



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE
LAS ISOFORMAS MAD2 α y MAD2 γ EN
RESPUESTA A TRATAMIENTO CON
CISPLATINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
BÁSICA

P R E S E N T A :

ANGELA DOWNIE RUIZ VELASCO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA GENÓMICA Y
TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

UNIDAD PERIFÉRICA DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA EN CÁNCER, INCAN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Facultad de Medicina





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Antecedentes: La proteína MAD2, es un componente clave del punto de monitoreo del huso mitótico (SAC). Además de su función en el SAC se ha reportado un posible papel de MAD2 en la respuesta a daño al DNA. La expresión aberrante de MAD2 se asocia a varios parámetros clínicos importantes, entre ellos se encuentra la resistencia a cisplatino, agente quimioterapéutico causante de daño al DNA. En el laboratorio se ha descrito una nueva isoforma de MAD2 generada por empalme alternativo de exones, la cual ha sido denominada MAD2 γ . Esta isoforma se expresa de manera diferencial en distintas líneas celulares de cáncer. Se ha visto anteriormente que la expresión de esta isoforma se eleva en respuesta a dosis crecientes de cisplatino y su expresión en muestras de pacientes se asocia a resistencia a tratamiento con cisplatino. Adicionalmente estudios preliminares sugieren que esta isoforma podría tener un efecto sobre la localización de la isoforma tipo, MAD2 α . **Pregunta de Investigación:** ¿Cuál es la localización intracelular de las isoformas MAD2 α y MAD2 γ en la línea celular HCT116 y como esta se ve alterada en respuesta al tratamiento con cisplatino? **Objetivo:** Determinar la localización intracelular de las isoformas MAD2 α y MAD2 γ en la línea celular HCT116, así como el efecto que el cisplatino pudiera tener en ésta. **Resultados:** Se determinó que la localización de la isoforma MAD2 γ es principalmente nuclear, con presencia variable en el citoplasma, en general el patrón de localización de esta isoforma fue heterogéneo. La isoforma MAD2 α se encontró tanto en núcleo como en citoplasma con una mayor concentración en el núcleo. La sobre-expresión de MAD2 γ de manera estable generó un ligero incremento en la localización nuclear de MAD2 α . Ambas isoformas presentaron una relocalización hacia el núcleo después de tratamiento con cisplatino tanto a las 24 como a las 48 horas con respecto a las células sin tratar; sin embargo, únicamente la isoforma MAD2 α mostró cambios en su localización entre los dos tiempos. En las células con sobre-expresión de MAD2 γ , se mostró un incremento en la concentración nuclear de MAD2 α únicamente a las 48 horas de tratamiento. Adicionalmente, sólo en este tiempo se observó una ligera asociación entre la localización nuclear de ambas isoformas. **Conclusión:** Ambas isoformas presentan una localización mayoritariamente nuclear, con presencia variable en el citoplasma. El tratamiento con cisplatino ocasiona la relocalización de ambas isoformas hacia el núcleo. La sobre-expresión de MAD2 γ genera un ligero incremento en la concentración nuclear de MAD2 α , fenómeno particularmente evidente a las 48 horas de tratamiento. Esto da pie a pensar en un posible papel de MAD2 en la respuesta al cisplatino, en donde es relevante la expresión de ambas isoformas.

Contenido

Introducción	1
Ciclo Celular	1
Mitosis	2
Regulación del ciclo celular	2
Punto de control del huso mitótico	3
Errores en el punto de control del huso mitótico	5
Estructura de MAD2	6
Expresión aberrante de MAD2	8
Localización intracelular de MAD2	8
Otras interacciones de MAD2	10
MAD2 y respuesta al daño a DNA	10
Isoformas de MAD2	11
MAD2 β	11
MAD2 γ	12
Cisplatino	17
Planteamiento del problema	19
Pregunta de Investigación	20
Hipótesis	20
Objetivo General	20
Objetivos Particulares	20
Materiales y Métodos	21
Resultados	25
1. Expresión de MAD2 γ en células transfectadas	25
2. Localización intracelular de MAD2 γ	25
3. Localización intracelular de MAD2 α en líneas celulares estables	27
4. Re-localización al núcleo de MAD2 α en respuesta a cisplatino	32
5. Re-localización al núcleo de MAD2 γ en respuesta a cisplatino	37
6. Localización de MAD2 α en células que sobre-expresan MAD2 γ	40
Discusión	42
Conclusiones	47
APÉNDICE A- Construcción del vector MAD2 γ -FLAG	I
APÉNDICE B: Transfección y sobre-expresión de MAD2 γ -FLAG	VI

APÉNDICE C- Inmunofluorescencias IX

Introducción

Ciclo Celular

Una nueva célula se forma a partir de la división de una célula ya existente¹. Para lograr esto, la célula necesita llevar a cabo tres procesos esenciales; la duplicación fiel de su material genético, la segregación equitativa de sus cromosomas y la correcta división en dos células hijas². La secuencia de pasos que sigue la célula para dividirse se conoce como el ciclo celular. En eucariontes, el ciclo celular se divide en cuatro fases (Figura 1), en donde las dos más distintivas son la fase de síntesis (S) en donde se lleva a cabo la duplicación del material genético y la mitosis (M) que se ocupa de la segregación cromosómica y la división celular (citocinesis).

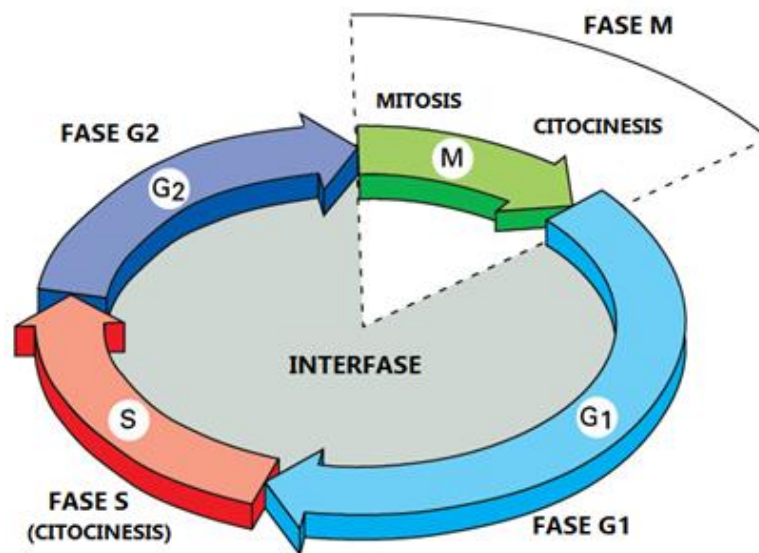


Figura 1. Fases del ciclo celular eucarionte. Tomada de *Molecular Biology of the Cell 4th edition* Alberts et al.

En conjunto, la fase S, junto con dos intervalos que la separan de la mitosis, G1 y G2, se conocen como interfase, y representa el tiempo entre una división celular y otra. Durante el primero de estos intervalos (G1) la célula prepara la síntesis del DNA mientras que en el segundo (G2) la célula prepara la mitosis³. A lo largo de ambos intervalos, la célula duplica su tamaño y su contenido de proteínas y RNA. Si las condiciones externas no son favorables durante la fase G1, una célula puede

pausar indefinidamente su progresión en el ciclo celular entrando a un estado quiescente conocido como la etapa G0¹.

Mitosis

La mitosis a su vez está subdividida en cinco etapas, profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. La primera de estas etapas es la profase, en la cual se da la condensación de los cromosomas. A continuación comienza la prometafase con el rompimiento de la envoltura nuclear permitiendo el anclaje de los cromosomas a los microtúbulos. Durante la metafase estos cromosomas anclados van a alinearse en el ecuador de la célula. Una vez que todos los cromosomas se encuentran anclados correctamente y alineados en el ecuador, cada cromátida hermana comienza a moverse hacia polos opuestos durante la anafase para llegar a la última etapa de la mitosis, la telofase, en donde la envoltura nuclear vuelve a formarse alrededor del DNA, y genera de esta forma dos núcleos completos¹.

Durante la mitosis también se lleva a cabo la citocinesis, proceso por el cual se divide físicamente el citoplasma en dos, por medio de un anillo contráctil de actina y miosina.⁴

Regulación del ciclo celular

La progresión del ciclo celular requiere de dos grupos fundamentales de proteínas cinasas; las cinasas dependientes de ciclinas (Cdk) y las ciclinas^{2,3,5}. Las Cdk se asocian con las ciclinas en complejos específicos según la fase del ciclo celular y tienen entre sus funciones la fosforilación de proteínas etapa-específicas, la degradación de ciclinas de fases anteriores y la activación de los complejos que promueven la progresión a la siguiente fase del ciclo celular⁵. A lo largo del ciclo celular los niveles de las proteínas Cdk permanecen constantes, mientras que los niveles de las ciclinas varían⁶, por lo que el control de los niveles de las ciclinas representa un mecanismo regulatorio en la progresión del ciclo celular. Este control se lleva a cabo tanto por una regulación a nivel transcripcional de las ciclinas como su degradación por complejos ubiquitina-ligasa como lo son el SCF (Skip, Cullin, F-box)⁷ y el complejo promotor de la anafase (APC)⁸. Adicionalmente existen otros mecanismos que regulan la actividad de los complejos ciclina-Cdk incluyendo

fosforilaciones activadoras, como la activación mediada por la ciclina activadora de cinasas (CAK)¹ fosforilaciones inhibitorias, por ejemplo la fosforilación mediada por WEE1 y CDC25⁹, y asociación con inhibidores como p16 o p27¹⁰. Estos mecanismos en conjunto generan fases estables dentro del ciclo celular, las células cuentan con puntos de control estrictos que regulan el paso entre estas fases lo que impide la progresión a través del ciclo celular hasta que las condiciones sean las adecuadas para iniciar la siguiente etapa.¹¹

Existen tres puntos de control en la célula eucarionte; el primero tiene lugar a finales de la fase G1 e impide la progresión a la fase S si las condiciones externas no son favorables para la célula o si ésta presenta daño al DNA¹². El punto de control G2/M evita el paso a mitosis si una célula tiene daño en el DNA, este punto de control está mediado por la acumulación del complejo CDK1/ciclina B y la fosforilación inhibitoria por medio de la cinasa WEE1^{12,13}. El tercer punto de control con el que cuenta la célula es el punto de control del huso mitótico (SAC por sus siglas en inglés) el cual regula la transición metafase-anafase durante la mitosis.

Punto de control del huso mitótico

El SAC se identificó por primera vez en estudios realizados con mutantes de levadura sensibles a benomyl¹⁴, el cual estabiliza los microtubulos y genera errores impidiendo así la formación correcta del huso mitótico. En células normales, estos errores retrasan la salida de mitosis hasta ser corregidos, sin embargo en las mutantes MAD (mitotic arrest deficient) las células continúan a través del ciclo celular y llevan a cabo divisiones anormales que generan aneuploidías severas, tornándolas letales. De un primer ensayo con benomyl se identificaron las proteínas MAD1, MAD2 y MAD3¹⁴, mientras que en un estudio paralelo se identificaron las proteínas BUB1, BUB2 y BUB3. El SAC impide la transición de metafase a anafase cuando no todos los cromosomas se encuentran anclados de manera bipolar a los microtubulos del huso mitótico y alineados en la placa metafásica, esto es esencial para garantizar una división equitativa en donde cada célula hija recibe una copia completa del material genético¹⁵. Esto se logra al inhibir la función del APC el cual degrada a la securina y a la ciclina B⁸. La degradación de la securina, activa a la

separasa que a su vez corta la subunidad SCC1 de la cohesina¹⁶. Este rompimiento de la cohesina, permite la separación de las cromátidas hermanas durante la anafase¹⁷. La degradación de la ciclina B impide la función de la cinasa Cdk1, evento que promueve la salida de mitosis. La inhibición del APC se da al impedir su unión con cdc20 el cual es requerido como un co-activador^{18,19}, en conjunto con BUB3 y BUBR1, MAD2 forma un complejo capaz de interactuar con la proteína cdc20^{20,21} la cual impide así su asociación con el APC. Para poder llevar a cabo esta interacción MAD2 debe llevar a cabo un cambio conformacional, de su forma abierta (O-MAD2) a su forma cerrada (C-MAD2)²². Este cambio conformacional se da por la unión de O-MAD2 al complejo C-MAD2-MAD1²³ localizado en los cinetocoros sin anclar; esta localización es dependiente de MAD1²⁴.

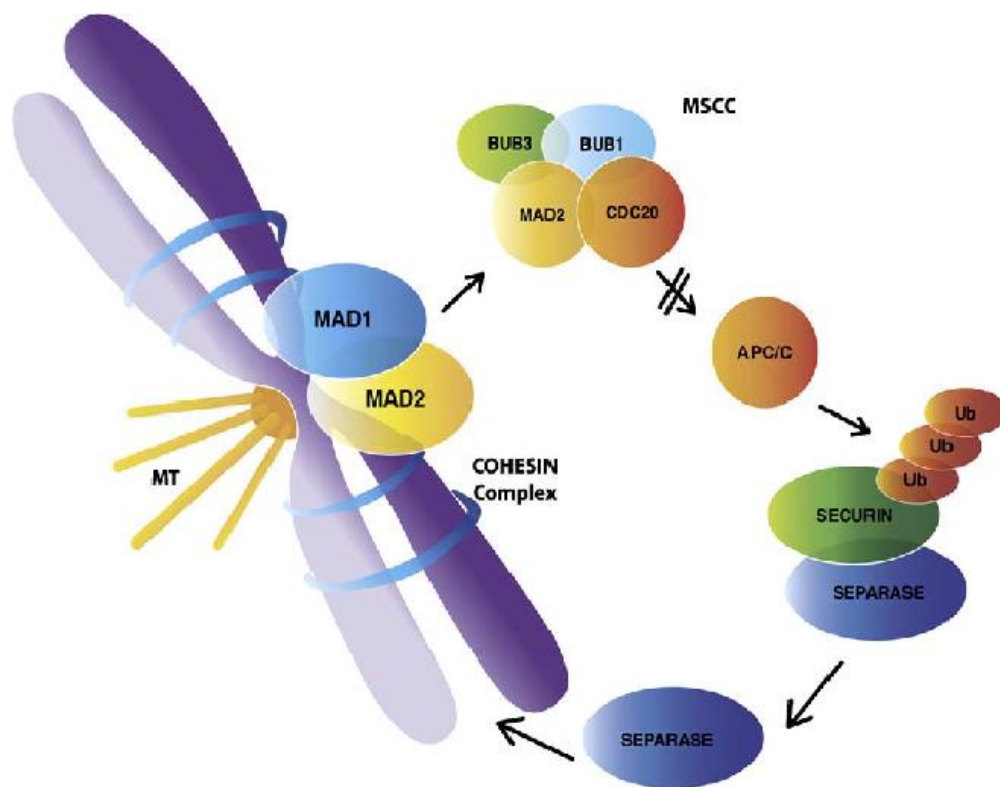


Figura 2. MAD2 en el punto de control del huso mitótico (SAC). Tomado de López-Saavedra y Herrera (2010). MAD2 se encuentra en los cinetocoros sin anclar formando un complejo con MAD1, el cual permite su activación. Tras su activación, MAD2 junto con BUB1 y BUB3 forman un complejo con CDC20. CDC20 es un cofactor necesario del APC el cual tiene entre sus funciones la ubiquitinación de la securina. Al degradarse la securina la separasa es capaz de cortar una subunidad de la cohesina, permitiendo la separación de las cromátidas hermanas.

De esta forma MAD2 tiene un papel de señal difusible dentro del SAC²⁵, al convertir la señal de un cinetocoro sin anclar en la inhibición del APC mediante su unión con MAD1, subsecuente cambio conformacional y formación de un complejo inhibitorio con BUB3 y BUBR1.

Errores en el punto de control del huso mitótico

Defectos en el SAC conllevan a errores en la segregación, asociados con la generación de alteraciones cromosómicas como lo son aberraciones cromosómicas, deleciones, translocaciones y aneuploidías^{26,27}, de este modo contribuyen a la progresión tumoral²⁸. Además, errores en la segregación cromosómica ocasionados por fallas en el SAC promueven la inestabilidad cromosómica²⁹, término que se refiere a una tasa persistentemente elevada de pérdida y ganancia cromosómica³⁰. La inestabilidad cromosómica incrementa la diversidad genética y permite la adaptación celular lo que genera fenómenos como la resistencia a fármacos^{27,30}. La mayoría de los tumores sólidos presentan aneuploidías, y varios también sufren de inestabilidad cromosómica^{31,32} por lo que se esperaría que de igual forma fueran comunes los defectos en componentes del SAC.

A pesar de que se han encontrado mutaciones en genes del SAC³¹, éstas son poco frecuentes³²⁻³⁵. De manera contraria, defectos en el SAC se han logrado asociar a cambios en los niveles de expresión de genes que codifican para componentes del SAC³⁴⁻³⁷. De esta manera, se ha observado que la haploinsuficiencia de varios de estos genes incluyendo *MAD1*³⁸, *MAD2*³⁹, *BUBR1*⁴⁰ y *BUB3*⁴¹ resultan en un SAC comprometido y se observa una disminución en el porcentaje de células arrestadas en mitosis en cultivos tratados con fármacos que afectan la dinámica de microtubulos. Además, se observa un aumento en errores en la segregación, número de aneuploidías, pérdida de cromosomas y generación de micronúcleos así como un incremento en la generación de tumores. Por otra parte la pérdida completa de componentes del SAC durante el desarrollo es letal^{42,43} mientras que el abatir completamente MAD2 o BUBR1 en células somáticas producen altos niveles de muerte celular⁴², estas proteínas son fundamentales en el correcto funcionamiento

del SAC. Varios genes del SAC se encuentran expresados de manera aberrante en distintos tipos de cáncer^{34–38,44,45}.

Estructura de MAD2

Uno de los genes del SAC que más se ha estudiado es *MAD2L1*. El gen de *MAD2L1* se encuentra codificado en el cromosoma 4q27 y cuenta con 5 exones⁴⁶. MAD2 es una proteína pequeña de 25 kDa. Cuenta con un solo dominio globular con dimensiones de 45. X 35Å X 25Å y un extremo C-terminal flexible, el cual es necesario, tanto para su dimerización como para su unión a *cdc20*⁴⁷. Su dominio globular se conoce como HORMA, por las siglas de las primeras proteínas en las que se describió (*Hop1p*, *Rev7p* y *MAD2*)⁴⁸, este dominio se encuentra conservado evolutivamente en proteínas con capacidad de asociación a cromatina⁴⁹. El dominio HORMA de MAD2 se compone de tres alfa hélices que se encuentran entre una lámina beta de seis cadenas y una pequeña horquilla beta, y generan dos cavidades hidrofóbicas entre las hélices alfa y las estructuras beta (Figura 3)^{22,47}.

