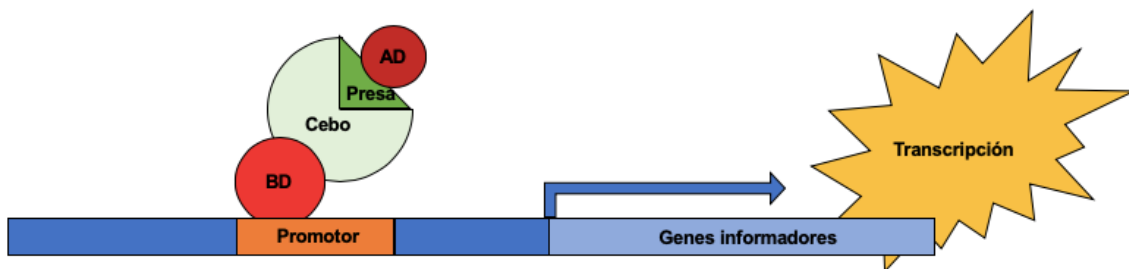


Figura 2: Interacción proteína-proteína y posterior transcripción con observación fenotípica. (Doble híbrido).

A pesar de las ventajas de este método, posee problemas ya que sólo detecta interacciones dentro del núcleo. Es más difícil detectar interacciones débiles o transitorias y es frecuente la aparición de falsos positivos. Por este motivo para solventar este último punto lo que se hizo fue emplear tres genes informadores (*HIS3*, *ADE2* y *lacZ*), cada uno fusionado a un promotor inducible por Gal4 (*GAL1*, *GAL2* y *GAL7*). Estos promotores tienen en común una pequeña secuencia de unión y responden al mismo inductor transcripcional: Gal4. Esta variante fue desarrollada por Philip James y colaboradores (1996).

Material y métodos

Cepas

Cepas bacterianas

Tabla 1: Línea bacteriana.

Línea	Genotipo	Fuente
XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI q Z Δ M15 Tn 10</i> (Tet r)].	Stratagene®

Cepas de levadura

Tabla 2: Líneas de levadura.

Línea	Genotipo	Fuente
pJ69-4a	<i>Mat trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	James et al., 1996
pJ69-4a+ pGAD-HMGB1	pJ69-4 ^a transformada con el plásmido pGAD-HMGB1	Barreiro-Alonso et al., 2018

Vectores

Tabla 3: Vectores utilizados en este trabajo.

Vector	Aplicación	Origen
pGAD-C2	Vector de fusión de HMGB1 al dominio de activación de GAL4	James et al., 1996
pGBD-C2	Vector de fusión de NOP53 al dominio de unión de GAL4	James et al., 1996
Nop53M	Gen NOP53 clonado en el vector pMax	Cedido por Manuel Fuentes

Medios de cultivo

LB (medio Luria-Bertani), es un medio general para bacterias:

Tabla 4: Composición LB.

	Cantidad (%)
Bacto-triptona	1%
Bacto-yeast-Extract	0,5%
NaCl	0,5%
Glucosa	0,1%

LBA es un medio específico: LB+ ampicilina a concentración final de 70 µg/ml (A partir de una solución patrón de 40mg/ml en H₂O estéril).

YPD, es un medio rico para levaduras:

Tabla 5: Composición YPD.

	Cantidad (%)
Bacto peptona	2%
Extracto de levadura	1%
Glucosa	2%

CM medio completo para levaduras:

Se define por ser un medio sintético, su composición en aminoácidos se puede variar según la selección que se quiera realizar.

Tabla 6: Composición CM.

	Cantidad
Mezcla de aminoácidos a 200x	0,5 %
His, Leu, Ura, Ade y Tyr	40 mg/ml
Trp	30 mg/ml
Glucosa	2%

De forma independiente se esteriliza el YNB que se añade a una concentración final de 0,67%.

Mezcla de aminoácidos:

Tabla 7: Mezcla de aminoácidos para el CM.

	Cantidad
Isoleucina y fenil-alanina	60 mg/l
Histidina, leucina, uracilo, adenina, lisina y tirosina	40 mg/l
Triptófano	30 mg/l
Arginina, metionina, treonina y lisina	10 mg/l

YNB:

Tabla 8: Composición YNB.

	Cantidad
Mezcla de vitaminas	50 ml/l
Sales traza	100 ml/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	75 g/l
KH ₂ PO ₄	15 g/l
MgSO ₄	7,5 g/l
NaCl	1,5 g/l
CaCl ₂	1,5 g/l

Si el medio es CM-Leu se elimina la leucina, si es CM-Trp el triptófano y así, sucesivamente.

Nota: para medios en placas a los medios se le añade agar al 1,5%

Todos los medios se esterilizan a 120°C durante 20 min y una atmosfera de presión en el autoclave.

Técnicas

Transformación de bacterias

Para introducir dentro de las células los vectores de interés se descongelan lentamente 100 µl de células bacterianas competentes XL1-blue (Ecos) en hielo.