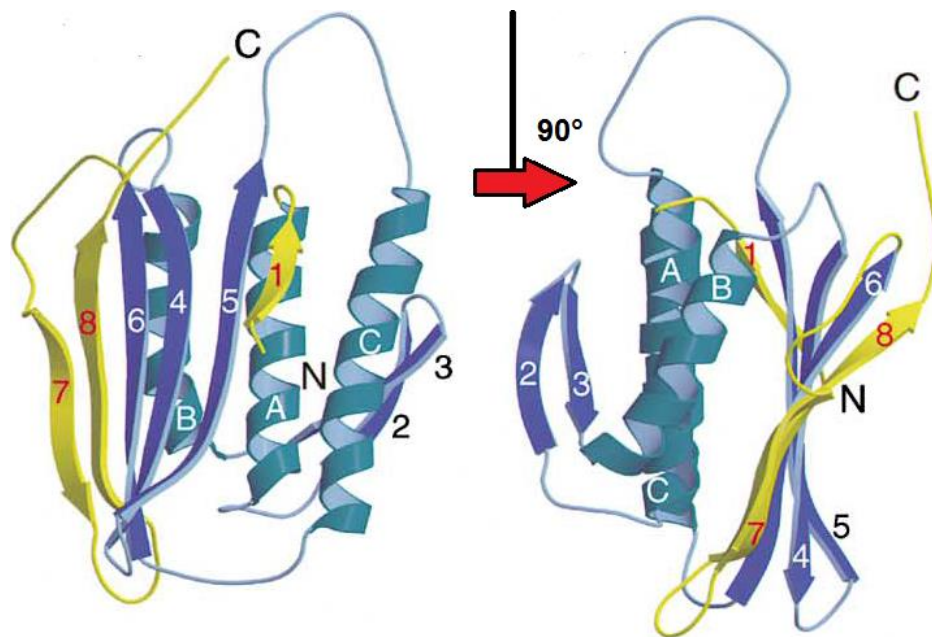


Figura 3. Estructura tridimensional de MAD2 Luo et al (2002). La proteína MAD2 se conforma por un dominio HORMA. Este está formado por una capa de alfa hélices que se encuentra entre una hoja beta de seis cadenas y una horquilla beta. Los espacios entre las tres capas forman dos cavidades hidrofóbicas importantes para la capacidad de interacción de MAD2

Al unirse MAD1 o CDC20, la estructura de MAD2 sufre un importante cambio conformacional²² (Figura 4). La última cadena en la lámina beta así como el extremo C-terminal se desplazan al lado contrario de la proteína, y de esta forma desplaza también a la cadena N-terminal de la lámina beta, la cual al ser desplazada extiende la longitud de una de las alfa hélices además de formar una pequeña hélice adicional. El desplazamiento de las cadenas beta de un lado de la proteína a otro además, genera un “cinturón de seguridad” de un extremo de la lámina beta a otro, importante en la interacción con MAD1 y cdc20, esta conformación de MAD2 es conocida como C-MAD2 mientras que la conformación que presenta en su estado libre se conoce como O-MAD2. La unión de MAD1 y cdc20 ocupa el mismo sitio en MAD2 por lo que éstas son mutuamente excluyentes; sin embargo, C-MAD2 en un complejo MAD1-MAD2 es capaz de unir a O-MAD2 y generar un cambio conformacional que permanece después de su disociación y permite su unión a cdc20⁵⁰. Se ha observado que el dímero MAD1-MAD2, es estable durante el SAC,

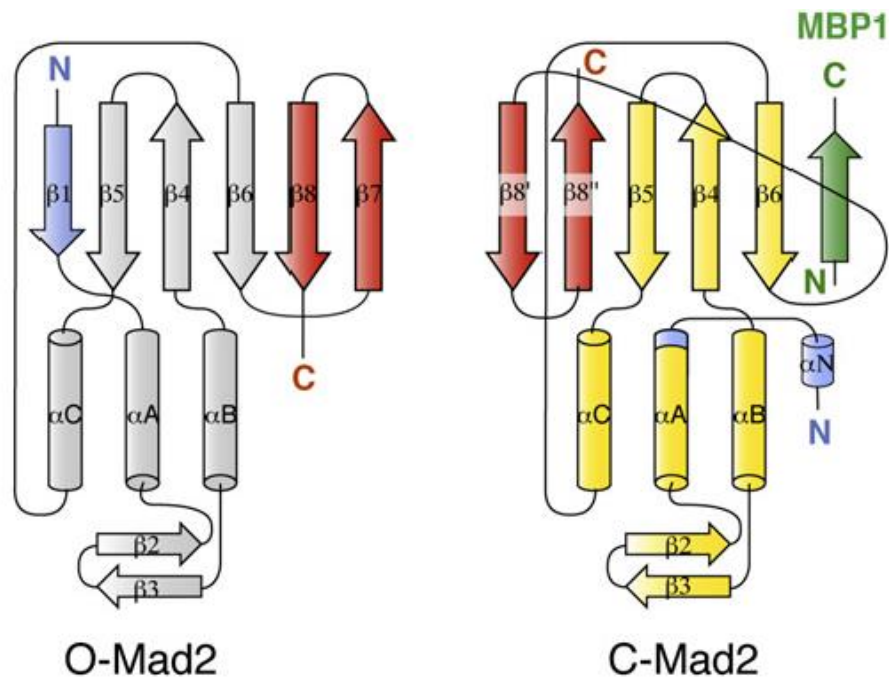


Figura 4. Cambio conformacional de O-MAD2 a C-MAD2. Mapelli et al (2007) Tras la unión de MAD1 o cdc20 se induce un cambio conformacional radical en MAD2. El péptido desplaza a la cadena beta C-terminal al lado opuesto de la proteína creando un *cinturón de seguridad*. A su vez la cadena beta N-terminal es desplazada generando una nueva hélice y aumentando el tamaño de la primera. El color rojo representa el extremo C-terminal y el color azul el extremo N-terminal. MBP1 (MAD2 binding Protein 1) es un péptido de 12 residuos utilizado para inducir la conformación cerrada.

e incrementa su estabilidad al formar un complejo tetramérico⁵¹ y de esta forma se crea una plataforma para la continua activación de O-MAD2. Adicionalmente se ha sugerido una conformación intermedia de MAD2, I-MAD2, la cual permite la amplificación de la señal del SAC por medio de la conversión de O-MAD2 a I-MAD2 tras su unión al complejo C-MAD2-cdc20⁵². Se ha determinado que la interacción C-MAD2-O-MAD2 es una interacción asimétrica, lo que quiere decir que los residuos que interaccionan en la interfase no son los mismos en cada una de las proteínas del dímero⁵¹.

Expresión aberrante de MAD2

Niveles aberrantes de la proteína MAD2 han sido reportados en diversos tipos de cáncer, tanto en tumores como en líneas celulares⁵³⁻⁷². Niveles bajos de MAD2 han sido reportados en cáncer de células germinales de testículo⁵⁹, nasofaringe^{70,73}, hígado⁶¹, ovario^{63-65,68,74} y mieloma múltiple⁷². Esta sub-expresión ha sido relacionada con menor sobrevida libre de recurrencia^{55,64}, menor sobrevida libre de progresión^{65,68} y menor sobrevida global⁷⁴, además de asociarse con resistencia a agentes antineoplásicos, usados en quimioterapia, tales como el cisplatino⁷³. De manera contrastante se ha encontrado una sobre-expresión de MAD2 en diversos estudios en riñón⁶², tejido conectivo⁶⁰, esófago⁶⁹, estómago^{54,56,75}, colon^{57,58}, hígado⁷¹, cervix⁵⁵, hueso⁶⁶ y mama⁷⁶. Ésta a su vez se ha asociado a un menor grado de diferenciación^{54,56,58,71}, un aumento en metástasis^{54,56-58,66}, menor sobrevida global^{58,66} y de nuevo, con resistencia a cisplatino⁵⁵. La sobre-expresión de MAD2 en ratones también demostró un incremento en la generación de tumores⁷⁷. Se ha vuelto evidente que existe una gran variación en los niveles de MAD2 en cáncer^{62,64,65,67,68,74}, la cual se ha visto relacionada a distintos sub-tipos histológicos^{62,67}. Particularmente, en carcinoma seroso de alto grado en ovario, se enfatiza la variabilidad en la expresión de MAD2 incluso dentro de la misma muestra tumoral⁶⁵.

Localización intracelular de MAD2

Además de cambios en los niveles de MAD2, también se ha estudiado su localización intracelular, en los cuales se ha encontrado variabilidad en su

localización durante interfase, esto se ha asociado a diversos parámetros clínicos como grado de diferenciación⁵⁶ o disminución en la supervivencia libre de recurrencia⁷⁴. Anteriormente se había descrito su asociación con MAD1 y subsecuente localización en los poros nucleares durante interfase⁷⁸; sin embargo, estudios posteriores han localizado a MAD2 tanto en el núcleo como en el citoplasma^{54-59,64-68,71,74,76,79,80}. En una comparación de la localización de MAD2 en 23 tejidos distintos, se encontró su presencia en el citoplasma en todos los tejidos, mientras que la mitad de ellos, especialmente los altamente proliferativos también contaban con presencia de MAD2 en el núcleo⁵⁶. Adicionalmente se encontró que en muestras de cáncer gástrico MAD2 tiene mayor presencia en el núcleo en comparación con tejido adyacente y la presencia de MAD2 específicamente en núcleo se correlaciona con un incremento en metástasis a hígado. De manera similar se ha reportado una localización nuclear y citoplasmática de MAD2 en diversos tejidos lábiles no tumorales, mientras que al estudiar tejidos tumorales se encontró una localización exclusivamente nuclear⁷⁹. Otros estudios en cáncer de ovario y cérvix apoyan esta localización exclusivamente nuclear^{55,64,68,74}, mientras que una localización mayoritariamente nuclear con baja presencia en citoplasma se ha reportado en osteosarcoma⁶⁶, carcinoma hepatocelular⁷¹ y tumores en células germinales de testículo^{59,67}. Por otra parte, se ha visto una localización principalmente citoplasmática en cáncer de mama⁷⁶, gástrico⁵⁴ y colorrectal^{57,58}. Nuevamente, no todos los estudios encuentran un patrón de localización homogéneo^{56,65,67}, y reportan variaciones en la localización de MAD2 dentro de un mismo subtipo, o incluso dentro de un mismo tumor⁶⁵.

Un estudio con ocho líneas de células germinales cancerosas de testículo, encontró que tras ser tratadas con nocodazol y colcemida, existe una relocalización de MAD2 del citoplasma al núcleo⁵⁹. Los niveles de MAD2 en estas líneas se encontraban directamente relacionados con el funcionamiento del SAC; sin embargo, una de estas líneas presenta un SAC altamente defectuoso a pesar de tener niveles intermedios de MAD2, en esta línea no se presentaba la relocalización nuclear tras el tratamiento con nocodazol y colcemida. En este mismo estudio se comparó la presencia de MAD2 en 23 seminomas con tejido normal de testículo mediante

immunohistoquímica y se encontró que mientras presentaban niveles iguales de MAD2, los seminomas presentaban menor intensidad de señal en núcleo y mayor intensidad en el citoplasma.

La reducción en la presencia nuclear de MAD2, también se ha visto relacionada con una disminución en la sobrevida libre de recurrencia⁶⁴. Todo lo anterior indica un papel fundamental de MAD2 durante la progresión del cáncer, al ver que su desregulación se asocia con varios parámetros clínico-patológicos. Es interesante notar que a pesar de que se ha visto gran variación en los niveles y localización de esta proteína, los mecanismos y factores asociados a esta desregulación no son bien comprendidos.

Otras interacciones de MAD2

Además de las interacciones descritas entre MAD2 y otras proteínas del SAC, se han observado interacciones con proteínas que no están directamente relacionadas con este punto de control. En particular se han descrito asociaciones físicas entre MAD2 y FAT10⁸¹, c-kit⁸², el receptor de insulina (IR)⁸³, el receptor de estrógenos β ⁸⁴, el receptor de GM-CSF⁸⁵ y ADAM17⁸⁶. La identificación de proteínas con diversas funciones que interactúan con MAD2 apuntan a que el papel regulatorio de MAD2 dentro de la célula podría ser más amplio de lo previamente descrito.

MAD2 y respuesta al daño a DNA

Un papel importante que se ha atribuido a la proteína MAD2 es el de un posible vínculo entre el punto de control del huso mitótico y la respuesta a daño al DNA⁸⁷⁻⁹³. Se ha demostrado que MAD2 es capaz de generar arresto en el ciclo cuando existe un daño al DNA telomérico⁹⁴, así como en respuesta a daño generado por hidroximetilmetano sulfonato en células con defectos en los mecanismos de respuesta a daño al DNA⁹³. También se ha encontrado que juega un papel en prolongar el arresto en G2/M después de un único rompimiento de doble cadena (DSB)⁹⁵. Así mismo, MDC1 y ATM, proteínas importantes en la respuesta a DSB, son capaces de localizar a MAD2 y cdc20 en los cinetocoros tras DSB, activando el SAC⁹⁰.

En *Caenorhabditis elegans* se presenta una acumulación de MAD2 en los poros nucleares y una activación del SAC en respuesta a daño al DNA generado por hidroximetilurea o radiación ionizante, esta relocalización es dependiente de la proteína de daño al DNA ATR⁹¹. La presencia de MAD2 en poros nucleares co-localiza con MAD1 y CENPA, sugiriéndose que se están generando focos de DNA dañado en los poros nucleares que facilitan las funciones de reparación del DNA de la célula.

Por otra parte en células U2OS MAD2 y la proteína asociada a reparación Chk1⁹² interaccionan. En estas células, MAD2 colocaliza e interactúa con Chk1, la cual es capaz de fosforilar a MAD2 *in vitro*. Esta asociación se incrementa después de daño al DNA producido por tratamiento con cisplatino, además se ve una ligera relocalización de ambas proteínas a la región perinuclear.

En la línea celular HEK293 se ha visto una interacción entre MAD2 y las proteínas de la vía de reparación NER, XPD y ERCC1⁸⁸. Estas proteínas normalmente se relocalizan al núcleo después del daño al DNA inducido por el tratamiento con cisplatino, sin embargo al sobre-expresar MAD2 esta relocalización disminuye. Además la interacción de XPD con otra proteína de reparación, XPA, también se ve afectada. Por otra parte también se correlaciona negativamente la expresión de MAD2 con la presencia de la histona y H2AX. Toda esta evidencia sugiere que MAD2 podría tener un papel en la regulación celular en respuesta al daño al DNA; sin embargo, los mecanismos por los que esto podría suceder no son del todo claros. Aún quedan dudas en si MAD2 únicamente juega un papel en la inducción del SAC en respuesta a daño, o si su papel en la reparación podría extenderse a mecanismos independientes del SAC.

Isoformas de MAD2

MAD2 β

En 2006 Yin et al reportaron una isoforma de la proteína MAD2 producida por medio de empalme alternativo de exones, a la cual denominaron MAD2 β ⁹⁶, por lo que de aquí en adelante a la isoforma tipo, la cual no es modificada por empalme alternativo de exones se le conocerá como MAD2 α . El empalme alternativo de exones es un proceso de edición del mRNA que aumenta la complejidad proteica al permitir la

generación de múltiples transcritos maduros a partir de una sola secuencia genómica; se estima que aproximadamente un 95% de genes están sujetos a empalme alternativo de exones⁹⁷. Se ha visto que el empalme alternativo de exones juega un papel importante en cáncer, ya que en muchos casos se observa una desregulación en la proporción de variantes producidas por empalme alternativo de exones, además de encontrarse variantes específicas para cáncer⁹⁸⁻¹⁰⁰.

La isoforma MAD2 β se genera a partir de la pérdida del exón 3 de MAD2 y además cuenta con un codón de paro prematuro, por lo que el transcrito produce un marco de lectura de 273 pares de bases. Esta variante únicamente se detectó en sub-líneas de cáncer gástrico resistentes a fármacos, mientras que la isoforma tipo se detectó en todas las líneas estudiadas, aunque se demostró que la expresión de la isoforma MAD2 β era capaz de reducir los niveles de MAD2 α . Las sub-líneas que sobre-expresaban la isoforma MAD2 β mostraban resistencia a adriamicina, vincristina y mitomicina. Con el tratamiento con adriamicina y vincristina se observó una disminución tanto en el índice mitótico como en la inducción de apoptosis en las sub-líneas que sobre-expresaban MAD2- β . En estas líneas además disminuía la acumulación de adriamicina en el núcleo. Este antecedente es el primer estudio de una variante producida por empalme alternativo de exones de MAD2, y es de alto interés que la sobre-expresión de esta variante pueda alterar la expresión de la isoforma tipo, así como que pueda jugar un papel en la resistencia a fármacos.

MAD2 γ

En el laboratorio, se identificó una tercera variante generada por empalme alternativo de exones en líneas celulares de cáncer y cultivos primarios de fibroblastos la cual se nombró MAD2 γ . En la Figura 6 se observa que esta isoforma aparece como un fragmento de aproximadamente 350 pares de bases que se expresa de manera diferencial en estas líneas celulares. Al secuenciarse, se determinó que este fragmento representaba una variante generada por empalme alternativo de exones que al igual que MAD2 β no cuenta con el exón 3, pero adicionalmente excluye al exón 2. MAD2 γ cuenta con el mismo codón de paro prematuro antes descrito en el exón 4 de la isoforma MAD2 β , de esta forma genera

así un marco de lectura de 126 pares de bases que predice un péptido de 41 aminoácidos (Figura 5).

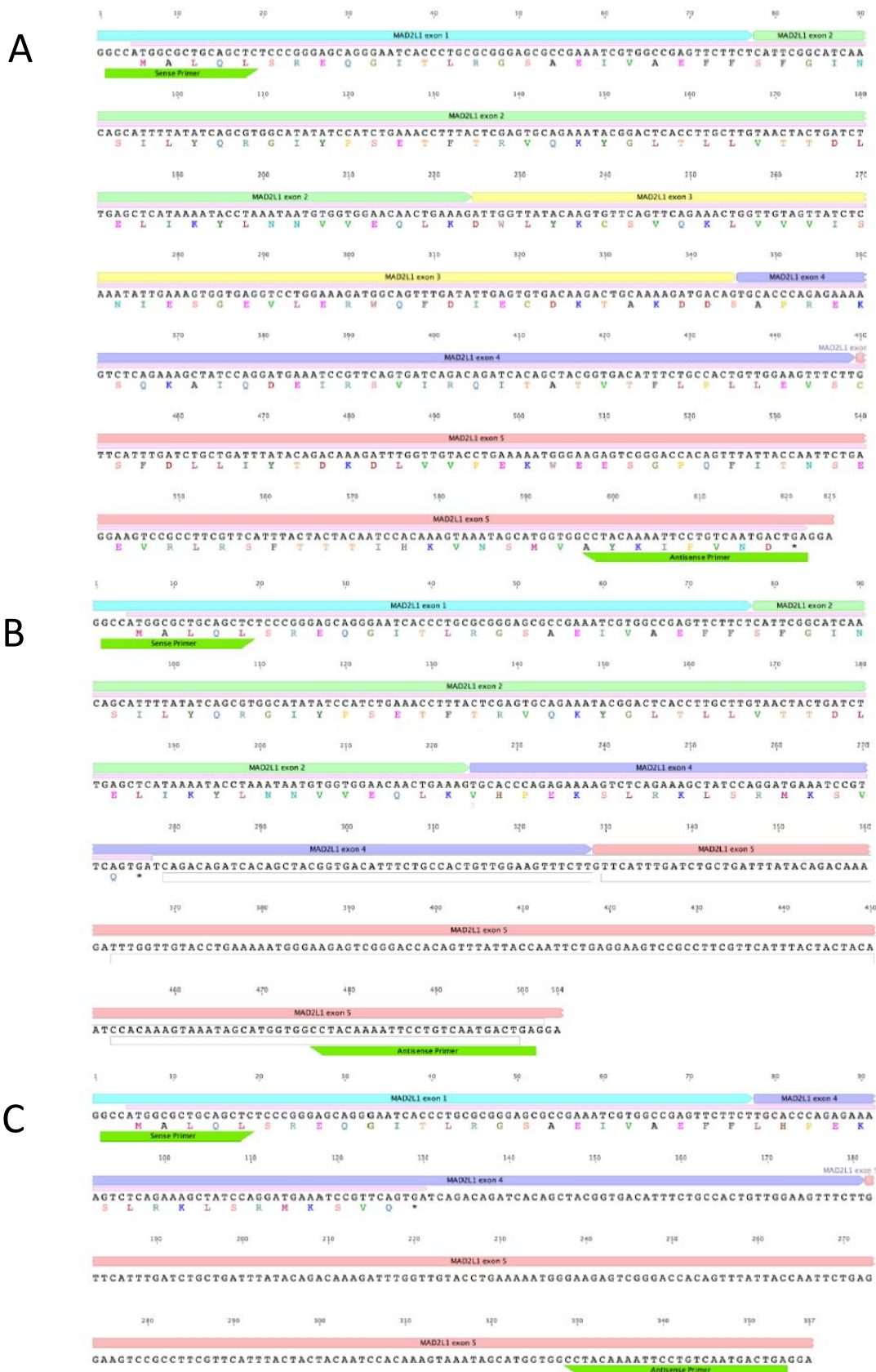


Figura 5. Secuencias de las isoformas de MAD2 A) MAD2 α B) MAD2 β C) MAD2 γ . Se muestra la secuencia, la composición de exones (exón 1 en azul, exón 2 verde, exón 3 amarillo, exón 4 morado, exón 5 rosa), el marco de lectura (en rosa claro) y el péptido predicho para las tres isoformas.

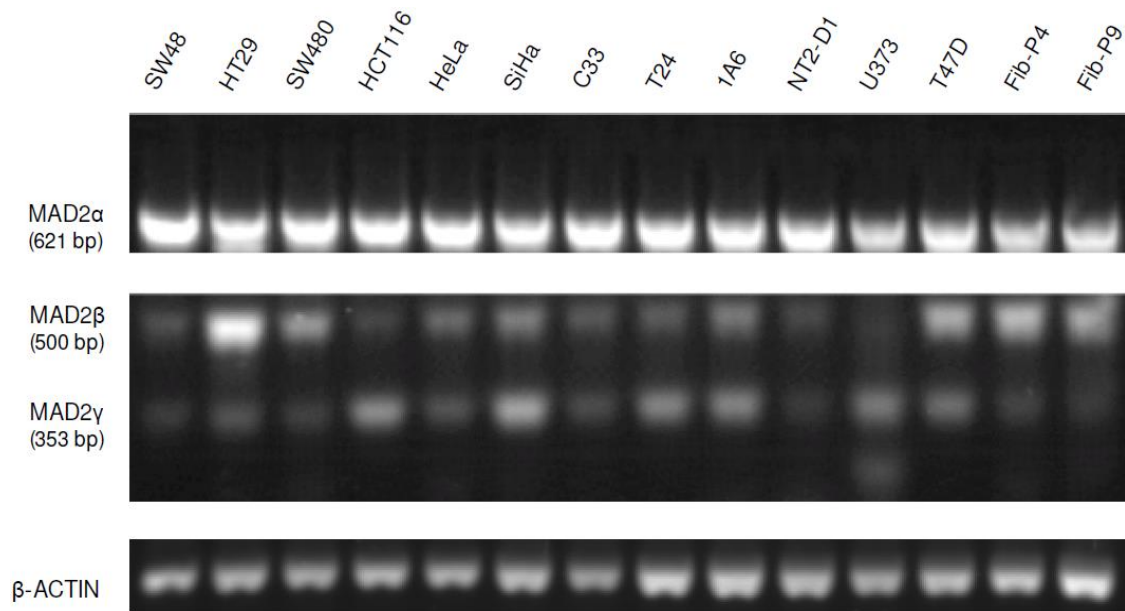


Figura 6. Expresión diferencial de la isoforma MAD2 γ por RT-PCR en distintas líneas celulares y cultivos primarios de fibroblastos. La isoforma MAD2 γ se expresa de manera diferenciada en distintas líneas celulares y cultivos primarios de fibroblastos. Los cambios son distintos a los de las isoformas MAD2 α y MAD2 β

Estudios funcionales con esta isoforma determinaron que su sobre-expresión resulta en una disminución en el índice mitótico tras tratamiento con taxol, indicando un posible papel en el SAC. Como parte de estos estudios se llevó a cabo una expresión exógena de la isoforma en la línea celular de cáncer colorrectal HCT116, y se estableció una sub-línea de células de cáncer colorrectal HCT116 que sobre-expresa a la isoforma MAD2 γ de manera estable (HCT116/MAD2 γ). La línea HCT116 es una línea de cáncer colorrectal que no presenta inestabilidad cromosómica y cuenta con un SAC funcional¹⁰¹. Además, de manera endógena cuenta con niveles bajos del transcrito de MAD2 γ .

Se analizó la presencia de la proteína MAD2 γ en la línea HCT116 así como la sub-línea HCT116/MAD2 γ por medio de Western blot (Figura 7). Adicionalmente se utilizó una sub-línea HCT116/pcDNA, transfectada de manera estable con el vector pcDNA vacío como control. En estos estudios no fue posible detectar a la proteína de manera endógena en la línea HCT116, sino únicamente en la sub-línea HCT116/MAD2 γ la cual expresa a la isoforma de manera exógena. Como se observa en la Figura 7, el uso de un anticuerpo que reconoce el amino-terminal de

la proteína reveló que solo se encontró presencia de esta isoforma en la fracción nuclear, lo que sugiere que ésta podría ser su localización intracelular. La presencia de la isoforma tipo también fue evaluada en fracciones nucleares y citoplasmáticas de las sub-líneas de HCT116. Los resultados sugieren que podría existir un enriquecimiento de la proteína MAD2 α en la fracción nuclear en la sub-línea HCT116/MAD2 γ en comparación con las fracciones nucleares de la línea HCT116

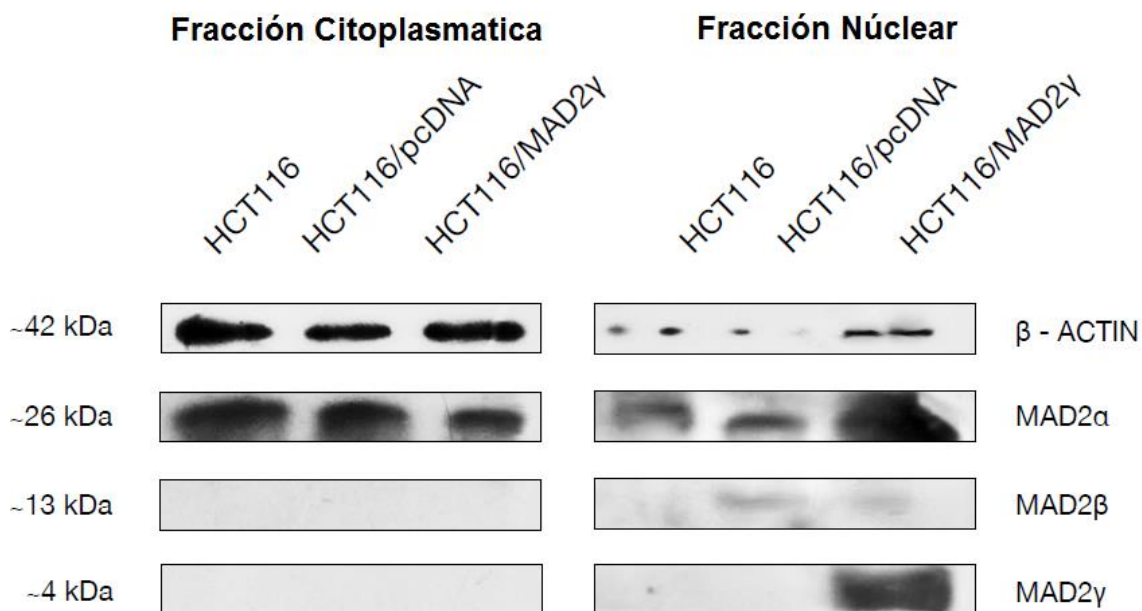


Figura 7. Western Blot contra MAD2 en fracciones citoplasmática y nucleares.
Comparación de las proteínas MAD2 α , MAD2 β y MAD2 γ en sub-líneas celulares HCT116, HCT116/pcDNA y HCT116/MAD2 γ

y la línea control HCT116/pcDNA; sin embargo, estos estudios no son concluyentes.

Adicionalmente, se observó una asociación entre la expresión de esta isoforma y resistencia a cisplatino en tumores de células germinales de testículo (TCGT). En tumores de pacientes con TCGT resistentes al tratamiento estándar con base en el cisplatino, se observó una mayor expresión de MAD2 γ en comparación con pacientes sensibles. Aunado a esto, al exponer a la línea HCT116 a una dosis IC₅₀ de cisplatino, se observa un incremento en la expresión endógena de la isoforma MAD2 γ , y no así en la expresión de MAD2 α (Figura 8). Esto sugiere que la isoforma MAD2 γ , además podría jugar un papel en la resistencia de tratamiento con cisplatino.

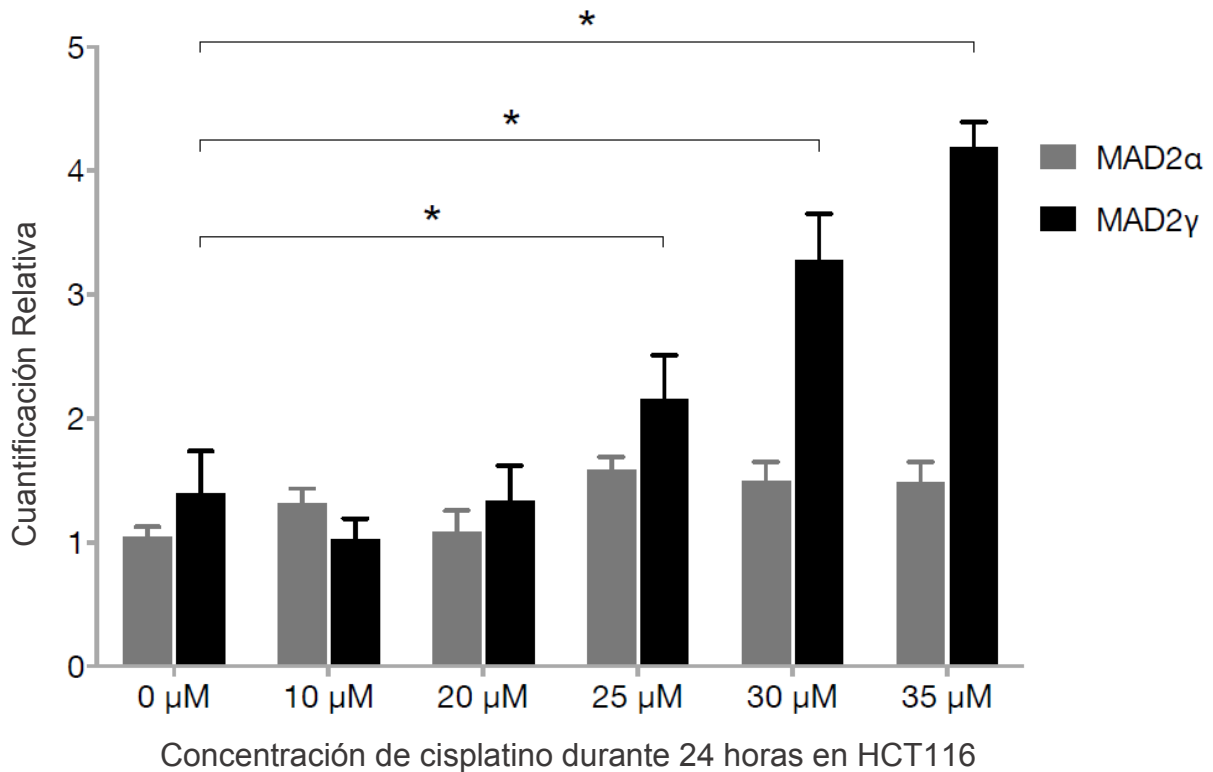


Figura 8. Cambios en la expresión de las isoformas MAD2α y MAD2γ en respuesta a tratamiento con cisplatino Se observan cambios en la expresión MAD2γ, pero no así MAD2α en respuesta a concentraciones crecientes de cisplatino

Cisplatino

El cisplatino, es un agente quimioterapéutico utilizado desde los años setenta en el tratamiento de distintos tipos de cáncer¹⁰². Su principal mecanismo de acción consiste en generar daño al DNA a través de la generación de aductos, sobre todo aductos intracatenarios ApG y GpG¹⁰³, la reparación de estos esta mediada por la vía de escisión de nucleótidos (NER). Existen diversos mecanismos de resistencia a cisplatino, los cuales no están completamente descritos; sin embargo, se plantea que la actividad elevada de la vía NER pudiera ser uno de ellos¹⁰³, anteriormente se reportó una posible interacción de MAD2 con esta vía⁸⁸. Por otra parte se ha visto que la sensibilidad a cisplatino depende de un arresto mediado por el SAC y que la depleción de MAD2 podría llevar a resistencia a cisplatino⁷³. Adicionalmente se ha propuesto que no es solo el daño primario generado por la formación de aductos que se relaciona con resistencia a cisplatino, sino que los mecanismos de

reparación de daño secundario, como los DSB y aberraciones cromosómicas, también juegan un papel importante en ésta¹⁰⁴.MAD2 ha sido implicado en la respuesta celular a DSB^{87,89,90}. Estas evidencias dan pie a pensar en un papel importante para MAD2 en respuesta y resistencia a cisplatino por mecanismos dependientes e independientes del SAC.

Como se mencionó anteriormente, se ha observado que la isoforma generada por empalme alternativo de exones descrita en el laboratorio MAD2 γ , pudiera tener un efecto en la localización intracelular de la isoforma tipo MAD2 α . Además es posible que ambas isoformas jueguen un papel en la respuesta y resistencia a cisplatino. Por estas razones, en este trabajo se plantea estudiar la relación entre la sobre-expresión de MAD2 γ y la localización intracelular de MAD2 α , así como la localización de ambas isoformas en respuesta a tratamiento con cisplatino.

Planteamiento del problema

Se ha visto que la proteína del SAC, MAD2, frecuentemente presenta una expresión y localización aberrante y variable en cáncer. Los factores involucrados en esta localización y expresión diferencial de MAD2 son muy diversos y no están bien descritos. En el laboratorio se ha identificado una isoforma de esta proteína, MAD2 γ , generada por empalme alternativo de exones la cual se cree podría tener un efecto en la localización de la isoforma tipo. La localización de MAD2 γ no se conoce con precisión, por lo que es de interés en este trabajo no solo determinar la localización de esta isoforma, sino cómo ésta pudiera afectar la distribución de la isoforma tipo dentro de la célula.

Además, la localización diferencial de la proteína MAD2 α se ha asociado con diversos fenómenos en cáncer, entre ellos la resistencia a cisplatino. El cisplatino es un agente causante del daño al DNA, siendo un fármaco importante utilizado en el tratamiento del cáncer, por lo que la resistencia a cisplatino es un fenómeno relevante. Los mecanismos por los cuales MAD2 podría estar involucrada en los procesos de resistencia a cisplatino no están bien descritos, sin embargo, se ha observado la asociación de MAD2 con varias proteínas involucradas en sistemas de reparación de daño al DNA, modificando la localización de algunas de ellas en respuesta a cisplatino.

Estudios funcionales con MAD2 γ en el laboratorio muestran un aumento en la expresión de esta isoforma en respuesta a cisplatino, además de resistencia en tumores que la sobre-expresan, sugiriendo un papel importante para esta isoforma, el cual aún se desconoce. Como un primer acercamiento a entender el papel de ambas isoformas en los mecanismos celulares de respuesta a cisplatino, es de interés estudiar posibles cambios que este agente pudiera inducir en su localización. Parte importante de este trabajo también será entender si la sobre-expresión de MAD2 γ pudiera tener un efecto en la re-localización de MAD2 α en respuesta a cisplatino.

Pregunta de Investigación

¿Cómo afecta la sobre-expresión de MAD2 γ la localización intracelular de MAD2 α y como esta se ve alterada en respuesta al tratamiento con cisplatino?

Hipótesis

La sobre-expresión de MAD2 γ tendrá un efecto en la localización intracelular de MAD2 α , incrementando su presencia en núcleo, así mismo, el tratamiento con cisplatino podrá alterar esta localización.

Objetivo General

Determinar la relación entre la sobre-expresión de la isoforma MAD2 γ la localización intracelular de MAD2 α , y el cambio de localización de ambas isoformas en respuesta al cisplatino.

Objetivos Particulares

- Determinar la localización intracelular de la isoforma MAD2 γ , al ser sobre-expresada en la línea celular HCT116.
- Determinar la localización intracelular de la isoforma MAD2 α en las sub-líneas celulares HCT116, HCT116/pcDNA y HCT116/MAD2 γ .
- Determinar el efecto del tratamiento con cisplatino en la localización intracelular de la proteína MAD2 α , en las sub-líneas celulares HCT116, HCT116/pcDNA y HCT116/MAD2 γ .
- Determinar el efecto de tratamiento con cisplatino en la localización intracelular de la proteína MAD2 γ al ser sobre-expresada en la línea celular HCT116.

Materiales y Métodos

Cultivo Celular

Para realizar este estudio se utilizó la línea celular de cáncer HCT116, de origen epitelial derivada de colon. Su moda cromosómica es de 45. No presenta inestabilidad cromosómica y cuenta con un SAC funcional. Estas células se cultivaron en medio McCoy 5^a (GIBCO, 16600-082) adicionado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico y antimicótico 100X (GIBCO). Se crecieron a una temperatura de 37°C y 5% CO₂. Además se utilizaron las líneas HCT116/pcDNA y HCT116/MAD2 γ previamente establecidas en el laboratorio las cuales fueron transfectadas de manera estable con los vectores pcDNA y pcDNA-MAD2 γ respectivamente, cultivadas en las mismas condiciones.

Construcción del vector MAD2 γ -FLAG

Para estudios de localización de la isoforma MAD2 γ , se utilizó el vector de expresión MAD2 γ -FLAG. Para la construcción de este vector se subclonó el fragmento MAD2 γ del vector pcDNA-MAD2 γ en el esqueleto del vector MAD2 α -FLAG. Para la escisión de ambos insertos se utilizaron las enzimas de restricción HindIII (Invitrogen 15207-020) y BamHI (Invitrogen 15201-031). El vector se secuenció utilizando los primers MAD2 FOR y MAD2 β REV (Metodología in extenso, Apéndice A).

Transfección y sobre-expresión del vector MAD2 γ -FLAG

El vector MAD2 γ -FLAG se transfectó en la línea celular HCT116 utilizando lipofectamina LTX (Invitrogen 15338-100). Se sembraron 100,000 células en una caja de 6 pozos, utilizando 1 μ g de vector para las transfecciones. La expresión de MAD2 γ se analizó por PCR a las 24 h de transfección, utilizando los oligonucleotidos MAD2_E1/E4 REV: *CTCTGGGTGCAAGAAGAACTC* y HIND3_MAD2 FOR: *TAAGCTTCCATGGCGCTGCAGCTC*. (Metodología en extenso, Apéndice B)

Inmunofluorescencia MAD2 α

Para las inmunofluorescencias de MAD2 α se utilizó el anticuerpo primario policlonal de abcam rabbit anti-MAD2L1 (abcam, ab97777 Lot.GR2167-15). Como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo TRITC-Goat anti-rabbit IgG de Zymed 62-6114.

También se utilizó el anticuerpo contra proteínas del centrómero (ACA) acoplado a FITC (15-235-F, Antibodies Incorporated) como marca del centrómero. Se sembraron 100,000 células sobre cubreobjetos de 22 x 22 mm. Se fijaron durante 20 min con formaldehído al 3.7 % y se permeabilizaron con tritón X-100 al 0.5% por 15 min. Las células se bloquearon con BSA al 5% (Fraction V, Sigma A2059) por 1 hora y posteriormente se incubaron o/n a 4°C con el anticuerpo ACA en una dilución 1:200. Se incubó con el anticuerpo anti-MAD2 en dilución 1:200 por 24 horas. El anticuerpo TRITC anti-conejo se utilizó durante 1:30 h en una dilución 1:50. Los cubreobjetos se montaron en laminillas con medio de montaje para fluorescencia Vectashield:Vectashield con DAPI 4:1 (Vector laboratorios H-1000, H-1200)

Inmunofluorescencia MAD2 γ

Se utilizó el anticuerpo policlonal goat anti-DDDDK tag (anti-FLAG) acoplado a FITC (ab1259, abcam Lot.GR132258-1). Se sembraron 60,000 células en cubreobjetos de 22 x 22 mm y se transfectaron con 1 μ g de vector MAD2 γ -FLAG. A las 24 horas las células se fijaron 20 minutos con formaldehído al 3.7% y se permeabilizaron con tritón X-100 al 0.5%, se bloquearon 1 hora con suero normal de cabra al 5%. Se incubaron con el anticuerpo anti-FLAG o/n a 4°C en una dilución 1:1000 en suero normal de cabra al 5%.

Para la inmunofluorescencia doble se incubó primero con el anticuerpo anti-FLAG, posteriormente se realizaron 4 lavados con PBS, se bloqueó 1 hora con BSA al 5% y se continuó con la inmunofluorescencia anti-MAD2 descrita anteriormente.

(Metodología en extenso de los experimentos realizados, Apéndice C)

Tratamiento con cisplatino

Las células fueron tratadas con dosis IC₂₀ determinadas anteriormente para cada una de las sub-líneas HCT116, HCT116/pcDNA y HCT116/MAD2 γ , las cuales son 13.4 μ M, 14.3 μ M y 14.1 μ M respectivamente para 24 horas y 5.5 μ M, 8.3 μ M y 6.8 μ M para 48. Todos los experimentos se realizaron utilizando el lote 905109 marca Tecnoptatinum.

Análisis de fotos

Se fotografiaron 20 campos por laminilla, elegidos al azar. Las fotos se tomaron en el microscopio Axio Imager.A2 de Zeiss, utilizando el objetivo α -Plan-FLUAR 100X y el software AxioVs40 versión 4.8 2.0. Utilizando el programa ZEN lite 2012 se seleccionó el contorno total y nuclear de cada célula con la herramienta *spline*, de este modo obteniendo el área e intensidad promedio de cada célula, así como el área e intensidad promedio del núcleo. Se calculó la intensidad total de la célula multiplicando la intensidad promedio por el área y la intensidad total del núcleo multiplicando la intensidad promedió del núcleo por el área nuclear. Posteriormente se restó la intensidad total nuclear de la intensidad total celular obteniendo así la intensidad total del citoplasma. Se calculó el área del citoplasma restando el área nuclear del área celular. Al dividir la intensidad total del citoplasma entre el área citoplasmática, se obtuvo la intensidad promedio del citoplasma. Con esta información se obtuvo una relación núcleo/citoplasma para cada célula, dividiendo la intensidad promedio nuclear entre la intensidad promedio citoplasmática.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando STATA 13.2. Se realizó un análisis descriptivo utilizando gráficas tipo *Boxplot* para la comparación en la localización de MAD2 α en sub-líneas celulares HCT116, HCT116/pcDNA y HCT116/MAD2 γ , en respuesta al tratamiento con cisplatino y para la comparación de la localización de MAD2 α y MAD2 γ en la línea celular HCT116 transfectada con Mad2-FLAG en respuesta a cisplatino. Para ver la distribución de las células según su proporción nuclear de MAD2 α en la sub-líneas se utilizaron histogramas. Para comparar la distribución de MAD2 α y MAD2 γ en la línea celular HCT116 transfectada con MAD2-FLAG se utilizaron gráficas de dispersión en donde se muestra el mejor ajuste lineal por mínimos cuadrados. Las estadísticas descriptivas reportadas son la media, la desviación estándar, la varianza y los cuartiles.