A estas células se le añade 3 μ l del DNA recombinante que interesa y se incuba 20 min. Se realiza un choque térmico a 42°C, 1 min. Después se introducen en hielo durante 2 min y al terminar el tiempo se le añade 1 ml de LB y las bacterias crecen a 37°C durante 45 min en agitación. A continuación, se siembra en placas selectivas, como los vectores poseen el gen de resistencia a la ampicilina se siembran en placas de LBA y se incuba a 37°C 24 h.

Minipreparaciones del DNA

Esta técnica se utiliza para la obtención de DNA plasmídico de células bacterianas, suficiente para los experimentos posteriores.

Para este proceso utilizamos el kit de *Thermo Scientific*, "GeneJET Plasmid Miniprep Kit" que se caracteriza por utilizar una membrana basada en sílice introducida en una columna. La purificación tiene una tasa de recuperación del 95% en el rango de tamaño de fragmentos de 100 pb a 10 kb.

En un tubo con 250 μ l en solución de resuspensión se introduce las células bacterianas de un $\frac{1}{4}$ o $\frac{1}{6}$ de placa y se resuspenden utilizando el vortex. Se le añade 250 μ l de la solución lisis y se invierte el tubo 4-6 veces (este paso se realiza para romper las células). Luego se añade 350 μ l de la solución de neutralización, se mezcla 4-6 veces y se centrifuga 5 min. El sobrenadante se transfiere a una columna de GeneJET. Esta columna se centrifuga 1 min y se descarta el fluido. Se añade 500 μ l de solución de lavado, se centrifuga 30-60 s y se descarta el fluido. Se repite el último paso. Luego centrifugamos otra vez mas durante un minuto en seco para eliminar completamente la solución de lavado. Por ultimo, se le añade a la columna 50 μ l de H₂O, se espera 2 min y se centrifuga 2 min. En el eluido se encuentra el DNA y se congela a -20°C para su conservación.

Nota: Todas las centrifugaciones de las minipreparaciones se realizan a 13000 rpm.

Gel de agarosa para electroforesis

Los geles de agarosa se realizan para para la visualización del DNA y así comprobar su calidad y cantidad. Se pueden preparar diferentes tipos de geles variando la cantidad de agarosa según al porcentaje al que queramos el gel. El porcentaje variara según el tamaño de la muestra de DNA. El gel se compone de agarosa y TAE. Una vez mezclados, se funde en el microondas hasta que se

disuelva totalmente, luego se vierte en el molde con el peine y se dejan solidificar.

Preparación muestras

A la muestra de DNA se le añade *SYBR Green*, un quelante que se une al DNA y que en contacto con la luz UV emite luz verde permitiendo visualizar el DNA.

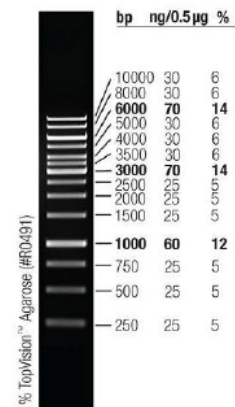


Figura 3: El marcador de pesos moleculares Gene ruler 1kb (*Thermo Scientific*).

Medida de la concentración de las muestras de DNA

La medida de la concentración del DNA plasmídico se hace mediante un espectrofotómetro (spectronic), Se utilizan 2 µl de DNA en una cubeta de cuarzo. Se utiliza el agua como blanco.

Para medir la concentración de DNA se utilizan dos parámetros de absorbancia:

- A 260: indica la concentración total de ácidos nucleicos
- A 260/280: indica la pureza de la muestra, ya que compara la absorbancia de los ácidos nucleicos con respecto a la de las proteínas.

PCR

En este trabajo se utilizaron dos enzimas diferentes para las amplificaciones por PCR; el *IVA cloning* que utiliza la polimerasa de alta fidelidad Phusion (*Thermo Scientific*) para la clonación del gen NOP53 en el plásmido pGBD-C2 y una amplificación de rutina usando la NZYTaQ II 2x Green Máster Mix™ (*Nzytech*) para la comprobación de la clonación. En ambos casos se necesitan los moldes que queremos amplificar (DNA), los dNTPs, los cebadores correspondientes para cada molde la DNA polimerasa y el tampón correspondiente (los detalles de la PCR se muestran en los resultados).

Transformación de levaduras

El protocolo inicial de la transformación de levaduras es el siguiente.

Se cultiva una colonia aislada de la levadura en 10-15 ml del medio adecuado a

30°C con agitación hasta que se obtenga una absorbancia a 600 nm de 0,6 en el cultivo. Para precipitar las células se centrifuga el cultivo a 3000 rpm durante 1 min y se elimina del sobrenadante. Se resuspende el precipitado en 1 ml de tampón LiAc-1XTE y luego se centrifuga a 13000 rpm durante un par de segundos. Se vuelven a resuspender las células en un volumen adecuado de tampón LiAc-1XTE (según la cantidad de células que se tenga) (500 µl- 1 ml). Por cada transformación se realizan dos mezclas y las cantidades están reflejadas en la tabla 9.

Tabla 9: Mezclas para la transformación de levaduras.