Para todas la pruebas se estableció $P=0.05$ como valor crítico. Para comparar la proporción de MAD2 α en el núcleo en las sub-líneas se realizó un análisis de varianza de una vía y comparaciones múltiples utilizando la prueba post hoc de

Bonferroni. Sin embargo, la prueba de igualdad de varianzas de Bartlett indicó que éstas no son iguales por lo que se realizó un análisis de Kruskal-Wallis y para comparaciones múltiples se utilizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. Para comparar el efecto del tratamiento con cisplatino en las sub-líneas celulares, se realizó un análisis de varianza de dos vías en donde se encontró que la interacción es significativa por lo que las comparaciones múltiples se realizaron para cada tiempo de tratamiento y cada sub-línea. Se utilizó corrección de Bonferroni para las pruebas múltiples. Para la comparación de la proporción nuclear de MAD2 γ y MAD2 α en la línea celular HCT116 transfectada con MAD2 γ -FLAG se realizó un análisis de varianza de una vía y se hicieron las comparaciones múltiples con corrección de Bonferroni.

Resultados

1. Expresión de MAD2 γ en células transfectadas.

Un objetivo de este trabajo era determinar la localización intracelular de la isoforma MAD2 γ . Para lograr esto se utilizó el vector de expresión MAD2 γ -FLAG el cual codifica para la expresión de la isoforma MAD2 γ aunada a una etiqueta peptídica "FLAG" (DYKDDDK). Este vector fue transfectado en la línea celular HCT116, 24 horas posteriores a la transfección se analizó la expresión de esta isoforma por medio de PCR punto final. En la Figura 9 se observa esta expresión comparada a la expresión en la línea HCT116 así como en las sub-líneas HCT116/MAD2 γ y HCT116/pcDNA. Estas sub-líneas fueron transfectadas de manera estable con el vector de expresión MAD2 γ -pcDNA y el vector pcDNA sin inserto respectivamente. La sub-línea HCT116 expresa bajos niveles de la isoforma de manera endógena, mismo fenómeno que se observa en la sub-línea HCT116/pcDNA. La sub-línea HCT116/MAD2 γ muestra la sobre-expresión esperada de la isoforma, se observa que las células transfectadas de manera transitoria con el vector MAD2 γ -FLAG muestran una expresión comparable o incluso mayor que la sub-línea HCT116/MAD2 γ .

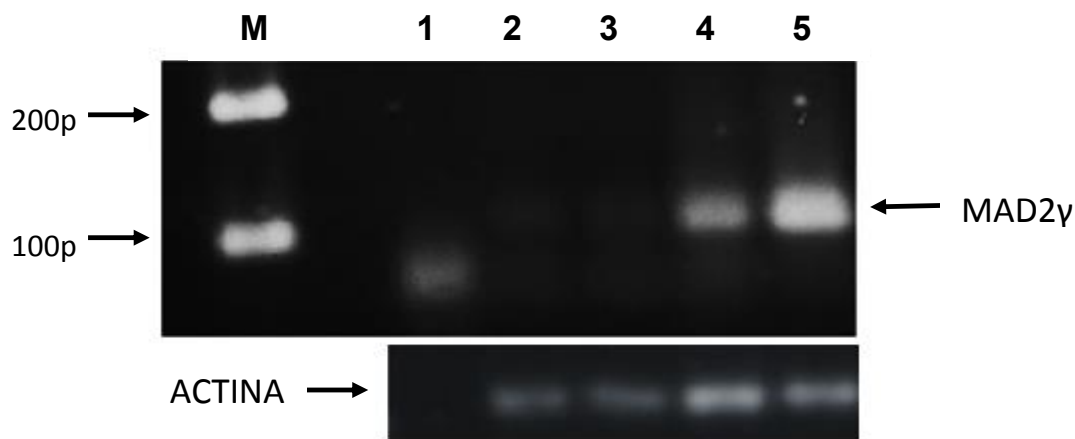


Figura 9. Expresión de la isoforma MAD2 γ por RT-PCR en sub-líneas de HCT116. M) Marcador de peso 1) Control 2) HCT116 3) HCT116/pcDNA 4) HCT116/MAD2 γ 5) HCT116 transfectadas con MAD2-FLAG

2. Localización intracelular de MAD2 γ

Habiendo comprobado la sobre-expresión de la isoforma MAD2 γ se estudió su localización intracelular mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo que

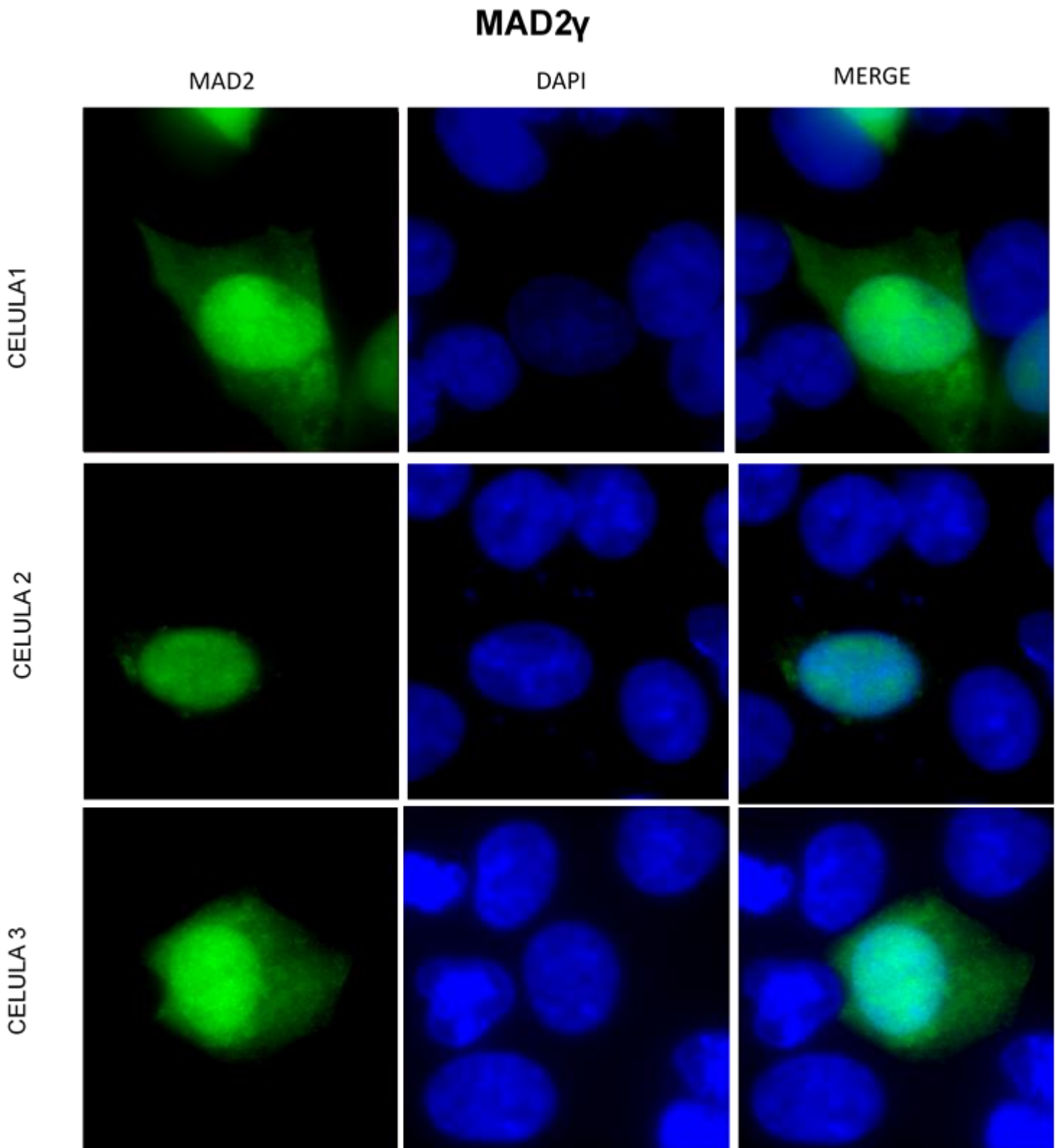


Figura 10. Localización intracelular de MAD2 γ . Se muestran tres campos de una inmunofluorescencia contra FLAG, en células transfectadas con MAD2 γ -FLAG. Se puede observar una señal principalmente nuclear en todas las células, con variación en los niveles de la señal en el citoplasma. En las células no transfectadas no hay señal del anticuerpo.

reconoce a la etiqueta FLAG. En todas las células se encontró una localización principalmente nuclear, sin embargo existe heterogeneidad en la población y algunas células presentaban una presencia citoplasmática de la isoforma mucho mayor que otras. Dentro del núcleo la isoforma presento una distribución homogénea (Figura 10).

3. Localización intracelular de MAD2 α en líneas celulares estables

Se comparó la localización intracelular de MAD2 α en las sub-líneas HCT116, HCT116/MAD2 γ y HCT116/pcDNA utilizando un anticuerpo contra la proteína MAD2. Este anticuerpo se validó al corroborar la co-localización de MAD2 α con ACA en los cinetocoros de las metafases en las tres sub-líneas celulares (Figura 11).

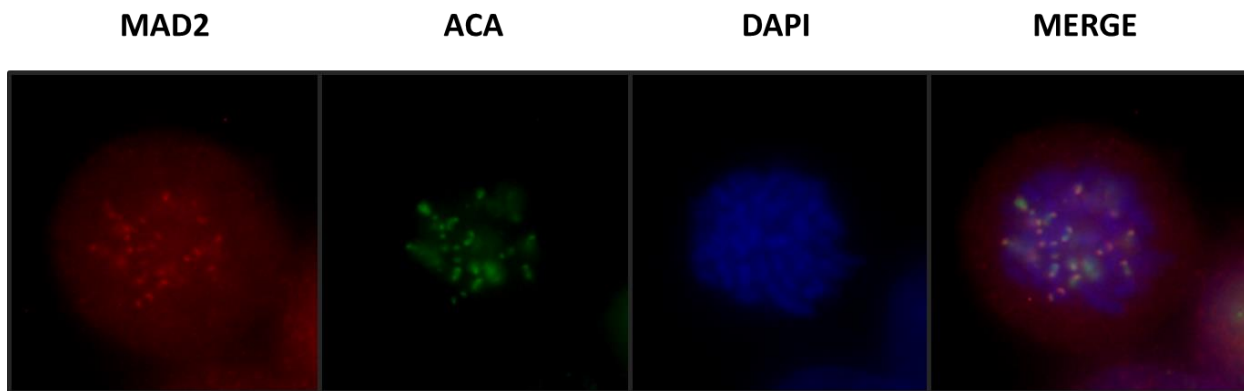


Figura 11. Validación del anticuerpo contra MAD2. Se observa co-localización con el anticuerpo ACA, el cual funciona como marca de centrómero, esta es la localización de MAD2 esperada durante la mitosis

Posteriormente se estudió el patrón de localización intracelular de MAD2 α durante interfase. Se encontró un patrón similar en las tres sub-líneas, encontrando a la proteína tanto en el núcleo como en el citoplasma con una mayor concentración en el núcleo. Hay una sugerencia de un ligero incremento en la señal nuclear en la línea celular HCT116/MAD2 γ . A diferencia de la isoforma MAD2 γ el patrón era el mismo en distintas células de la población. Dentro del núcleo la proteína no se distribuyó de forma homogénea, se muestra una mayor presencia en áreas de baja tinción con DAPI, que representan áreas de menor densidad del DNA (Figura 12).

Para comparar la distribución de la proteína en las distintas líneas celulares se determinó la intensidad promedio de fluorescencia tanto en el núcleo como en el

citoplasma de células individuales, y se obtuvo una relación núcleo/citoplasma (Figura 13). La línea HCT116/MAD2 γ mostró un ligero incremento en el promedio de la relación núcleo/citoplasma en comparación a las otras dos sub-líneas el cual representa un cambio estadísticamente significativo. Se observó este mismo incremento en los valores de los tres cuartiles, con la mayor diferencia en el tercer cuartil (Tabla 1).

Así mismo se generaron histogramas para ver la distribución de la población de células según su valor de relación núcleo/citoplasma (Figura 14). Se observan

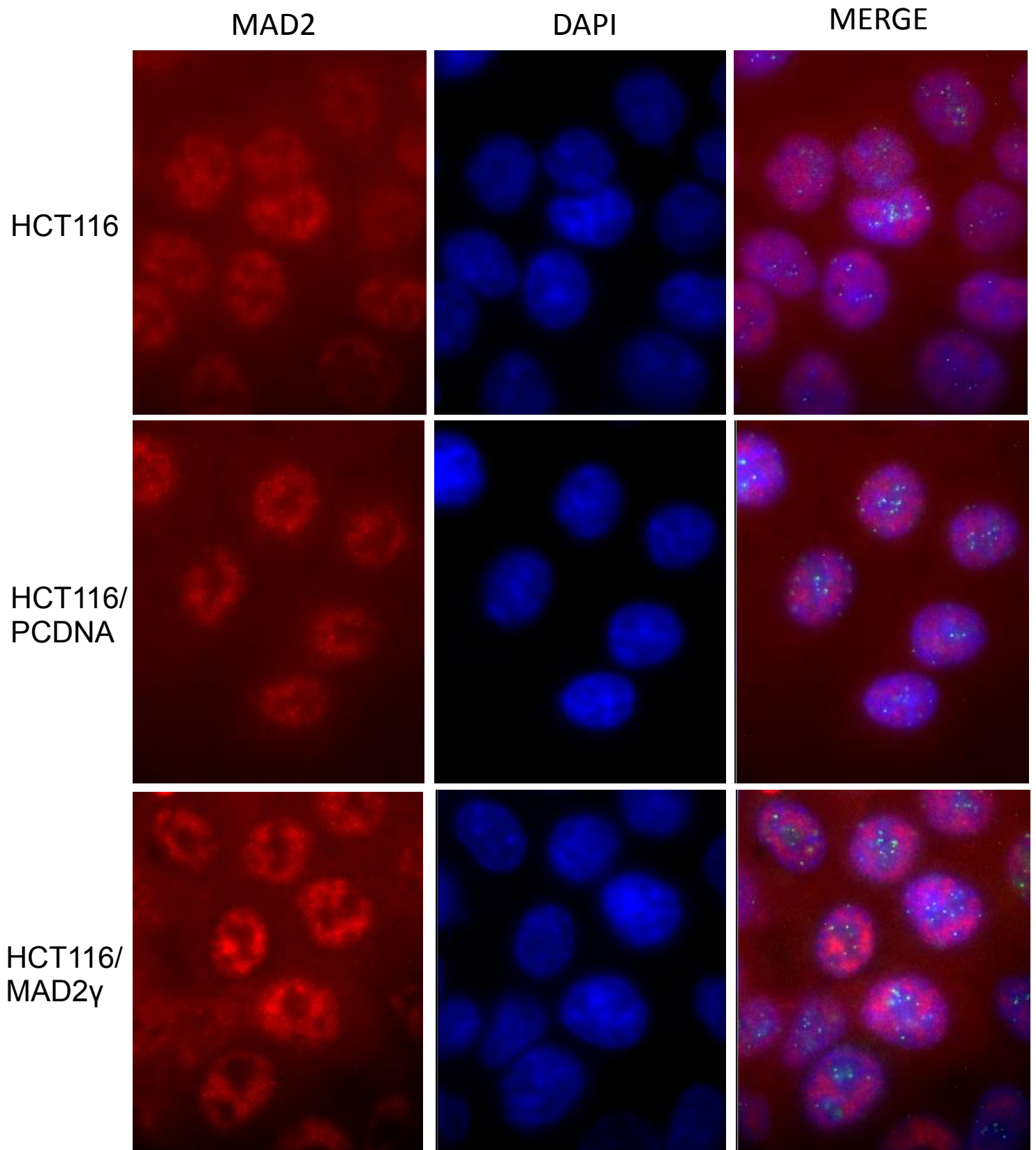


Figura 12. Inmunofluorescencia contra MAD2 α en sub-líneas celulares HCT116, HCT116/pcDNA y HCT116/MAD2 γ . El patrón de localización es similar en las tres sub-líneas, encontrando señal tanto en el núcleo como en el citoplasma, con una mayor concentración en el núcleo. Se ve un muy ligero incremento en la señal nuclear de la línea HCT116/MAD2 γ . En el empalme se incluye también a ACA marcada con FITC.

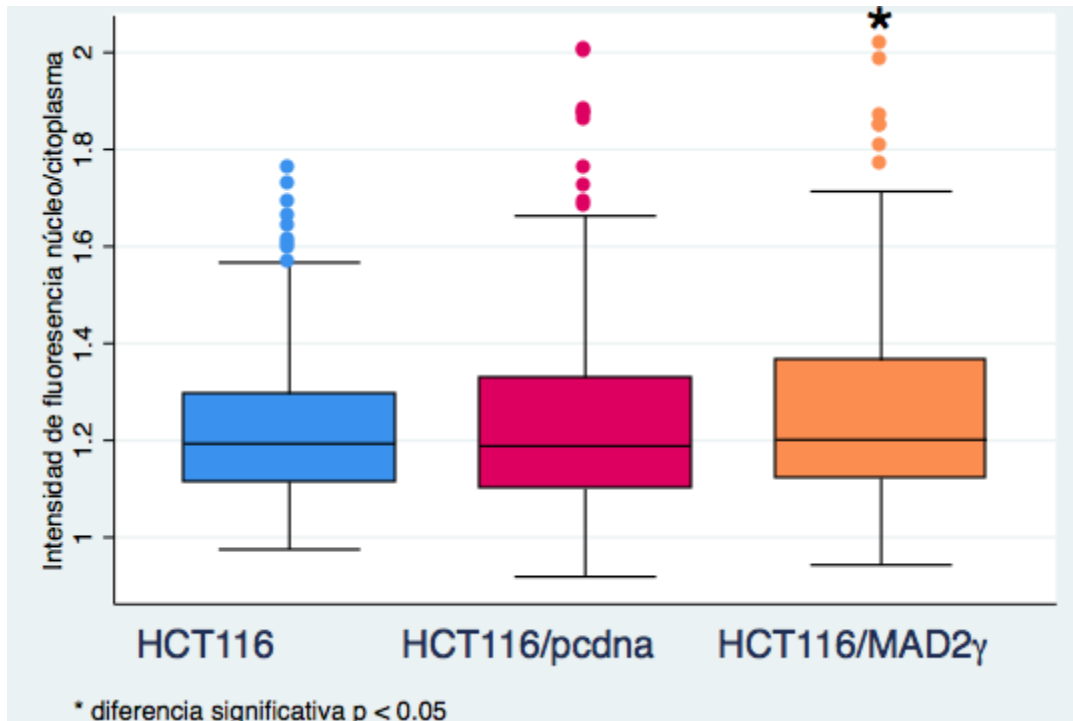


Figura 13. Localización intracelular de MAD2 α en sub-líneas celulares. Se calculó la relación núcleo/citoplasma dividiendo la intensidad promedio del núcleo entre la intensidad promedio del citoplasma. Se graficó esta relación para las sub-líneas HCT116, HCT116/pcDNA y HCT116/MAD2 γ . La relación de la línea MAD2 γ mostró diferencias significativa con respecto a las otras dos con $p < 0.05$

similitudes entre las tres líneas, las cuales presentan una distribución asimétrica con sesgo hacia la izquierda. Sin embargo, se pueden observar una diferencia en la forma de la distribución de HCT116/MAD2 γ la cual tiene una concentración de valores alrededor del 1.6 que no se presenta en las otras gráficas, mostrando un grupo dentro de esta población que se aleja de la media el cual no está presente en las otras sub-líneas.

Línea	Media	Desviación Estándar	Primer Cuartil	Mediana	Tercer Cuartil	Rango Intercuartil
HCT116	1.215826	0.1341595	1.114682	1.193222	1.295556	0.180874
HCT116/pcDNA	1.229297	0.179578	1.099527	1.188296	1.329421	0.229894
HCT116/MAD2 γ	1.256743	0.1671737	1.121691	1.20133	1.365099	0.243408

Tabla 1. Valores de tendencia y dispersión de la relación núcleo/citoplasma en las sub-líneas HCT116, HCT116/MAD2 γ , HCT116/pcDNA.