Transformación con DNA	Blanco
100 µl de las células resuspendidas	100 µl de las células resuspendidas
50 µg del DNA	-
5 µl de salmón sonicado	5 µl de salmón sonicado

Las mezclas se homogenizan bien con agitación, se les añade 600 µl de PEG al 50 % y se incuban durante 30 min a 30°C con agitación y se deja otros 15 min a 42°C sin agitación. Se centrifugan para que las células precipiten se elimina el sobrenadante y se resuspenden en 1 ml de YPD. Se incuban las células durante 30-40 min a 30°C para favorecer la recuperación de las células. Al pasar los 40 min se centrifuga a 800 x g 1 min y se elimina el medio. Para acabar, las células se resuspenden en 100 µl de medio YPD y se siembran en placas selectivas. Finalmente, las placas se incuban a 30°C durante 2-3 días.

Todo el procedimiento se realiza en condiciones de esterilidad para evitar contaminaciones.

Nota: El LiAc-1XTE se prepara a partir de 100 µl de solución de stock de 10xTE y 900 µl de 1M LiAc pH 7,5, cuyo pH se ha ajustado con ácido acético diluido.

Resultados y discusión

Clonación de NOP53M en el plásmido pGBD-C2

El trabajo se comenzó con una transformación bacteriana con el plásmido pGBD-C2 y otra con el plásmido Nop53M para obtener suficiente DNA para los experimentos posteriores. Se añadieron 3 μ l de muestra de DNA a 100 μ l de células bacterianas descongeladas. Siguiendo el protocolo finalmente las transformaciones de pGBD-c2 y NOP53M se sembraron en placas de LBA y se incubaron a 37°C durante 24h. Para las transformaciones se realizó un blanco, una transformación sin DNA para asegurarse la ausencia de contaminación. El resultado se muestra en las FIGURAS 4 y 5. En la figura 4 se observa ausencia de colonias ya que es el blanco y eso nos indica que no hubo contaminación durante la transformación. En la figura 5 se observa crecimiento de colonias tanto en la placa con el plásmido NOP53M (izquierda) como con el pGBD-C2 (derecha), esto nos indicaría que el ADN entro dentro en las células.

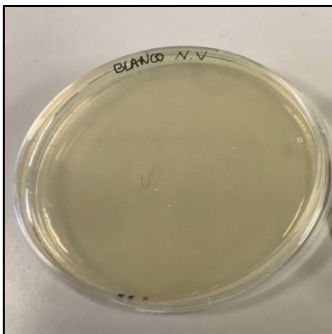


Figura 4: Placa correspondiente al blanco, sin DNA. contaminación.

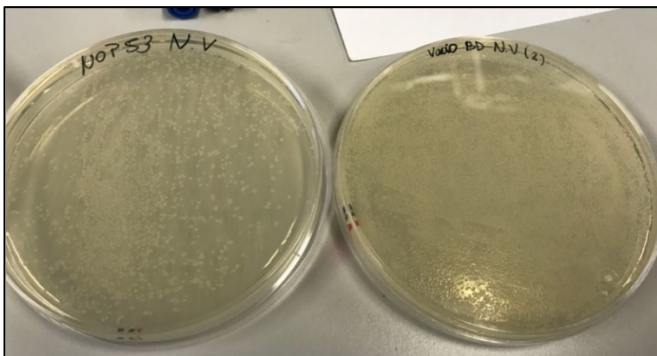


Figura 5: Placas correspondientes a la transformación de bacterias con el plásmido NOP53M (izquierda) y pGBD-C2 (derecha).

Después de las 24h se resembraron dos colonias aisladas de cada transformación en el mismo tipo de placas, de nuevo en placas de LBA, para

obtener masa celular suficiente y se incubaron a 37°C durante 24h.

Con la masa celular se realizaron dos minipreparaciones, extracciones de DNA, de cada tipo de plásmido siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos y la concentración de DNA obtenido se midió en un espectrofotómetro. En la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos. La calidad de las cuatro muestras era adecuada ya que la relación 260/280 estaba próxima a 1.8.

Tabla.10: Cuantificación de las muestras con el espectrofotómetro.

Muestra	Concentración	Ratio Abs260/280
1A Nop53M	106,4 µg/ml	1,88
1B Nop53M	396,8 µg/ml	1,88
2A pGBD-C2	407,5 µg/ml	1,86
2B pGBD-C2	418,1 µg/ml	1,85

Además, para la visualización del ADN se realizó un gel de agarosa al 0,7%. Se utilizaron 2 µl de cada muestra, 2 µl *Gel Green* (X5) y 6 µl de H₂O para un volumen final de 10 µl. De marcador de pesos moleculares se utilizaron 5 µl. Se realizó una electroforesis de 1h a 65V. El resultado se muestra en la FIGURA 6. En esta figura se observa claramente la forma superenrollada del ADN de las cuatro muestras y no se ve degradación de las mismas lo que nos indica que son de buena calidad.

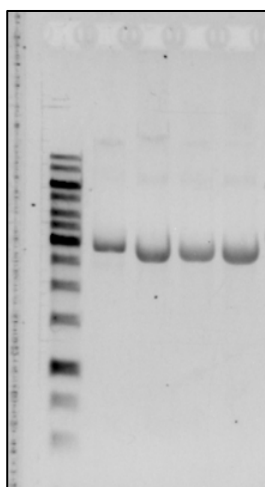


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa con el marcador de pesos moleculares (carril 1) y las muestras Nop53 (1 A y B, carriles 2 y 3) y pGBD-C2 (2 A y B, carriles 4 y 5).

Al observarse que las muestras son de buena calidad, se juntaron las replicas y se midieron las concentraciones de nuevo en el espectrofotómetro:

Tabla 11: Cuantificación de las muestras en el espectrofotómetro.

Muestra	Abs260
Nop53M	251,6 µg/ml
pGBD-C2	412,8 µg/ml

El siguiente paso fue realizar un *IVA cloning* para la clonación de NOP53 en pGBD-C2.

Esta técnica consiste en clonar fragmentos de DNA por recombinación homóloga en bacterias. Para ello es necesario amplificar el fragmento que se quiere clonar, en nuestro caso el gen NOP53 y el vector, pGBD-C2, en una única reacción de PCR. Los cebadores que amplifican el fragmento poseen colas homólogas a la región del vector donde se quiere clonar (zona de recombinación) y que son complementarios a los cebadores para amplificar el vector (García-Nafría et al., 2016). La polimerasa utilizada fue la Phusion una enzima de alta fidelidad de copia que no introduce mutaciones.

Tabla 12: Mezcla de la reacción de PCR.

	Cantidad
Molde pGBD-C2 (1 ng)	1 µl
Molde NOP53M (1 ng)	1 µl
dNTPs (10nM)	5 µl
Tampón (5X)	5 µl
Phusion	1 µl
pGA/B (5 microM)	1 µl
pGBDR (5 microM)	1 µl
NOP53pGBDF (5microM)	1 µl
NOP53pGBDR (5microM)	1 µl
H ₂ O	8 µl
Volumen final	25 µl

Tabla 13: Programa utilizado en la PCR.

		T ^a	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial		95°C	1 min	1
	Desnaturalización	95°C	30 s	
Amplificación	Hibridación	55°C	10 s	25
	Elongación	72°C	12 min	
Extensión final		72°C	10 min	1

Tabla14: Secuencia de los cebadores utilizados.

Cebador	Secuencia	Tamaño
NOP53p GBDF	CCGGAATTCCCGGGGATGGCGGCAGGAGGCAG	Tm 75.8
NOP53p GBDR	CTCTGCAGGTCGACATCGCTCAACTGGATCTCAC GGAACG	Tm 78.2
pGA/B	CGATGTGCGACCTGCAGAGATCTATGAATC	Tm 59.8
pGBDR	GATCCCCGGGAATTCCGGC	Tm 61.0

Nota: la secuencia que se encuentra de color rojo es homóloga a la secuencia del vector.

Una vez terminada la PCR se comprobó con un gel de agarosa al 0.7%, en el que la muestra se forma por 5 µl de PCR, 2 µl de *Gel Green* y 3 µl de H₂O para un volumen final de 10 µl. De marcador se utilizaron 5 µl.

El gel se muestra en la FIGURA 7. Se observan dos bandas una mas intensa que corresponde al fragmento (1400 pb aprox.) y una más tenue que es el vector (5895 pb). Esto nos indica que ambos fragmentos han sido amplificados correctamente y la cantidad aproximada de cada uno. Debe tenerse en cuenta que para que el ligamiento posterior se realice de modo adecuado es necesario que la cantidad de fragmento sea aproximadamente tres veces mayor que la de vector.

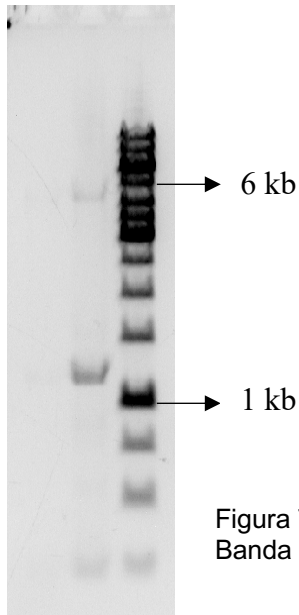


Figura 7: Comprobación de la PCR mediante gel de agarosa. Banda intensa es el fragmento, banda tenue es el vector.

A la PCR restante, 20 μ l se le añadieron 2 μ l de DpnI y se incubó a 37°C durante 30 minutos para eliminar el DNA molde (NOP53M y pGBD-C2).

Como el ligamiento se produce por recombinación homologa dentro de la bacteria, se hizo directamente una transformación bacteriana (siguiendo el protocolo mostrado en materiales y métodos) con 5 μ l de la PCR tratada con DpnI y se sembró en una placa de LBA. La elección de este medio se debe a que al recombinar se genera una molécula de DNA circular con resistencia a la ampicilina (ya que el vector pGBD-C2 posee este gen de resistencia) por eso solo van a crecer las bacterias que lo contengan. En paralelo se realizó una transformación de control sin DNA para comprobar la ausencia de contaminación. De las colonias obtenidas en la transformación se seleccionaron 6 y se realizó una resiembra en dos placas LBA.

Después se hicieron las 6 minipreparaciones siguiendo el protocolo explicado en el apartado de materiales y métodos.