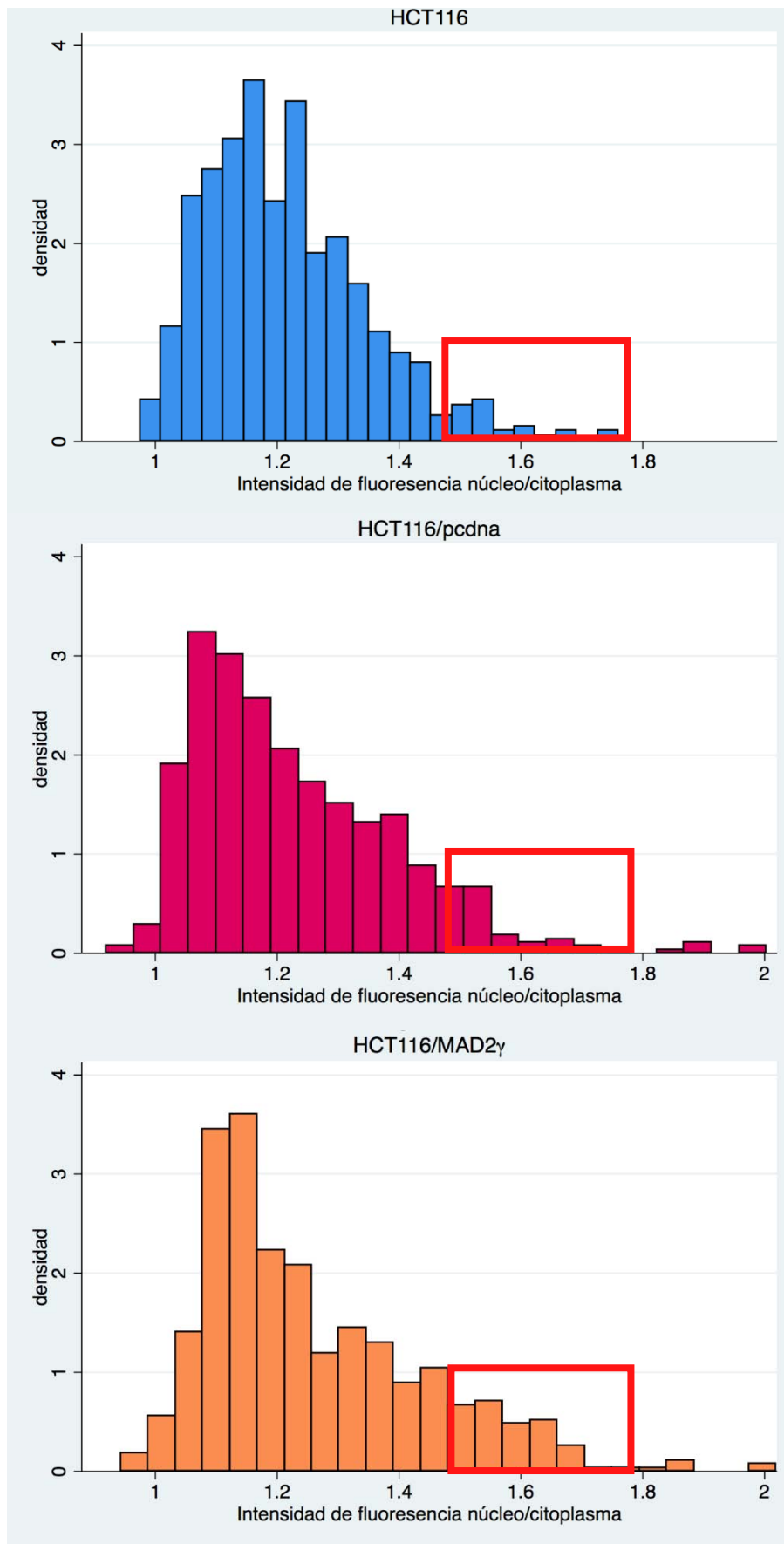


Figura 14. Distribución de células según su relación núcleo/citoplasma Se observa una distribución cargada hacia la izquierda indicando una variación mayor en las células con altas concentraciones de MAD2 α en el núcleo. En la línea HCT116/MAD2 γ se observa un grupo de células desplazado hacia la derecha (recuadro rojo) indicando un incremento en la concentración nuclear de MAD2 α .

4. Re-localización al núcleo de MAD2 α en respuesta a cisplatino

Después de establecer la localización de MAD2 α en las sub-líneas celulares, se exploró el efecto de tratarlas con cisplatino. Para esto se eligió una dosis sub-letal IC₂₀ (previamente determinada) y tiempos de tratamiento de 24 y 48 horas. Las células permanecieron en incubación con la dosis de cisplatino por el tiempo establecido y posteriormente fueron fijadas y la localización de MAD2 α analizada por inmunofluorescencia. Se encontró que siguiendo el tratamiento con cisplatino, aumenta la presencia de MAD2 α en el núcleo de manera importante (Figura 15a, 15b y 15c), se muestra la misma preferencia por zonas de baja densidad de DNA. Esto se conserva en todas las sub-líneas. A las 48 horas la relocalización en el núcleo de MAD2 α es muy clara y todas las células muestran alta intensidad de señal en el núcleo, se observa también un aumento importante en el tamaño de estos núcleos.

A las 24 horas en contraste, existe una gran variabilidad entre células de una misma línea. Mientras que en algunas células aumenta de manera importante la señal de MAD2 α en el núcleo, en otras células parece incluso haber una disminución de ésta.

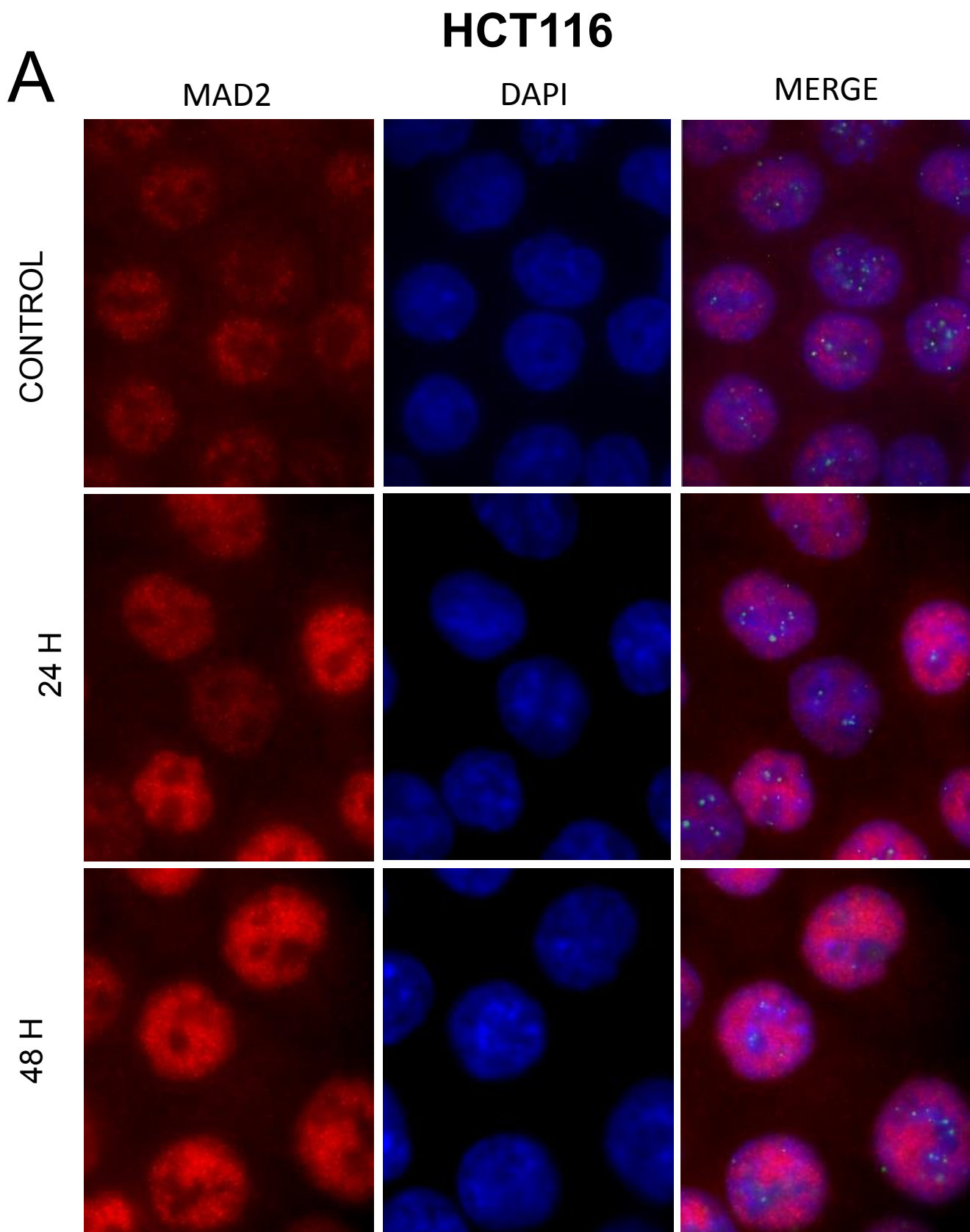


Figura 15a. Localización celular de MAD2 α en respuesta a cisplatino en sub-línea HCT116
 Inmunofluorescencias de MAD2 α con tratamiento de cisplatino a las 24 y 48 horas. Se observa un incremento en la concentración nuclear de las isoformas en las tres líneas celulares. En el empalme se incluye también la marca centromérica ACA acoplada a FITC (verde).

HCT116/PCDNA

B

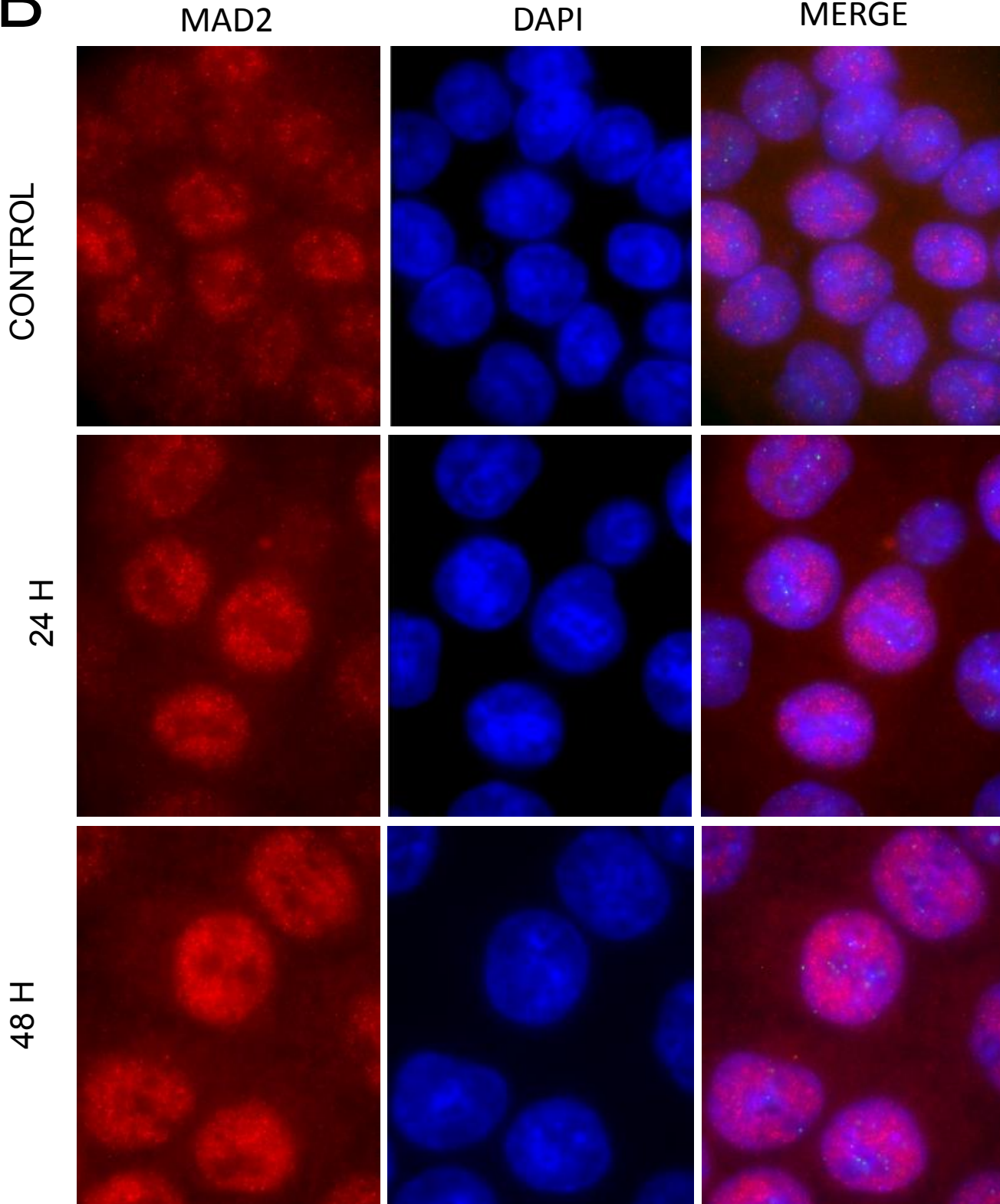


Figura 15b. Localización celular de MAD2 α en respuesta a cisplatino en sub-línea HCT116/pcDNA. Inmunofluorescencias de MAD2 α con tratamiento de cisplatino a las 24 y 48 horas. Se observa un incremento en la concentración nuclear de las isoformas en las tres líneas celulares. En el empalme se incluye también la marca centromérica ACA acoplada a FITC (verde).

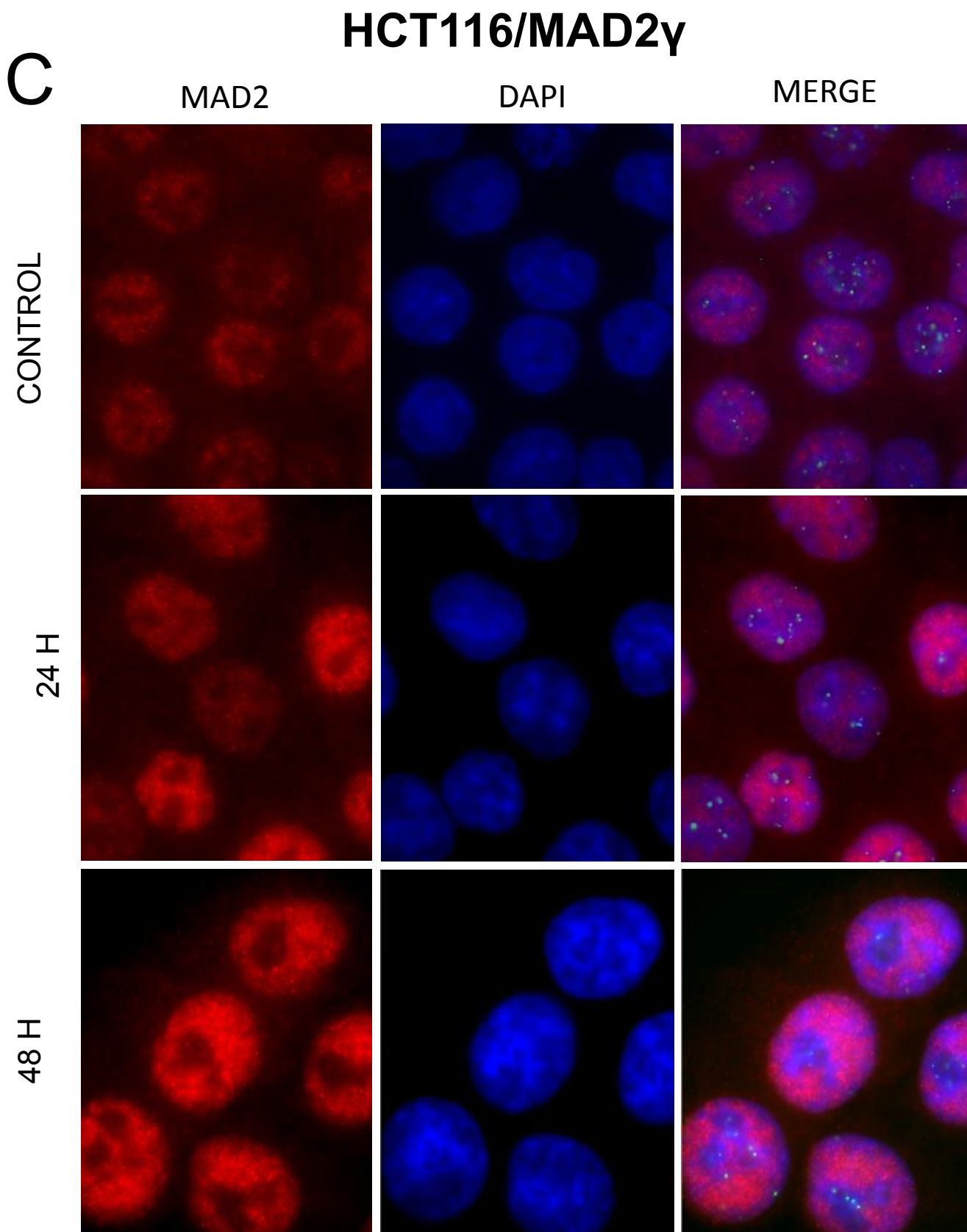


Figura 15c. Localización celular de MAD2 α en respuesta a cisplatino en sub-línea HCT116/MAD2 γ . Inmunofluorescencias de MAD2 α con tratamiento de cisplatino a las 24 y 48 horas. Se observa un incremento en la concentración nuclear de las isoformas en las tres líneas celulares. En el empalme se incluye también la marca centromérica ACA acoplada a FITC (verde).

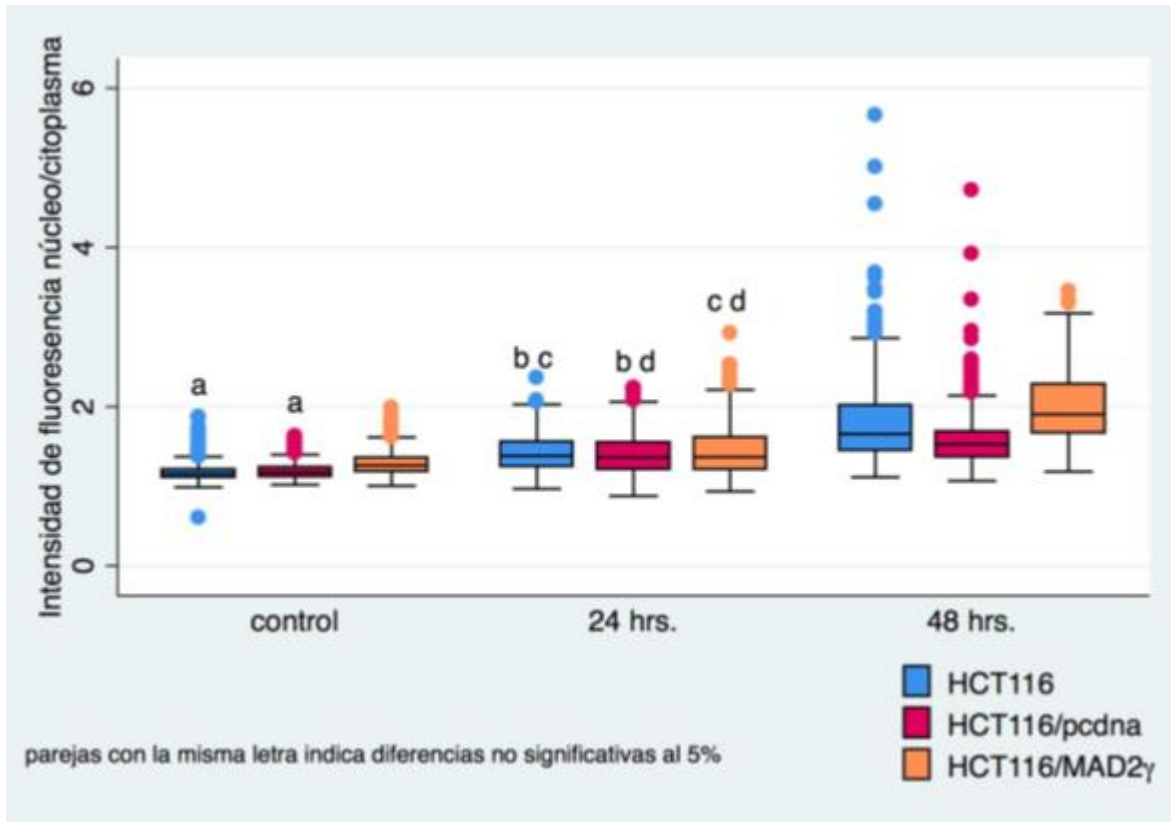


Figura 16 Localización intracelular de MAD2 α en respuesta a cisplatino. Las tres sub-líneas muestran un incremento de señal en el núcleo tanto a las 24 como a las 48 horas. Hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre HCT116/MAD2 γ y las otras líneas a las 48 y el control, pero no a las 24 horas.

Se calculó la relación núcleo/citoplasma para cada tiempo en las tres sub-líneas. La proporción nuclear de MAD2 α aumento de manera significativa del control a las 24 horas, y nuevamente entre las 24 a las 48 horas (Figura 16). Interesantemente, se encontraron diferencias significativas entre la sub-línea HCT116/MAD2 γ con respecto a las otras dos tanto en el control como en el tratamiento a las 48 horas, pero no a las 24 horas. A este tiempo la media y el tercer cuartil son superiores a los valores en las otras líneas (Tabla 2); sin embargo, esto no es el caso para el primer cuartil y la mediana. Esto se refleja en una desviación estándar y rango intercuartil superiores a las otras líneas en este tiempo, indicando una mayor variación en la población celular de la línea HCT116/MAD2 γ .