Para comprobar que la calidad del DNA era el correcto se realizó un gel al 0,7% en el que se cargaron las muestras formadas por: 3 μ l de muestra de minipreparación, 1 μ l de H₂O y 1 μ l de *Gel Green* para tener un volumen final de 5 μ l. De marcador de pesos moleculares se cargaron 4 μ l. En la figura 8 se muestra el gel. Como se puede ver hay distintos tamaños de DNA, teniendo en cuenta el tamaño del vector pGBD-C2 y el fragmento NOP53 se seleccionaron las muestras con el mayor tamaño (carriles 2, 4, 5 y 6). Es probable que las muestras de los carriles 3 y 6 correspondan al vector pGBD-C2 vacío.

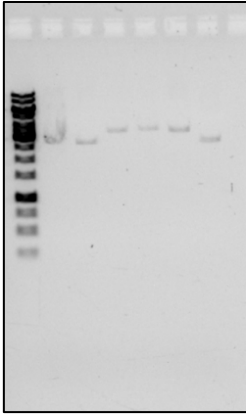


Figura 8: Comprobación mediante gel de agarosa de las 6 muestras.

Para comprobar que el gen NOP53 estaba clonado en el vector se realizó una PCR utilizando la NZYtaq II 2x Green Máster Mix™ (Nzytech®), siguiendo las cantidades de la tabla 15 y el programa descrito en la tabla 16

Tabla 15: Mezcla de reacción PCR.

Componente reacción	Volumen
DNA molde	0,5 µl
NOP53F	1 µl
NOP53R	1 µl
Polimerasa NZYtaqII TM 2x Green Master Mix	12,5 µl
H ₂ O	10 µl
Total	25 µl

Tabla 16: Etapas de la PCR.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización	98°C	1 min	1 ciclo
Amplificación	95°C	30 seg	25 ciclos
Amplificación	52°C	10 seg	25 ciclos
Amplificación	72°C	7 min	25 ciclos
Extensión	72°C	10 min	1 ciclo

Tabla 17: Secuencia de los cebadores utilizados.

Cebador	Secuencia	Tamaño
NOP53F	5'ATGGCGGCAGGAGGCAG3'	Tm 60 C
NOP53R	5'CAACTGGATCTCACGGAACG3'	Tm 58.5 C

Para visualizar la PCR se hizo un gel de agarosa al 0,7 %. De cada PCR se realizó una mezcla con 12 µl de muestra y 3 µl de Gel Green para un volumen final de 15 µl. De marcador de pesos moleculares se cargaron 5 µl. En el gel de la figura 9 se puede observar que solo la primera muestra posee el gen NOP53 ya que es la única en la que se ve una banda de amplificación del tamaño del gen (1.4 kb).

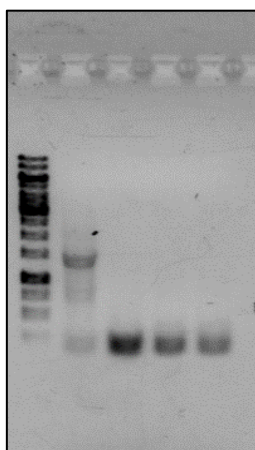


Figura 9: Visualización de las PCR mediante gel de agarosa.

Esta muestra que denominamos pGBDNOP53 se envió a secuenciar al a los Servicios de Apoyo a la Investigación de la UDC (SAI) para su secuenciación utilizando los oligos pGBD-C2 sec 5`CAGATAGATTGGCTTCAGTGGAG3` y NOP53secinter 5`GGAGCAGGCCGCCACC3`. Tras realizar un *Blast* a las secuencias obtenidas se pueden confirmar que NOP53 se encuentra clonado sin presentar ningún error (Anexo).

Transformación de levadura.

Por último, se hizo una transformación de levadura con pGBDNOP53.

Para la transformación se siguió el protocolo explicado en el apartado de material y métodos. Para hacer la transformación se necesitaron 100 µl de células pJ69-4^a + pGAD-HMGB1, 5 µl de pGBDNOP53 (2 µg aprox.) y 5 µl de DNA de salmón sonificado. Para el blanco se realizó la misma mezcla, pero sin pGBDNOP53. Las transformaciones se sembraron en placas selectivas CM-Leu-Trp y se incubaron

2-3 días a 30°C. El resultado se muestra en la FIGURA 10. Las colonias que se observan poseen dos plásmidos, el pGAD-HMGB1, cuyo gen marcador es *LEU2* y el pGBDNOP53 cuyo gen marcador es *TRP1*.

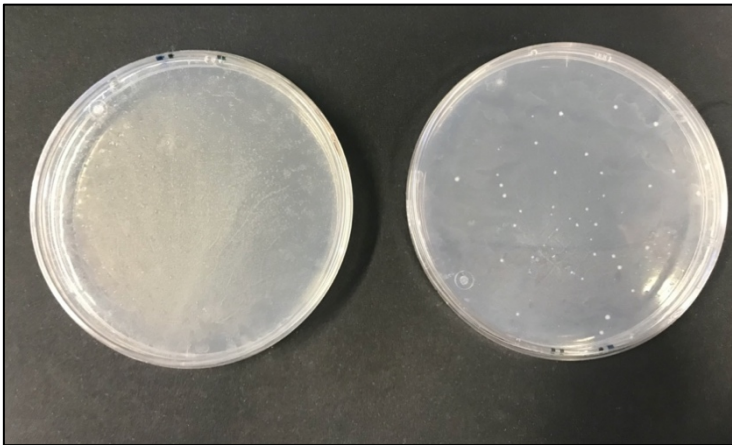


Figura 10: Placas de CM-Leu-Trp con la transformación de levadura. La placa de la izquierda es el blanco y la de la derecha corresponde a la transformación con DNA.

Conclusiones

Se ha construido una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que contiene dos plásmidos capaces de expresar las proteínas humanas NOP53 y HMGB1. Esta cepa podrá ser utilizada en un futuro para el análisis de la interacción física entre dichas proteínas a través del sistema de Doble Híbrido.

Conclusión

Construíuse unha cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que contén dous plásmidos capaces de expresar as proteínas humanas NOP53 e HMGB1. Esta cepa pode usarse no futuro para a análise da interacción física entre estas proteínas a través do sistema Dobre Híbrido.

Conclusions

A strain of *Saccharomyces cerevisiae* has been constructed that contain two plasmids capable of expressing the human proteins NOP53 and HMGB1. This strain could be used in the future for the analysis of the physical interaction between these proteins through the Double Hybrid system.

Bibliografía

Antoine, D. J., Harris, H. E., Andersson, U., Tracey, K. J. y Bianchi, M. E. (2014). A systematic nomenclature for the redox states of high mobility group box (HMGB) proteins. *Molecular Medicine*, 20:135-137.

Aragón, C. C., Llanosa, J. A., Posso-Osorio, I., Nieto-Aristizábal, I., Perea-Cardona, N., Ortiz, A. F. y Tobón, G. J. (2019). Papel de las proteínas de alta movilidad (HMGB1) en el lupus eritematoso sistémico. *Revista Colombiana de Reumatología*, 27(1):37-45

Avgousti, D. C., Herrmann, C., Kulej, K., Pancholi, N. J., Sekulic, N., Petrescu, J., Molden, R. C., Blumenthal, D., Paris, A. J., Reyes, E. D., Ostapchuk, P., Hearing, P., Seeholzer, S. H., Worthen, G. S., Black, B. E., Garcia, B. A. y Weitzman, M. D. (2016). A core viral protein binds host nucleosomes to sequester immune danger signals. *Nature*, 535:173-177

Barreiro-Alonso, A., Lamas-Maceiras, M., Cerdán, E. M., y Vizoso-Vázquez, A. (2018). The HMGB protein Ixr1 interacts with Ssn8 and Tdh3 involved in transcriptional regulation. *FEMS Yeast Research*, 18(2):19050-19064

Chen, H., Han, L., Tsai, H., Wang, Z., Wu, Y., Duo, Y., Cao, W., Chen, L., Tan, Z., Xu, N., Huang, X., Zhuang, J. y Huang, L. (2016). PICT-1 is a key nucleolar sensor in DNA damage response signaling that regulates apoptosis through the RPL11-MDM2-p53 pathway. *Oncotarget*, 7:83241-83257.

Ellerman, J. E., Brown, C. K., de Vera, M., Zeh, H. J., Billiar, T., Anna Rubartelli A. y Lotze, M. T. (2007). Masquerader: HighMobility Group Box-1and Cancer. *Clinical Cancer Research*, 13(10): 2836-2848

García-Nafría, J., Watson, J. F. & Greger, I. H. (2016). IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. *Scientific Reports*, 6:27459-27470.

Gnanasekar, M., Kalyanasundaram, R., Zheng, G., Chen, A., Bosland, M. C. y Kajdacsy-Balla, A. (2013). HMGB1: A Promising Therapeutic Target for Prostate Cancer. *Prostate Cancer*, 2013:157103-157111

James, P., Halladay, J., y Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144:425-1436.

Kalt, I., Levy, A., Borodianskiy-Shteinberg, T. y Sarid, R. (2012) Nucleolar Localization of GLTSCR2/PICT-1 Is Mediated by Multiple Unique Nucleolar Localization. *PLoS ONE*, 7(1):e30825

Lee, S., Ahn Y. M., Kim J. Y., Cho, Y. E. y Park, J. H. (2018). Downregulation of NOP53 Ribosome Biogenesis Factor Leads to Abnormal Nuclear Division and Chromosomal Instability in Human Cervical Cancer Cells. *Pathology & Oncology Research*, 26:453–459.

Lee, S., Cho, Y. E., Kim, Y. J. y Park, J. H. (2016). c-Jun N-terminal kinase regulates the nucleoplasmic translocation and stability of nucleolar GLTSCR2 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 472(1):95-100.

Lee, S., Kim, J. Y., Kim, Y. J., Seok, K. O., Kim, J. H., Chang, Y. J., Kang, H. Y. y Park J. H. (2012). Nucleolar protein GLTSCR2 stabilizes p53 in response to ribosomal stresses. *Cell Death & Differentiation*, 19:1613-1622.

Livesey, K. M., Kang, R., Vernon, P., Buchser, W., Loughran, P., Watkins, S. C., Zhang, L., Manfredi, J. J., Zeh 3rd, H. J., Li, L., Lotze, M. T. y Tang, D. (2012). p53/HMGB1 Complexes Regulate Autophagy and Apoptosis. *Cancer Research*, 72(8):1996-2005.