Tiempo	Línea	Media	Desviación Estándar	Primer Cuartil	Mediana	Tercer cuartil	Rango Intercuartil
Control	HCT116	1.181233	0.1154877	1.109145	1.1611	1.21478	0.105635
	HCT116/pcDNA	1.197539	0.2337939	1.124582	1.175951	1.239485	0.114903
	HCT116/MAD2 γ	1.284953	0.6579219	1.180909	1.262806	1.356051	0.175142
24 horas	HCT116	1.415544	0.1062696	1.244188	1.38322	1.565007	0.320819
	HCT116/pcDNA	1.406009	0.2590874	1.210725	1.361522	1.55537	0.344645
	HCT116/MAD2 γ	1.449035	0.3760978	1.206987	1.366959	1.619198	0.412211
48 horas	HCT116	1.846137	0.1435428	1.440705	1.657885	2.023781	0.583076
	HCT116/pcDNA	1.593909	0.3186919	1.368031	1.526701	1.685614	0.317583
	HCT116/MAD2 γ	1.983634	0.4450486	1.668086	1.903194	2.284054	0.615968

Tabla 2. Valores de tendencia y dispersión de la relación núcleo/citoplasma en las sub-líneas HCT116, HCT116/MAD2 γ , HCT116/pcDNA en respuesta a tratamiento con cisplatino.

En general es importante destacar los cambios en la dispersión de los valores de la relación núcleo/citoplasma reflejados tanto en el rango intercuartil como la desviación estándar. En el caso de todas las sub-líneas se puede observar un incremento importante en estas medidas de dispersión conforme avanza el tiempo de tratamiento. Esto habla de una población más homogénea en la condición control que responde de manera heterogénea al tratamiento con cisplatino.

5. Re-localización al núcleo de MAD2 γ en respuesta a cisplatino

Se realizaron tratamientos a las 24 y 48 horas con la misma dosis IC₂₀ a la línea celular HCT116 con una expresión transitoria de la proteína MAD2 γ -FLAG. Los tratamientos se iniciaron 24 horas posteriores a la transfección. En este caso al igual que con la isoforma MAD2 α se observó una re-localización al núcleo posterior al tratamiento con cisplatino (Figura 17). La diferencia en la localización de MAD2 γ no es tan pronunciada como la respuesta observada con la isoforma MAD2 α . Además existe una diferencia importante en el comportamiento de ambas isoformas. Al analizar núcleo/citoplasma de MAD2 γ a pesar de existir una relocalización nuclear frente a tratamiento con cisplatino, no hay diferencias en la proporción nuclear de MAD2 γ entre las 24 y 48 horas de tratamiento. (Figura 18).

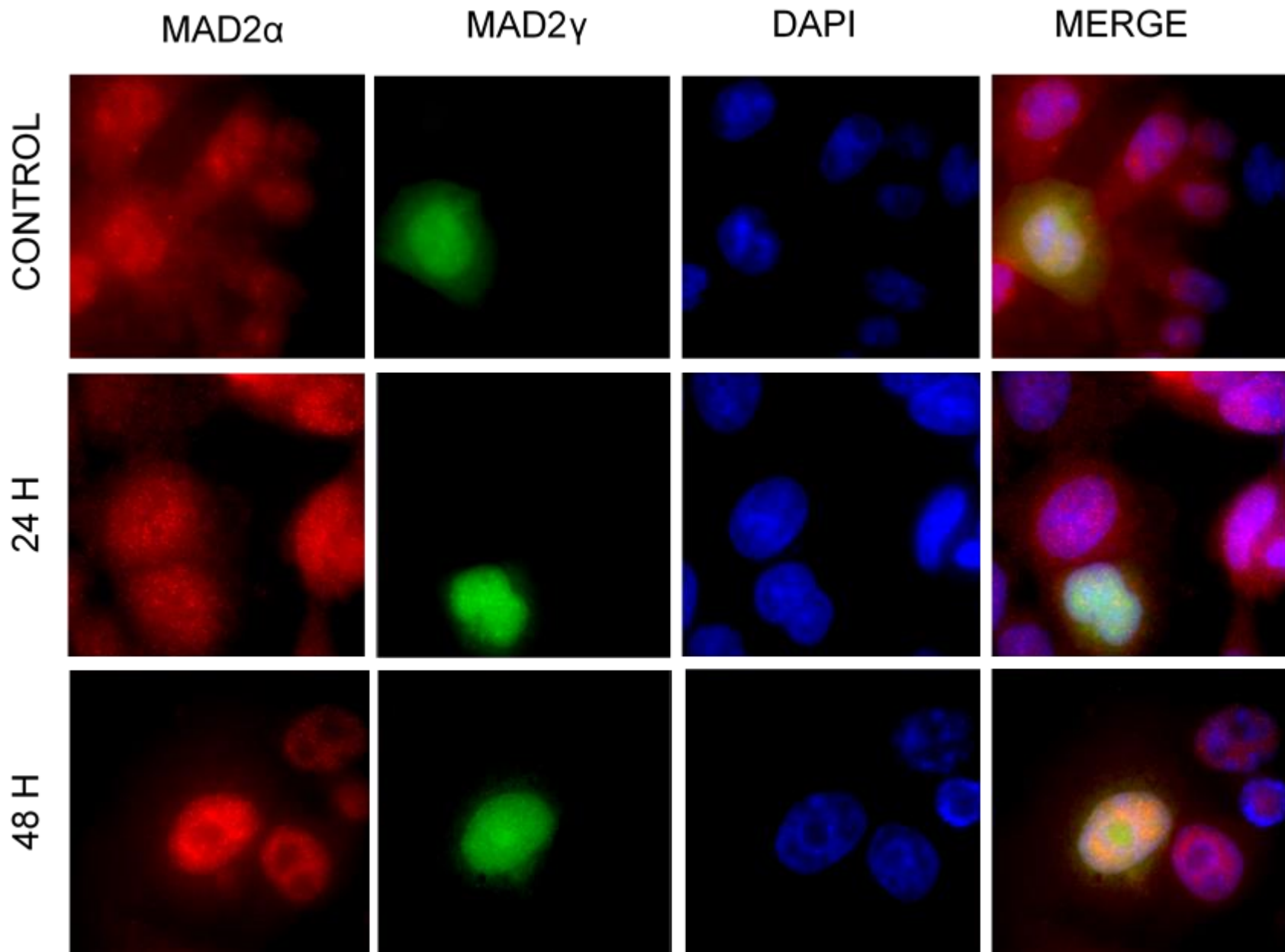


Figura 17. Localización intracelular de isoforma MAD2 α y MAD2 γ en respuesta a cisplatino. Inmunofluorescencia doble utilizando anticuerpos contra MAD2 (rojo) y FLAG (verde) en la línea celular HCT116 transfectada con MAD2 γ -FLAG. Se analizaron los cambios en relación núcleo/citoplasma a las 24 y 48 horas. Se ve una relocalización de ambas isoformas al núcleo, particularmente en el caso de MAD2 α

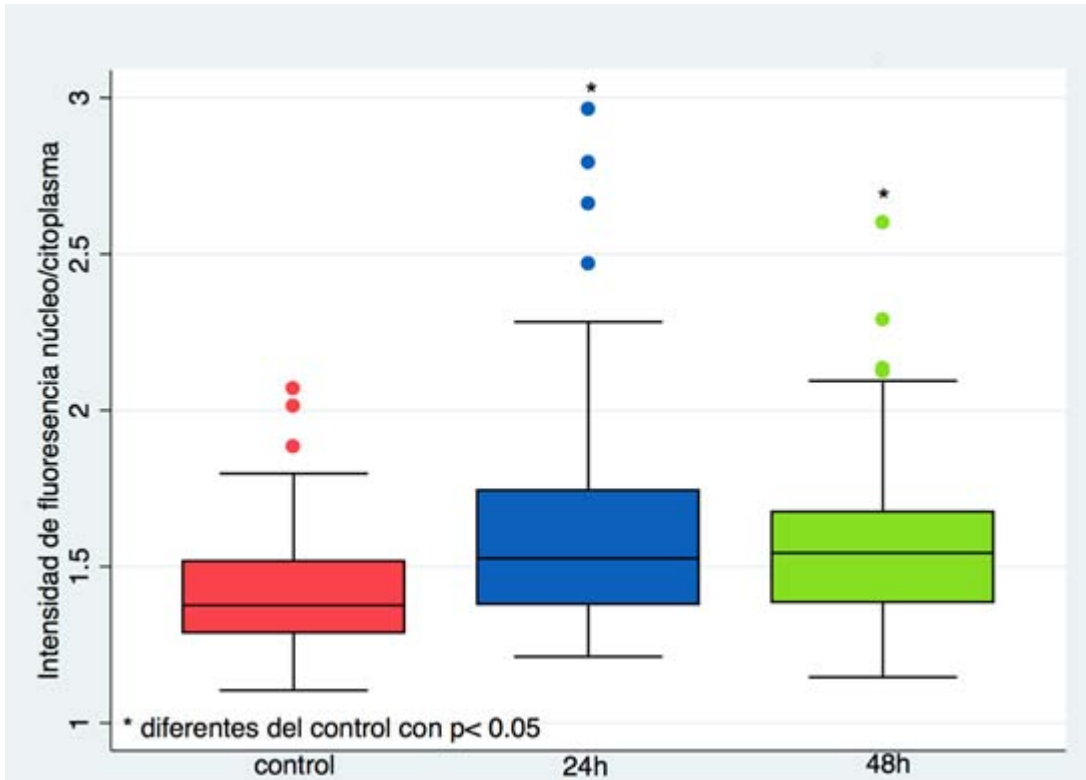


Figura 18. Localización intracelular de MAD2 γ en respuesta a cisplatino. Para comparar entre tiempos de tratamiento se obtuvo una relación núcleo/citoplasma, dividiendo la intensidad promedio de la señal de FITC en núcleo/ la intensidad promedio en citoplasma. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control y ambos tiempos de tratamiento

Existe un incremento evidente en la variación de la relación núcleo/citoplasma de MAD2 γ al tratar con cisplatino, reflejado tanto en el rango intercuartil como en la desviación estándar. Estos valores son mayores a las 24 horas, indicando que es en este tiempo de tratamiento en donde se observa la mayor variabilidad entre la población celular (Tabla 3).

Tiempo	Media	Desviación estándar	Primer cuartil	Mediana	Tercer cuartil	Rango intercuartil
Control	1.417594	0.1754176	1.285894	1.37657	1.519256	0.233362
24 horas	1.593863	0.2988904	1.378044	1.526713	1.743324	0.36528
48 horas	1.558492	0.2508219	1.384352	1.543949	1.677261	0.292909

Tabla 3. Valores de tendencia y dispersión de la relación núcleo/citoplasma de MAD2 γ en la línea HCT116 transfectada con MAD2 γ -FLAG en respuesta a tratamiento con cisplatino.

6. Localización de MAD2 α en células que sobre-expresan MAD2 γ

En las mismas células transfectadas con MAD2 γ -FLAG, se analizó la localización de la proteína MAD2 α (Figura 17). Se determinó la relación núcleo/citoplasma para los dos tiempos de tratamiento y el control, únicamente en las células que presentaban señal del anticuerpo anti-FLAG (Figura 19).

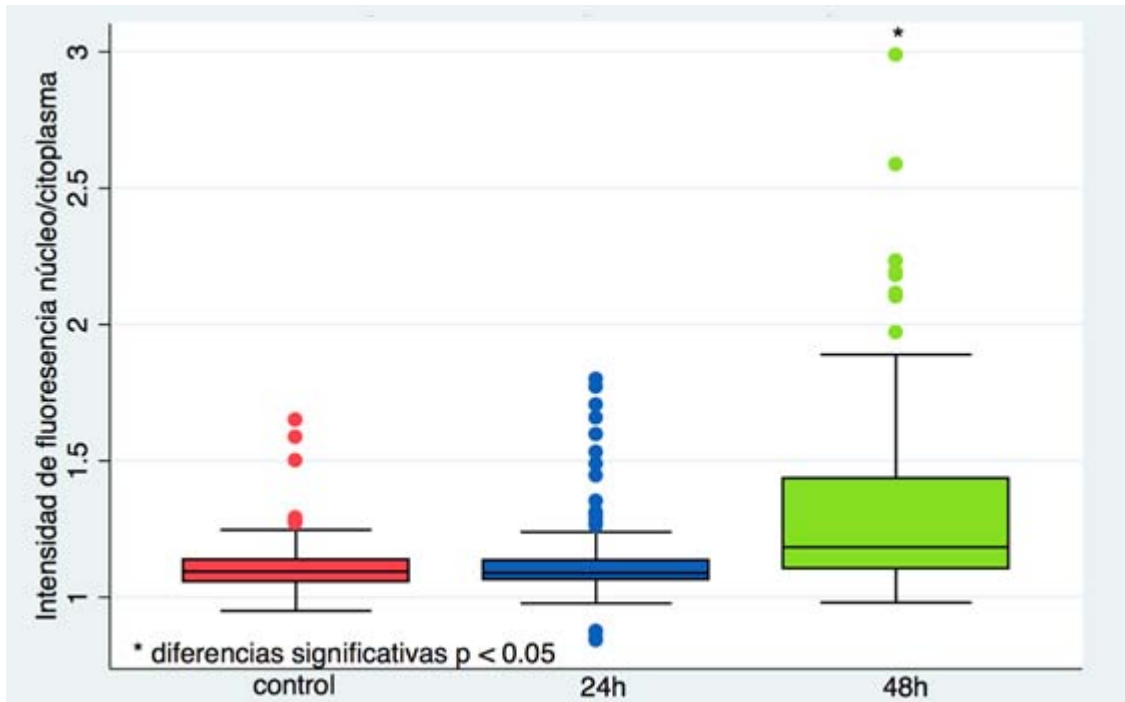


Figura 19. Localización intracelular de MAD2 α en células que sobre-expresan MAD2 γ . Relación núcleo/citoplasma de MAD2 α en células con señal del anticuerpo anti-FLAG. Se observa un incremento significativo únicamente a las 48 horas de tratamiento.

En estas células se observa un cambio a las 48 horas de tratamiento; sin embargo, no hay diferencias en la localización de MAD2 γ a las 24 horas con respecto al control. Además se graficaron las relaciones núcleo/citoplasma de MAD2 γ contra MAD2 α (Figura 20). Al hacer esto se observó que la proporción nuclear de ambas isoformas parece no tener asociación en condiciones control. De la misma manera a las 24 horas se observa el aumento de la señal de MAD2 γ en el núcleo, pero la relocalización de la isoforma MAD2 α es mucho menor, por lo que parece que no hay asociación entre estas isoformas. A las 48 horas se observa el aumento de ambas isoformas, mostrando un grupo de células en donde la relación núcleo/citoplasma de ambas isoformas se comporta de manera parecida. Estos resultados coinciden con la observación hecha en las sub-líneas celulares, en donde

a las 48 h pero no las 24 h la sobre-expresión de MAD2 γ , y aumentaba la localización nuclear de MAD2 α de manera significativa.

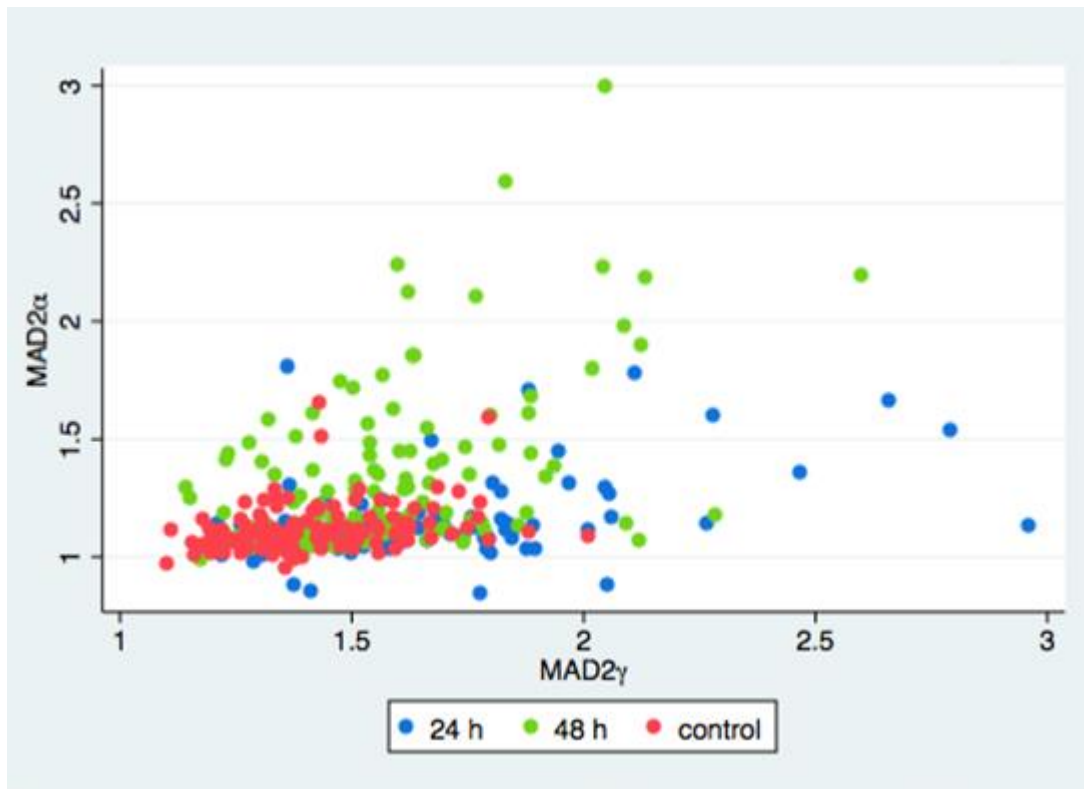


Figura 20. Localización nuclear de MAD2 γ contra MAD2 α . Al graficar las relaciones núcleo/citoplasma de MAD2 α contra MAD2 γ no se observa una asociación en las condiciones control y a las 24 horas. A las 48 horas hay un aumento similar de ambas isoformas en el área nuclear de células individuales.

Discusión

Existen reportes contradictorios sobre la localización intracelular de MAD2. Se ha hablado de una localización exclusivamente nuclear^{55,64,68,74}, exclusivamente citoplasmática^{59,65,80} o una distribución tanto nuclear como citoplasmática^{62,67,79} y la localización diferencial de MAD2 se ha asociado a variedad de factores como el tipo de tejido, el grado de diferenciación o la resistencia a fármacos^{56,59,64,76,79,80}. Es importante mencionar que estudios anteriores no toman en consideración distintas isoformas de MAD2. En este trabajo se reporta una localización de MAD2 α tanto en núcleo como en citoplasma, con una presencia mayor en el núcleo, esta coincide con reportes anteriores en cáncer gástrico⁵⁶, osteosarcomas⁶⁶ y tumores de células germinales de testículo^{59,67}. De manera importante, en este trabajo se reporta una localización constante en el núcleo de la isoforma MAD2 γ y una presencia más variada en el citoplasma. Sería interesante estudiar si esta localización similar está determinada por los mismos factores y mecanismos, o la localización de ambas isoformas es completamente independiente.

En estudios previos, la importancia de la localización nuclear de MAD2 se ha evidenciado al relacionar un decremento en los niveles nucleares de MAD2 con una disminución en la supervivencia libre de enfermedad⁶⁴ y el aumento de metástasis a hígado en cáncer gástrico⁵⁶. También se ha reportado una mayor presencia de MAD2 en citoplasma de tejidos cancerosos comparados con tejidos normales^{54,59,65,66,76}, lo cual podría indicar una deslocalización de MAD2 en cáncer así como la importancia de su presencia en núcleo.

Es interesante haber encontrado una mayor proporción nuclear de MAD2 α en la línea HCT116/MAD2 γ en comparación a las líneas HCT116 y HCT116/pcDNA a pesar de que el cambio es muy pequeño. Es importante recalcar que aunque en niveles mucho menores, existe una expresión endógena de MAD2 γ en la línea celular HCT116, por lo que sería interesante ver si la sobre-expresión de MAD2 γ en una línea celular sin expresión endógena de ésta tendría un mayor efecto en el cambio de localización de MAD2 α . De igual manera sería importante ver si el

silenciamiento en la expresión de MAD2 γ en HCT116 tendría un efecto contrario, reduciendo la proporción de MAD2 α en el núcleo. Esto aportaría mayor evidencia al papel de MAD2 γ en la localización de MAD2 α .

Un resultado importante fue el incremento en la proporción nuclear de MAD2 α al tratar a la línea celular HCT116, así como las sub-líneas transfectadas de manera estable con dosis sub-letales de cisplatino. Este cambio fue evidente a las 24 horas de tratamiento, sin embargo fue aún mayor a las 48 horas. Estos resultados están indicando una respuesta dependiente del tiempo en la localización de la isoforma MAD2 α , en donde el cisplatino está teniendo un efecto en esta localización a tiempos prolongados. Esto podría indicar un papel de MAD2 α en la reparación de daño secundario generado por cisplatino, como DSB.