Rowell, J. P., Simpson, K. L., Stott, K., Watson, M. y Thomas J. O. (2012). HMGB1-facilitated p53 DNA binding occurs via HMG-Box/p53 transactivation domain interaction, regulated by the acidic tail. *Structure*, 20:2014-2024.

Sims, G. P., Rowe, D. R., Rietdijk, S. T., Herbst, R. y Coyle, A. J. (2010). HMGB1 and RAGE in Inflammation and Cancer. *Annual Reviews of Immunology*, 28:367-388

Sloan, K. E., Bohnsack, M. T. y Watkins, N.J. (2013). The 5S RNP couples p53 homeostasis to ribosome biogenesis and nucleolar stress. *Cell Reports*, 5:237-247.

Vizoso-Vázquez, A., Barreiro-Alonso, A., Rico-Díaz, A., Lamas-Maceiras, M., Rodríguez-Belmonte, E., Becerra, M., González-Siso, M. I. y Cerdán, M. E. (2017). HMGB Proteins from Yeast to Human. *Gene Regulation, DNA Repair and Beyond. Old Yeast-New Questions*, Ed. InTECH ISBN 978-953-51-3677-4.

Wang, Y., Zhong, J., Zhang, X., Liu, Z., Yang, Y., Gong, Q., y Ren, B. (2016). The Role of HMGB1 in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Journal of Diabetes Research*, 2016:2543268

Yang, H., Hreggvidsdottir, H. S., Palmblad, K., Wang, H., Ochani, M., Li, J., Lu, B., Chavan, S., Rosas-Ballina, M., Al-Abed, Y., Akira, S., Bierhaus, A., Erlandsson-Harris, H., Andersson, U. y Tracey K.J. (2010). A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26):11942-11947

Youn, J. H. y Shin, J. S. (2006). Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *The Journal of Immunology*, 177:7889-7897.

Anexo

Blast de la secuencia obtenida del clon pGBDNOP53 tras secuenciarlo

Homo sapiens NOP53 ribosome biogenesis factor (NOP53), mRNA
Sequence ID: [NM_015710.5](#) Length: 1504 Number of Matches: 1

Range 1: 14 to 1451 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2656 bits(1438)	0.0	1438/1438(100%)	0/1438(0%)	Plus/Plus
Query 8	GATGGCGGCAGGAGGCAGTGGCGTTGGTGGGAAGCGCAGCTCGAAAAGCGATGCCGATTC	67		
Sbjct 14	GATGGCGGCAGGAGGCAGTGGCGTTGGTGGGAAGCGCAGCTCGAAAAGCGATGCCGATTC	73		
Query 68	TGGTTTCTGGGGCTGCGGCCACTTCGGTGGACCCAGCGCTGAGGCGGCGGCGGCGAGG	127		
Sbjct 74	TGGTTTCTGGGGCTGCGGCCACTTCGGTGGACCCAGCGCTGAGGCGGCGGCGGCGAGG	133		
Query 128	CCCAAGAAATAAGAAGCGGGGCTGGCGGCGGCTTGCTCAGGAGCCGCTGGGGCTGGAGGT	187		
Sbjct 134	CCCAAGAAATAAGAAGCGGGGCTGGCGGCGGCTTGCTCAGGAGCCGCTGGGGCTGGAGGT	193		
Query 188	TGACCAGTTCCTGGAAGACGTGCGGCTACAGGAGCGCACGAGCGGTGGCTTGTGTGTCAGA	247		
Sbjct 194	TGACCAGTTCCTGGAAGACGTGCGGCTACAGGAGCGCACGAGCGGTGGCTTGTGTGTCAGA	253		
Query 248	GGCCCCAAATGAAAACTCTTCTTCGTGGACACTGGCTCCAAGGAAAAAGGGCTGACAAA	307		
Sbjct 254	GGCCCCAAATGAAAACTCTTCTTCGTGGACACTGGCTCCAAGGAAAAAGGGCTGACAAA	313		
Query 308	GAAGAGAACCAAAGTCCAGAAGAAGTCACTGCTTCTCAAGAAACCCCTTCGGGTTGACCT	367		
Sbjct 314	GAAGAGAACCAAAGTCCAGAAGAAGTCACTGCTTCTCAAGAAACCCCTTCGGGTTGACCT	373		
Query 368	CATCCTCGAGAACACATCCAAAGTCCCTGCCCCAAAGACGTCTCGCCCACCAGGTCCC	427		
Sbjct 374	CATCCTCGAGAACACATCCAAAGTCCCTGCCCCAAAGACGTCTCGCCCACCAGGTCCC	433		
Query 428	CAACGCCAAGAAGCTCAGGCGGAAGGAGCAGCTATGGGAGAAGCTGGCCAAGCAGGGCGA	487		
Sbjct 434	CAACGCCAAGAAGCTCAGGCGGAAGGAGCAGCTATGGGAGAAGCTGGCCAAGCAGGGCGA	493		
Query 488	GCTGCCCGGGAGGTGCGCAGGGCCAGGCCCGGCTCCTCAACCCCTTCTGCAACAAGGGC	547		

Sbjct	494	GCTGCCCGGGAGGTGCGCAGGGCCCAGGCCCGCTCCTCAACCTTCTGCAACAAGGGC	553	
Query	548	CAAGCCCGGGCCCCAGGACACCGTAGAGCGGCCCTTCTACGACCTCTGGGCCTCAGACAA	607	
Sbjct	554	CAAGCCCGGGCCCCAGGACACCGTAGAGCGGCCCTTCTACGACCTCTGGGCCTCAGACAA	613	
Query	608	CCCCCTGGACAGGCCGTTGGTTGGCCAGGATGAGTTTTTCTGGAGCAGACCAAGAAGAA	667	
Sbjct	614	CCCCCTGGACAGGCCGTTGGTTGGCCAGGATGAGTTTTTCTGGAGCAGACCAAGAAGAA	673	
Query	668	AGGAGTGAAGCGGCCAGCACGCCTGCACACCAAGCCGTCCCAGGCACCCGCCGTGGAGGT	727	
Sbjct	674	AGGAGTGAAGCGGCCAGCACGCCTGCACACCAAGCCGTCCCAGGCACCCGCCGTGGAGGT	733	
Query	728	GGCGCCTGCCGAGCTTCCTACAATCCATCCTTTGAAGACCACCAGACCCTGCTCTCAGC	787	
Sbjct	734	GGCGCCTGCCGAGCTTCCTACAATCCATCCTTTGAAGACCACCAGACCCTGCTCTCAGC	793	
Query	788	GGCCACGAGGTGGAGTTGCAGCGGCAGAAGGAGGGGAGAAGCTGGAGCGGCAGCTGGC	847	
Sbjct	794	GGCCACGAGGTGGAGTTGCAGCGGCAGAAGGAGGGGAGAAGCTGGAGCGGCAGCTGGC	853	
Query	848	CCTGCCCGCCACGGAGCAGGCCGCCACCCAGGAGTCCACATTCAGGAGCTGTGCGAGGG	907	
Sbjct	854	CCTGCCCGCCACGGAGCAGGCCGCCACCCAGGAGTCCACATTCAGGAGCTGTGCGAGGG	913	
Query	908	GCTGCTGGAGGAGTCGGATGGTGAGGGGGAGCCAGGCCAGGGCGAGGGGCCGGAGGCTGG	967	
Sbjct	914	GCTGCTGGAGGAGTCGGATGGTGAGGGGGAGCCAGGCCAGGGCGAGGGGCCGGAGGCTGG	973	
Query	968	GGATGCCGAGGTCTGTCCCACGCCCGCCGCCTGGCCACCACAGAGAAGAAGACGGAGCA	1027	
Sbjct	974	GGATGCCGAGGTCTGTCCCACGCCCGCCGCCTGGCCACCACAGAGAAGAAGACGGAGCA	1033	
Query	1028	GCAGCGGCGGGGAGAAGGCTGTGCACAGGCTGCGGGTACAGCAGGCCCGGTTGCGGGC	1087	
Sbjct	1034	GCAGCGGCGGGGAGAAGGCTGTGCACAGGCTGCGGGTACAGCAGGCCCGGTTGCGGGC	1093	
Query	1088	CGCCCGGCTCCGGCACCAGGAGCTGTTCGGCTGCGCGGGATCAaggcccaggtggccct	1147	
Sbjct	1094	CGCCCGGCTCCGGCACCAGGAGCTGTTCGGCTGCGCGGGATCAAGGCCAGGTGGCCCT	1153	
Query	1148	gaggctggcggagctggcgcgccggcagagggcgccggcagggcgccgggaggtgaggc	1207	
Sbjct	1154	GAGGCTGGCGGAGCTGGCGCGCGGCAGAGGGCGCGCAGGCGCGGGAGGCTGAGGC	1213	

```

Query 1208  tgACAAGCCCCGAAGGCTGGGGCGGCTCAAGTACCAGGCACCTGACATCGACGTGCAGCT 1267
          |||
Sbjct 1214  TGACAAGCCCCGAAGGCTGGGGCGGCTCAAGTACCAGGCACCTGACATCGACGTGCAGCT 1273

Query 1268  GAGCTCGGAGCTGACAGACTCGCTCAGGACCCTGAAGCCCGAGGGCAACATCCTTCGAGA 1327
          |||
Sbjct 1274  GAGCTCGGAGCTGACAGACTCGCTCAGGACCCTGAAGCCCGAGGGCAACATCCTTCGAGA 1333

Query 1328  CCGGTTCAAGAGCTTCCAGAGGAGGAATATGATCGAGCCTCGAGAGAGAGCCAAGTTCAA 1387
          |||
Sbjct 1334  CCGGTTCAAGAGCTTCCAGAGGAGGAATATGATCGAGCCTCGAGAGAGAGCCAAGTTCAA 1393

Query 1388  ACGCAAGTACAAGGTGAAGCTGGTGGAGAAGCGGGCGTTCCGTGAGATCCAGTTGTAG 1445
          |||
Sbjct 1394  ACGCAAGTACAAGGTGAAGCTGGTGGAGAAGCGGGCGTTCCGTGAGATCCAGTTGTAG 1451

```