El tratamiento con cisplatino genera daño principalmente a través de la formación de aductos en el DNA¹⁰², sin embargo se ha visto que defectos en la reparación correcta de estos lleva a la generación de DSB y arresto prolongado en G2/M¹⁰⁴. Estudios anteriores han destacado la importancia de MAD2 en la reparación de DSB tanto de manera dependiente como independiente del SAC^{87,89–91,94}, por lo que esto podría proporcionar un enlace entre los mecanismos de resistencia a cisplatino y el papel de la relocalización de MAD2 al núcleo. Sería importante observar los efectos de tratamiento con cisplatino a tiempos más cortos, ya que una relocalización de MAD2 a estos tiempos podría también indicar una participación en la respuesta a la generación de aductos. Esto es de particular importancia ya que se ha visto la interacción directa de MAD2 con las proteínas de reparación de la vía NER XPD y ERCC1⁵⁶. La vía NER es la principal responsable de la respuesta temprana a los daños producidos por la formación de aductos en respuesta a cisplatino.

A pesar de una distribución de MAD2 α muy similar en todas las células en condiciones sin tratamiento, llama la atención el incremento en la variabilidad de este patrón al tratar con cisplatino. Esta variación es particularmente evidente después de 24 horas de tratamiento, cuando algunas células muestran una señal de MAD2 α muy incrementada en el núcleo y otras incluso muestran una disminución. Sería muy interesante explorar si esta variabilidad en la localización de

MAD2 α pudiera estar relacionada con distintos niveles de daño al DNA experimentados individualmente en cada célula.

Varios autores proponen que es necesario el arresto mediado por MAD2 para contender con daño al DNA^{87,89,93,94}, este arresto se da en la fase G2/M en la cual las células han duplicado su material genético. Interesantemente, en las sub-líneas estudiadas se observa un incremento en el tamaño del núcleo, particularmente a las 48 horas lo que podría sugerir un arresto en esta fase. Sería importante realizar estudios adicionales analizando el contenido genético de estas células que pudieran determinar si en verdad se está observando un arresto en esta fase.

La isoforma MAD2 γ , también muestra una relocalización nuclear importante en respuesta a tratamiento con cisplatino. Al igual que la isoforma tipo, esta isoforma presenta cambios importantes en su patrón de distribución celular a las 24 horas pero a diferencia de ésta, los cambios en este patrón no se incrementan a las 48 horas. Esto podría ser una indicación de mecanismos distintos por los cuales ambas isoformas se están reclutando al núcleo, sin embargo, es importante descartar que este efecto se esté viendo por una disminución en la expresión de MAD2 γ -FLAG, ya que se trabajó con una transfección transitoria. Una transfección estable sería una perspectiva importante del proyecto, ya que no solo ayudaría a descartar que esté sucediendo este fenómeno, sino ayudaría a determinar si la heterogeneidad en la localización celular dentro de la población celular es un efecto de una localización poco precisa de esta isoforma o se está viendo afectada por sus niveles de expresión.

El comportamiento de MAD2 α en las células que sobre-expresan a MAD2 γ de manera transitoria resulta muy interesante. La localización de MAD2 en estas células presenta algunas diferencias con la observada anteriormente en las sub-línea celular que sobre-expresan a MAD2 γ , sin embargo este efecto podría ser atribuido a la inmunofluorescencia doble. Aun así al comparar la relación núcleo/citoplasma en estas células en distintos tiempos de tratamiento con cisplatino, se observó una relocalización al núcleo de MAD2 α únicamente a las 48 horas y no a las 24 horas. Estos resultados son congruentes con la observación en

la línea HCT116/MAD2 γ en donde ésta presentaba diferencias significativas en la relación núcleo/citoplasma de MAD2 α en comparación a las otras dos sub-líneas a las 48 horas pero no a las 24 horas. La asociación entre la proporción nuclear de MAD2 α y MAD2 γ también es más evidente a las 48 horas, mientras que a las 24 horas como en el control, esta asociación es mínima. En conjunto estos resultados hablan de un efecto importante de la sobre-expresión de MAD2 γ en la localización de MAD2 α únicamente a tiempos de tratamiento muy prolongados.

Interesantemente se ha reportado que una construcción MAD2 Δ C la cual no cuenta con los 10 aminoácidos carboxilo-terminal, es capaz de inhibir la función de MAD2 en el SAC ya que estos aminoácidos son requeridos para la unión de esta proteína con cdc20^{50,105,106}. Sin embargo, esta construcción era capaz de unir el complejo MAD1-MAD2, y crear un complejo inútil y de esta forma tener un efecto dominante sobre la función del SAC⁵⁰. De manera aun más interesante, se ha observado que la sobre-expresión de esta mutante, MAD2 Δ C, es capaz de contrarrestar la activación de la vía MEK/ERK que ocurre en respuesta a cisplatino en líneas de cáncer testicular¹⁰⁶. La activación de esta vía es capaz de mediar la sensibilidad a cisplatino, por lo que la sobre-expresión de la construcción trunca de MAD2 tiene un efecto sobre la respuesta a cisplatino. Estudios con esta mutante son altamente relevantes ya que el extremo carboxilo terminal de MAD2 no está presente en la isoforma MAD2 γ .

Podríamos pensar en una situación similar al hablar de la isoforma MAD2 γ , en donde ésta sea capaz de conservar algunas de sus interacciones mediante el extremo amino terminal, sin poder llevar a cabo las funciones de MAD2 α de manera efectiva. Esto podría proveer una explicación a los resultados observados en este trabajo, en donde ambas isoformas pudieran estarse reclutando al núcleo en respuesta a daño al DNA. MAD2 γ pudiera conservar algunas interacciones con proteínas importantes en los mecanismos involucrados en la respuesta de MAD2 a cisplatino, sin embargo, al ser una versión trunca de la proteína no puede llevar a cabo las mismas funciones de reparación o arresto que MAD2 α . Al persistir el daño,

eventualmente se observará una acumulación nuclear de MAD2 α , en niveles superiores a las líneas celulares que no sobre-expresan MAD2 γ .

Faltan muchos estudios para poder determinar si este fenómeno está presente dentro de la célula, a futuro sería de suma importancia establecer la capacidad de interacción de ambas isoformas con diversas proteínas involucradas en mecanismos de reparación de daño al DNA. Se podría evaluar también el efecto de la sobre-expresión de ambas isoformas y ver si al incrementar la presencia de MAD2 α se reduce el efecto de la sobre-expresión de MAD2 γ . Es importante recordar también la existencia de una tercera isoforma MAD2 β , cuyo efecto en la resistencia a cisplatino no se ha estudiado.

Conclusiones

Se determinó que la localización de la isoforma MAD2 γ es principalmente nuclear, con una presencia citoplasmática variable de una célula a otra. MAD2 α presentó una localización más homogénea dentro de la población celular, encontrándola tanto en núcleo como en el citoplasma, con una mayor concentración de la proteína en el núcleo. Además la línea celular HCT116/MAD2 γ que sobre-expresa a la isoforma MAD2 γ , presenta una relación núcleo/citoplasma de la isoforma MAD2 α ligeramente mayor que las líneas HCT116 y HCT116/pcDNA. Por lo que esta isoforma podría estar contribuyendo en alguna medida en la determinación de la localización de MAD2 α .

Ambas isoformas aumentaron su localización nuclear en respuesta a cisplatino. La proporción nuclear de MAD2 α aumentó a las 24 horas con respecto al control, y este efecto aumentó a las 48 horas. La línea HCT116/MAD2 γ mostró una relación núcleo/citoplasma mayor que las otras dos líneas a las 48 h, pero no a las 24 horas. Indicando la importancia de la sobre-expresión de MAD2 γ a tiempos prolongados. La variación en los valores de esta relación núcleo/citoplasma, incrementó con el tratamiento, viendo un incremento en variabilidad a las 24 horas, que fue aún mayor a las 48 horas, indicando una respuesta heterogénea al tratamiento con cisplatino.

La proteína MAD2 γ también mostró un incremento importante en el núcleo a las 24 horas; sin embargo, a diferencia de MAD2 α no hay diferencias entre las 24 y las 48 horas de tratamiento. Al observar el comportamiento de MAD2 α en células que sobre-expresan MAD2 γ -FLAG, se vio una diferencia en la proporción nuclear de MAD2 α únicamente a las 48 horas. De igual manera, parece no haber una asociación entre la localización nuclear de MAD2 α y MAD2 γ en condiciones sin tratamiento y después de 24 horas de tratamiento, pero si hay una ligera asociación a las 48 horas. Estos resultados concuerdan con lo observado en las sub-líneas celulares.

En este trabajo se ha determinado la localización intracelular de la proteína MAD2 γ , así como la localización intracelular de MAD2 α en líneas que sobre-expresan o no a MAD2 γ . Se estableció que la sobre-expresión de MAD2 γ puede tener un efecto en la localización de MAD2 α , especialmente en respuesta a tratamiento con cisplatino. Se estableció que existe una relocalización nuclear de ambas isoformas en respuesta a cisplatino lo que indica que ambas isoformas podrían jugar un papel en la mediación de la respuesta a cisplatino. Son necesarios más estudios para la elucidación de los mecanismos detrás de esta mediación, así como la posible interacción de ambas isoformas con proteínas de reparación del DNA. Sin embargo este trabajo apoya un posible papel de MAD2 en la respuesta a daño inducido por cisplatino e indica que la expresión de MAD2 γ es un factor importante a considerar en su estudio.

Referencias

1. Alberts, B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell*. (Garland Sciences, 2008).
2. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. & Berneman, Z. N. The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **36**, 131–149 (2003).
3. Schafer, K. . The Cell Cycle: A Review. *Vet. Pathol.* **35**, 461–478 (1998).
4. Barr, F. a. & Gruneberg, U. Cytokinesis: Placing and Making the Final Cut. *Cell* **131**, 847–860 (2007).
5. Sible, J. C., Tyson, J. J. & Novák, B. Checkpoints in the Cell Cycle. *Encycl. Life Sci.* 1–8 (2002). doi:10.1038/npg.els.0001355
6. Bloom, J. & Cross, F. R. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 149–160 (2007).
7. Skowyra, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J. & Harper, J. W. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**, 209–219 (1997).
8. Peters, J.-M. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 644–656 (2006).
9. Lew, D. J. & Kornbluth, S. Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 795–804 (1996).
10. Besson, A., Dowdy, S. F. & Roberts, J. M. CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Dev. Cell* **14**, 159–169 (2008).
11. Hartwell, L. H. & Weinert, T. a. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**, 629–634 (1989).
12. Wang, Y. *et al.* Centrosome-associated regulators of the G(2)/M checkpoint as targets for cancer therapy. *Mol. Cancer* **8**, 8 (2009).
13. Cuddihy, A. R. & O'Connell, M. J. Cell-cycle responses to DNA damage in G2. *Int. Rev. Cytol.* **222**, 99–140 (2003).
14. Li, R. & Murray, A. W. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* **66**, 519–531 (1991).
15. Ciliberto, A. & Shah, J. V. A quantitative systems view of the spindle assembly checkpoint. *EMBO J.* **28**, 2162–2173 (2009).
16. Nasmyth, K. Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 673–745 (2001).
17. Ciosk, R. *et al.* Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Mol. Cell* **5**, 243–254 (2000).

18. Visintin, R., Prinz, S. & Amon, a. CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* **278**, 460–463 (1997).
19. Fang, G., Yu, H. & Kirschner, M. W. Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol. Cell* **2**, 163–171 (1998).
20. Sudakin, V., Chan, G. K. T. & Yen, T. J. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J. Cell Biol.* **154**, 925–936 (2001).
21. Fang, G., Yu, H. & Kirschner, M. W. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev.* **12**, 1871–1883 (1998).
22. Luo, X., Tang, Z., Rizo, J. & Yu, H. The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20. *Mol. Cell* **9**, 59–71 (2002).
23. Fava, L. L., Kaulich, M., Nigg, E. a & Santamaria, A. Probing the in vivo function of Mad1:C-Mad2 in the spindle assembly checkpoint. *EMBO J.* **30**, 3322–3336 (2011).
24. Musacchio, A. & Salmon, E. D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 379–393 (2007).
25. Shah, J. V. & Cleveland, D. W. Waiting for AnaphaseMad2 and the Spindle Assembly Checkpoint. *Cell* **103**, 997–1000 (2000).
26. Holland, A. J. & Cleveland, D. W. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 478–487 (2009).
27. Kops, G. J. P. L., Weaver, B. a a & Cleveland, D. W. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 773–785 (2005).
28. Malmanche, N., Maia, A. & Sunkel, C. E. The spindle assembly checkpoint: Preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett.* **580**, 2888–2895 (2006).
29. Jallepalli, P. V & Lengauer, C. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 109–117 (2001).
30. Thompson, S. L., Bakhoum, S. F. & Compton, D. a. Mechanisms of Chromosomal Instability. *Curr. Biol.* **20**, 285–295 (2010).
31. Cahill, D. P. *et al.* Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* **392**, 300–303 (1998).
32. Cahill, D. P. *et al.* Characterization of MAD2B and other mitotic spindle checkpoint genes. *Genomics* **58**, 181–187 (1999).
33. Hernando, E. *et al.* Molecular analyses of the mitotic checkpoint components hSMAD2, hBUB1 and hBUB3 in human cancer. *Int. J. Cancer* **95**, 223–227 (2001).

34. Yuan, B. *et al.* Increased expression of mitotic checkpoint genes in breast cancer cells with chromosomal instability. *Clin. Cancer Res.* **12**, 405–410 (2006).
35. Shichiri, M., Yoshinaga, K., Hisatomi, H., Sugihara, K. & Hirata, Y. Genetic and epigenetic inactivation of mitotic checkpoint genes hBUB1 and hBUBR1 and their relationship to survival. *Cancer Res.* **62**, 13–17 (2002).
36. Mondal, G. *et al.* Overexpression of Cdc20 leads to impairment of the spindle assembly checkpoint and aneuploidization in oral cancer. *Carcinogenesis* **28**, 81–92 (2007).
37. Bièche, I. *et al.* Expression analysis of mitotic spindle checkpoint genes in breast carcinoma: role of NDC80/HEC1 in early breast tumorigenicity, and a two-gene signature for aneuploidy. *Mol. Cancer* **10**, 23 (2011).
38. Iwanaga, Y. *et al.* Heterozygous deletion of mitotic arrest-deficient protein 1 (MAD1) increases the incidence of tumors in mice. *Cancer Res.* **67**, 160–166 (2007).
39. Michel, L. S. *et al.* MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* **409**, 355–359 (2001).
40. Rao, C. V *et al.* Colonic tumorigenesis in BubR1+/-ApcMin/+ compound mutant mice is linked to premature separation of sister chromatids and enhanced genomic instability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4365–4370 (2005).
41. Babu, J. R. *et al.* Rae1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation. *J. Cell Biol.* **160**, 341–353 (2003).
42. Kops, G. J. P. L., Foltz, D. R. & Cleveland, D. W. Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8699–8704 (2004).
43. Michel, L. *et al.* Complete loss of the tumor suppressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4459–4464 (2004).
44. Yamamoto, Y. *et al.* Overexpression of BUBR1 is associated with chromosomal instability in bladder cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* **174**, 42–47 (2007).
45. Scintu, M. *et al.* Genomic instability and increased expression of BUB1B and MAD2L1 genes in ductal breast carcinoma. *Cancer Lett.* **254**, 298–307 (2007).
46. Krishnan, R. *et al.* Map location and gene structure of the Homo sapiens mitotic arrest deficient 2 (MAD2L1) gene at 4q27. *Genomics* **49**, 475–478 (1998).
47. Luo, X. *et al.* Structure of the Mad2 spindle assembly checkpoint protein and its interaction with Cdc20. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 224–229 (2000).
48. Aravind, L. & Koonin, E. V. The HORMA domain: a common structural denominator in mitotic checkpoints, chromosome synapsis and DNA repair. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 284–286 (1998).

49. Muniyappa, K., Kshirsagar, R. & Ghodke, I. The HORMA domain: An evolutionarily conserved domain discovered in chromatin-associated proteins, has unanticipated diverse functions. *Gene* **545**, 194–197 (2014).
50. De Antoni, A. *et al.* The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol.* **15**, 214–225 (2005).
51. Mapelli, M., Massimiliano, L., Santaguida, S. & Musacchio, A. The Mad2 Conformational Dimer: Structure and Implications for the Spindle Assembly Checkpoint. *Cell* **131**, 730–743 (2007).
52. Luo, X. & Yu, H. Mitosis: Short-circuiting spindle checkpoint signaling. *Curr. Biol.* **22**, R128–R130 (2012).
53. Wu, C. W., Chi, C. W. & Huang, T. S. Elevated level of spindle checkpoint protein MAD2 correlates with cellular mitotic arrest, but not with aneuploidy and clinicopathological characteristics in gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* **10**, 3240–3244 (2004).
54. Tanaka, K. *et al.* Mitotic checkpoint protein hSMAD2 as a marker predicting liver metastasis of human gastric cancers. *Jpn. J. Cancer Res.* **92**, 952–958 (2001).
55. Morishita, M. *et al.* Expression of mitotic-arrest deficiency 2 predicts the efficacy of neoadjuvant chemotherapy for locally advanced uterine cervical cancer. *Exp. Ther. Med.* **3**, 341–346 (2012).
56. Wang, L. *et al.* MAD2 as a key component of mitotic checkpoint: A probable prognostic factor for gastric cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* **131**, 793–801 (2009).
57. Li, G.-Q., Li, H. & Zhang, H.-F. Mad2 and p53 expression profiles in colorectal cancer and its clinical significance. *World J. Gastroenterol.* **9**, 1972–1975 (2003).
58. Li, G.-Q. & Zhang, H.-F. Mad2 and p27 expression profiles in colorectal cancer and its clinical significance. *World J. Gastroenterol.* **10**, 3218–3220 (2004).
59. Fung, M. K.-L. *et al.* MAD2 expression and its significance in mitotic checkpoint control in testicular germ cell tumour. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 821–832 (2007).
60. Hisaoka, M., Matsuyama, A. & Hashimoto, H. Aberrant MAD2 expression in soft-tissue sarcoma. *Pathol. Int.* **58**, 329–333 (2008).
61. Sze, K. M. F., Ching, Y. P., Jin, D. Y. & Ng, I. O. L. Association of MAD2 expression with mitotic checkpoint competence in hepatoma cells. *J. Biomed. Sci.* **11**, 920–927 (2004).
62. Pinto, M. *et al.* Expression changes of the MAD mitotic checkpoint gene family in renal cell carcinomas characterized by numerical chromosome changes. *Virchows Arch.* **450**, 379–385 (2007).
63. Wang, X., Jin, D., Ng, R. W. M., Cells, C. & Tsao, S. W. Significance of MAD2 Expression to Mitotic Checkpoint Control in Ovarian Cancer Cells Significance of MAD2 Expression to Mitotic Checkpoint Control in Ovarian. *Cancer Res.* **3**, 1662–1668 (2002).

64. McGrogan, B. *et al.* Spindle assembly checkpoint protein expression correlates with cellular proliferation and shorter time to recurrence in ovarian cancer. *Hum. Pathol.* **45**, 1509–1519 (2014).
65. Park, P. E., Jeong, J. Y., Kim, S. Z. & Park, J. Y. MAD2 expression in ovarian carcinoma: Different expression patterns and levels among various types of ovarian carcinoma and its prognostic significance in high-grade serous carcinoma. *Korean J. Pathol.* **47**, 418–425 (2013).
66. Yu, L., Guo, W. C., Zhao, S. H., Tang, J. & Chen, J. L. Mitotic arrest defective protein 2 expression abnormality and its clinicopathologic significance in human osteosarcoma. *Apmis* **118**, 222–229 (2010).
67. Burum-Auensen, E. *et al.* Spindle proteins are differentially expressed in the various histological subtypes of testicular germ cell tumors. *J. Carcinog.* **9**, 1 (2010).
68. Furlong, F. *et al.* Low MAD2 expression levels associate with reduced progression-free survival in patients with high-grade serous epithelial ovarian cancer. *J. Pathol.* **226**, 746–755 (2012).
69. Tanaka, K. *et al.* Mitotic Checkpoint Genes, hsMAD2 and BubR1, in Oesophageal Squamous Cancer Cells and their Association with 5-fluorouracil and Cisplatin-based Radiochemotherapy. *Clin. Oncol.* **20**, 639–646 (2008).
70. Wang, X. *et al.* Correlation of defective mitotic checkpoint with aberrantly reduced expression of MAD2 protein in nasopharyngeal carcinoma cells. *Carcinogenesis* **21**, 2293–2297 (2000).
71. Zhang, S. H. *et al.* Clinicopathologic significance of mitotic arrest defective protein 2 overexpression in hepatocellular carcinoma. *Hum. Pathol.* **39**, 1827–1834 (2008).
72. Díaz-Rodríguez, E. *et al.* Deficient spindle assembly checkpoint in multiple myeloma. *PLoS One* **6**, (2011).
73. Cheung, H. W. *et al.* Mitotic arrest deficient 2 expression induces chemosensitization to a DNA-damaging agent, cisplatin, in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Res.* **65**, 1450–1458 (2005).
74. Nakano, Y. *et al.* Expression of the mitotic-arrest deficiency 2 is associated with chemotherapy resistance in ovarian serous adenocarcinoma. *Oncol. Rep.* **28**, 1200–1204 (2012).
75. Hui, L. *et al.* Identification of alternatively spliced mRNA variants related to cancers by genome-wide ESTs alignment. *Oncogene* **23**, 3013–3023 (2004).
76. Pati, D. *et al.* Hormone-induced chromosomal instability in p53-null mammary epithelium. *Cancer Res.* **64**, 5608–5616 (2004).
77. Sotillo, R. *et al.* Mad2 Overexpression Promotes Aneuploidy and Tumorigenesis in Mice. *Cancer Cell* **11**, 9–23 (2007).
78. Campbell, M. S., Chan, G. K. & Yen, T. J. Mitotic checkpoint proteins HsMAD1 and HsMAD2 are associated with nuclear pore complexes in interphase. *J. Cell Sci.* **114**, 953–963 (2001).

79. Burum-Auensen, E. *et al.* Subcellular localization of the spindle proteins Aurora A, Mad2, and BUBR1 assessed by immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* **55**, 477–486 (2007).
80. Kasai, T., Iwanaga, Y., Iha, H. & Jeang, K. T. Prevalent loss of mitotic spindle checkpoint in adult T-cell leukemia confers resistance to microtubule inhibitors. *J. Biol. Chem.* **277**, 5187–5193 (2002).
81. Ren, J. *et al.* FAT10 plays a role in the regulation of chromosomal stability. *J. Biol. Chem.* **281**, 11413–11421 (2006).
82. Ito, S. *et al.* Mad2 is required for optimal hematopoiesis: Mad2 associates with c-Kit in MO7e cells. *Blood* **109**, 1923–1930 (2007).
83. O'Neill, T. J., Zhu, Y. & Gustafson, T. a. Interaction of MAD2 with the carboxyl terminus of the insulin receptor but not with the IGFIR: Evidence for release from the insulin receptor after activation. *J. Biol. Chem.* **272**, 10035–10040 (1997).
84. Poelzl, G. *et al.* Specific association of estrogen receptor beta with the cell cycle spindle assembly checkpoint protein, MAD2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 2836–2839 (2000).
85. Takeda, M., Dohmae, N., Takio, K., Arai, K. I. & Watanabe, S. Cell Cycle-dependent Interaction of Mad2 with Conserved Box1/2 Region of Human Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor Receptor Common ??c. *J. Biol. Chem.* **276**, 41803–41809 (2001).
86. Nelson, K. K., Schlondorff, J. & Blobel, C. P. Evidence for an interaction of the metalloprotease-disintegrin tumour necrosis factor a convertase (TACE) with mitotic arrest deficient 2 (MAD2), and of the metalloprotease-disintegrin MDC9 with a novel MAD2-related protein, MAD2B. *Biochem. J.* **343**, 673–680 (1999).
87. Aylon, Y. & Kupiec, M. The Checkpoint Protein Rad24 of *Sacharomyces cerevisiae* Is Involved in Processing Double-Strand Break Ends and in Recombination Partner Choice. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6585–6596 (2003).
88. Fung, M. K. L. *et al.* MAD2 interacts with DNA repair proteins and negatively regulates DNA damage repair. *J. Mol. Biol.* **381**, 24–34 (2008).
89. Dotiwala, F., Harrison, J. C., Jain, S., Sugawara, N. & Haber, J. E. Mad2 prolongs DNA damage checkpoint arrest caused by a double-strand break via a centromere-dependent mechanism. *Curr. Biol.* **29**, 997–1003 (2012).
90. Eliezer, Y., Argaman, L., Kornowski, M., Roniger, M. & Goldberg, M. Interplay between the DNA damage proteins MDC1 and ATM in the regulation of the spindle assembly checkpoint. *J. Biol. Chem.* **289**, 8182–8193 (2014).
91. Lawrence, K. S., Chau, T. & Engebrecht, J. DNA Damage Response and Spindle Assembly Checkpoint Function throughout the Cell Cycle to Ensure Genomic Integrity. *PLOS Genet.* **11**, e1005150 (2015).
92. Chilà, R., Celenza, C., Lupi, M., Damia, G. & Carassa, L. Chk1-Mad2 interaction A crosslink between the DNA damage checkpoint and the mitotic spindle checkpoin. *Cell Cycle* **12**, 1083–1090 (2013).

93. Garber, P. M. & Rine, J. Overlapping roles of the spindle assembly and DNA damage checkpoints in the cell-cycle response to altered chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **161**, 521–534 (2002).
94. Maringele, L. & Lydall, D. EXO1-dependent single-stranded DNA at telomeres activates subsets of DNA damage and spindle checkpoint pathways in budding yeast *yku70??* mutants. *Genes Dev.* **16**, 1919–1933 (2002).
95. Harrison, J. C. & Haber, J. E. Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 209–235 (2006).
96. Yin, F. *et al.* Mad2??, an alternative variant of Mad2 reducing mitotic arrest and apoptosis induced by adriamycin in gastric cancer cells. *Life Sci.* **78**, 1277–1286 (2006).
97. Leoni, G., Le Pera, L., Ferrè, F., Raimondo, D. & Tramontano, A. Coding potential of the products of alternative splicing in human. *Genome Biol.* **12**, R9 (2011).
98. Xu, Q. & Lee, C. Discovery of novel splice forms and functional analysis of cancer-specific alternative splicing in human expressed sequences. *Nucleic Acids Res.* **31**, 5635–5643 (2003).
99. López-Saavedra, A. & Herrera, L. a. The role of alternative mRNA splicing in chromosome instability. *Mutat. Res.* **705**, 246–251 (2010).
100. Kalniņa, Z., Zayakin, P., Siliņa, K. & Line, A. Alterations of pre-mRNA splicing in cancer. *Genes Chromosom. Cancer* **42**, 342–357 (2005).
101. Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**, 623–627 (1997).
102. Dasari, S. & Bernard Tchounwou, P. Cisplatin in Cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* **740**, 364–378 (2014).
103. Siddik, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**, 7265–7279 (2003).
104. Brozovic, A. *et al.* Cisplatin sensitivity is related to late DNA damage processing and checkpoint control rather than to the early DNA damage response. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **670**, 32–41 (2009).
105. Canman, J. C., Salmon, E. D. & Fang, G. Inducing precocious anaphase in cultured mammalian cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **52**, 61–65 (2002).
106. Fung, M. K. L. *et al.* Role of MEK/ERK pathway in the MAD2-mediated cisplatin sensitivity in testicular germ cell tumour cells. *Br. J. Cancer* **95**, 475–484 (2006).
107. Wassmann, K., Liberal, V. & Benezra, R. Mad2 phosphorylation regulates its association with Mad1 and the APC/C. *EMBO J.* **22**, 797–806 (2003).

APÉNDICE A-Construcción del vector MAD2γ-FLAG.

Se partió de la digestión de los plásmidos MAD2-FLAG (Addgene plasmid # 16047, VL3 (Flag-Mad2), from Dr. Robert Benezra's Laboratory)¹⁰⁷ y MAD2γ-pcDNA. Las digestiones se llevaron a cabo utilizando las enzimas HindIII (Invitrogen 15207-020) y BamHI (15201-031).

Primero se realizó la digestión de ambos plásmidos con HindIII según la siguiente tabla:

Reactivo	Volumen
Agua	***
Buffer (React2, Y92500 Invitrogen)	2µl
Plásmido	***
Enzima HindIII	0.5µl
Volumen final	20µl

*** se utilizaron 500ng de plásmido por reacción y 8 reacciones por plásmido para un total de 4µg, se ajustó el agua para un volumen final de 20µl.

Esta reacción se incubó 3 horas a 37 grados. Posteriormente se adicionó **1.1µl de NaCl 1M** y **0.5µl** de enzima **BamHI**. Esta reacción permaneció otras 3 horas a 37 grados.

Los productos de la digestión se corrieron en geles de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 2% para su purificación con el kit de purificación por perlas QIAEXII (QIAGEN 20021). Es importante extremar precauciones en este paso para maximizar rendimiento. Se debe lavar TODO, incluyendo cámara, molde y peines con agua bidestilada y un poco de jabón enjuagando muy bien con agua bidestilada. Además se preparó buffer y agarosa nuevos para correr el gel.

Los geles se pre-corrieron por 10 minutos a 70V.

Se corrieron los 20µl de la reacción con 2µl de buffer de carga 10 X marca Invitrogen. Los geles se corrieron a 90 V por 1 hora en buffer TBE al 0.5X. Las bandas se cortaron utilizando navajas estériles y las bandas se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5ml (la banda de una digestión por tubo), para utilizarse según el protocolo indicado en el manual del kit QIAEXII.

Durante este protocolo es importante seguir las siguientes recomendaciones y modificaciones:

- Al cortar la banda es importante tratar de mantener el tamaño de esta a un mínimo, sin conservar un exceso de agarosa, sin embargo se debe procurar mantener a un mínimo el tiempo de exposición a luz UV.
- En el paso 4, se utilizó el termoblock a una temperatura de 50°C con 30 segundos de agitación máxima, cada minuto, por 10 minutos.
- El paso 5 es un paso crítico y se debe tener **mucho cuidado** de no perturbar el pellet de perlas, para esto se debe comenzar a tomar el sobrenadante desde la parte superior del tubo, posicionando el pellet del lado contrario al que se inserta la pipeta. Se recomienda sostener el tubo

de manera inclinada y a contraluz. Se debe pipetear lentamente, y el volumen final se debe de remover con una pipeta de 20µl. Es preferible dejar un poco de sobrenadante a que llevarse material.

- La elución (paso 9) se realizó utilizando 20µl de **buffer EB** a 50°C por 5 minutos.
- Se realizaron todos los pasos opcionales
- Además se realizó un paso adicional en donde se centrifugaron todos los tubos a 18,000 rpm por 1 minuto para remover cualquier partícula. Posteriormente se juntaron todos los sobrenadantes para cada muestra y se evaporaron en el speedback a un volumen de 15µl.

La cuantificación se hizo utilizando el nanodrop. Es importante mencionar la presencia de un pico a 230 (este pico aparece casi siempre al purificar con este kit). Sin embargo también se encontró un pico visible a 260.

La reacción de ligación se llevó acabo de la siguiente manera:

Reactivo	Volumen
Vector (FLAG)	14.8µl (222 ng)
Inserto (MAD2y)	8µl (24 ng)
Agua	3.2µl
Ligasa T4 (Invitrogen 954507)	1µl
Buffer (Invitrogen 395246)	6µl
Volumen final	33µl

Estos volúmenes representan una relación vector:inserto 3.5:1

Antes de colocar la reacción se mezclaron el agua el vector y el inserto y se incubaron por 5 minutos a 65°C. Posteriormente se dejó enfriar esta mezcla, se colocó el buffer y la enzima y se dejó la reacción a 16° C por 16 horas.

El protocolo de transformación se detalla a continuación:

- Antes de comenzar, atemperar medio C (Fermentas) y cajas para plaqueo.
- Se transformó una alícuota de 100µl de bacterias dh5α, hechas competentes por RbCl₂ (*).
- Las bacterias deben de permanecer en hielo. Se mezclaron 12 µl del producto de ligación con la alícuota de bacterias, se agito MUY SUAVEMENTE con el dedo, es importante NO VORTEXEAR en este paso.
- Se incubo la mezcla en hielo por 30 minutos
- Posteriormente se colocaron las bacterias 45 segundos a 42°C y 1:30 minutos en hielo.
- Adicionar 800µl de medio C (atemperado) y agitar suavemente (sin vortexear). Estas bacterias se deben dejar una hora en agitación a 100 rpm a 37°C en tubos de 2mL acostados.
- Plaquear **100µl** en cajas LB agar con ampicilina a 100µg/mL

Para la selección de colonias se realizó un pcr de 20 colonias seleccionadas con los primers MAD2-For y MAD2 Exon1-Exon4 Rev *CTCTGGGTGCAAGAAGAAGACTC*, las condiciones fueron las siguientes:

Reactivo	Conc. Final	Volumen (1X)
Agua	-	17.55µl
Buffer (10 X)	1X	2.5µl
For	300nM	1.3µl
Rev	300nM	0.5µl
MgCl ₂	2.6mM	1.5µl
dNTP's	4µM	1.5µl
Taq	1U	0.2µl

El PCR se corrió por 28 ciclos con una temperatura de alineamiento de 61 °C

A partir de este PCR se seleccionaron colonias positivas, en la cuales se comprobó la presencia del inserto por digestión (descrita anteriormente). Fue purificado inserto de las colonias seleccionadas después de la digestión. FLAG es un plásmido de bajo número de copias por lo que el producto obtenido de minipreps no contaba con la concentración suficiente para secuenciación. Por lo tanto se purificó el plásmido utilizando el kit para Maxiprep de QIAGEN, siguiendo el protocolo para plásmidos de bajo número de copias.

El plásmido purificado se mandó a secuenciación utilizando los oligonucleótidos MAD2-For y HindIII-MAD2β-REV a continuación se presenta el producto de la secuenciación y la comparación con la secuencia de MAD2 gamma para una de las colonias. (El plásmido purificado de esta colonia es el que se utilizó en los experimentos de la tesis).

(*) Protocolo para hacer bacterias competentes:

1. Sembrar una colonia en 5 ml de medio SOB complementado con 10mM de MgSO₄
2. Crecer a 37°C toda la noche.
3. Inocular con 500 µl del cultivo anterior, 50 ml de medio **SOB** complementado.
4. Crecer a D.O de a 600nm (revisar desde las 3 horas).
5. Transferir el cultivo a tubos falcon estériles y preenfriados. Dejar 10 min en hielo y centrifugar a 2500 rpm a 4°C durante 12 minutos.
6. Decantar el sobrenadante cuidadosamente y limpiar bien el tubo. Se resuspende la pastilla suavemente en 16 ml de **TBI**.

7. Incubar 15 min en hielo. Centrifugar 1 min a 2500 rpm a 4°C
8. Eliminar el sobrenadante y resuspender en 4 ml de **TBII**.
9. Incubar 15 min en hielo y distribuir en alícuotas de 200 µl en tubos de 0.6 ml estériles.
10. Congelar directamente en nitrógeno líquido y almacenar a -80 °C

TBI

Acetato de potasio	30 mM
RbCl ₂	100 mM
CaCl ₂	10 mM
MnCl ₂	50 mM
Glicerol	15%

Ajustar pH a 5.8 con 0.2 M de Ácido Acético, esterilizar por filtración

TBII

MOPS o PIPES	10 mM
CaCl ₂	75 mM
RbCl ₂	10 mM
Glicerol	15%

Ajustar pH a 5.0 con KOH y esterilizar por filtración

SOB

Bactotripton	20g/l
Extracto de levadura	5g/l
NaCl ₂	0.5g/l

Ajustar pH a 7.5 con KOH y esterilizar en autoclave.

Secuencia del gen MAD2 gamma human:

ATGGCGCTGCAGCTCTCCCGGGAGCAGGGAATCACCCCTGCGCGGGAGCGCCGAAATCGTGGC CGAG
TTCTTCTTGCACCCAGAGAAAAGTCTCAGAAAGCTATCCAGGATGAAATCCGTTTCAGTGA

Secuencia con MAD2 FWD:

TTAGGATAATTTTCGAGATGTGG CGAGTTCTTCTTGCACCCAGAGAAAAGTCTCAGAAAGCTATCCA
GGATGAAATCCGTTTCAGTGA GGATCCCGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTG
GCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCACCAGCCTTGTCTAATAAAAATTAAGTTGCATCATTTTG
TCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTGGG

Secuencia con MAD2 β REV:

GAATCAATAATTGGCAACTAGCCCATATTAGTCATTGGTTATATAGCATAATCATATGCTATGGCC
ATTGCATACGTTGTATCTATATCATATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCCAATATGACCGCC
ATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCC
ATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCC
CCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACG
TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAG
TCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTT
ACGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTT
TTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAT
TGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAGTGTGTAATAACCC
CGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTT
AGTGAACCGTCAGAATTGATCTACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTCC ATGGCGCTG
CAGCTCTCCCGGGAGCAGGGAATCACCCCTGCGCGGGAGCGCCGAAATCGTGGC CGAGTTCTTCTTG
CACCCAGAGAAAAGTCTCAGAAAGCTCCACC

En rojo y azul se resalta la porción de la secuencia que corresponde al gen MAD2 gamma human en la muestra enviada a secuenciar.

APÉNDICE B: Transfección y sobre-expresión de MAD2 γ -FLAG

El vector de expresión MAD2 γ -FLAG se transfectó en células HCT116 utilizando el siguiente protocolo:

*Este protocolo es para placas de 6 pozos, para utilizar otro volumen, escalar directamente de los volúmenes de reactivos proporcionados.

- Sembrar 100,000 células en una pozo de una caja de 6 pozos, dejar crecer por 24 horas.
- En un tubo eppendorf de 1.5ml colocar 1ml de medio McCoy (GIBCO) sin suero ni antibiótico, añadir 2.5 μ l de plus reagent (Invitrogen 10964-021) y 1 μ g de plásmido
- Vortexear e incubar por 5 minutos, posteriormente añadir 5 μ l de lipofectamina LTX (Invitrogen 15338-100), nuevamente vortexear e incubar por 30 minutos
- Remover el medio del pozo con células para transfectar y colocar el medio de transfección (McCoy sin suero + lipofectamina + vector + plus reagent)
- Incubar por 24 horas

A las 24 horas se extrajo RNA para evaluar la sobre-expresión de MAD2 γ . En el caso de las líneas sin transfectar estas se sembraron al mismo tiempo, y se dejaron crecer por dos días. El protocolo de extracción de RNA es el siguiente:

- 1) Lisar las células utilizando 1ml de trizol (Zymo research R2050 1-200), resuspender las células lisadas en el trizol utilizando una pipeta de 1ml.
- 2) Incubar 5 min a temperatura ambiente
- 3) Agregar 0.5ml de cloroformo (J.T Baker 9180-02), mezclar vigorosamente hasta quedar turbio
- 4) Incubar 3 minutos a temperatura ambiente
- 5) Centrifugar a 12,000 g x 15 min a 4°C
- 6) Tomar la fase acuosa y pasar a un tubo nuevo. Es importante tener cuidado y pasar únicamente la fase acuosa, es preferible dejar un poco a tomar material de las otras fases.
- 7) Agregar 0.5ml de isopropanol (IBI 5735) al 100%
- 8) Incubar 10 minutos a temperatura ambiente. (Este paso se puede prolongar, e incluso se puede dejar toda la noche en frío para una mejor precipitación)
- 9) Centrifugar a 12,000 g por 10 minutos a 4°C
- 10) Decantar el sobrenadante y agregar ml de etanol al 75%
- 11) Vortexear brevemente (para despegar el pellet del tubo, tratando de no romperlo) y centrifugar a 7,500g x 15 min a 4°C
- 12) Secar el pellet, se pueden dejar boca abajo sobre un papel absorbente
- 13) Resuspender en 30 μ l de agua libre de RNAsas (este volumen puede variar dependiendo del tamaño del pellet)

14) Incubar en baño a 60°C por 15 minutos

El RNA extraído se corrió en un gel de agarosa-FA al 1.2% para ver integridad. Este gel debe ser pre-corrido por 30 minutos, se corre a 70 V. Una vez comprobada la integridad se produjo cDNA por medio de RT-PCR. Se utilizó el kit GeneAmp (Roche N808-0143) con la enzima MuLV Reverse Transcriptase, siguiendo los siguientes pasos:

- 1) Mezclar; agua, 1µg de RNA y 1µl de Oligod(T) para un volumen final de 4µl
- 2) Calentar mezcla a 65°C por 5 minutos, enfriar 2 minutos a 4°C y agregar master mix:

-Master Mix:

Reactivo	Volumen
10X buffer	2µl
MgCl ₂	4µl
d ATP	2µl
d CTP	2µl
d GTP	2µl
d TTP	2µl
Inhibidor Rnasa	1µl
Volumen final	15µl

- 3) Agregar 1µl de MuLV RT a cada tubo
- 4) Colocar Reacción en el termociclador:
 - 37°C 30 min
 - 95°C 5 min
 - 4°C ∞
- 5) Colocar RNAsa H por 30 minutos a 37°C

La sobre-expresión de MAD2γ se analizó utilizando los oligonucleótidos HindIIIMAD2-FOR *TAAGCTTCCATGGCGCTGCAGCTC* y MAD2 EXON1-EXON4-REV *CTCTGGGTGCAAGAAGAACTC*. Se analizó la expresión de actina como control, las condiciones de estos PCR fueron:

Reactivo	Actina (1X)	MAD2 γ (1X)
Buffer 10 X	2.5 μ l	2.5 μ l
MgCl ₂	1 μ l	1.3 μ l
dNTPs	0.5 μ l	0.5 μ l
For	1 μ l	1 μ l
Rev	1 μ l	1 μ l
Taq	0.2 μ l	0.2 μ l
H ₂ O	17.8 μ l	17.5 μ l
cDNA	1 μ l	1 μ l

-El PCR de actina consto de 20 ciclos con temperatura de alineamiento de 60 °C

-El PCR de MAD2 consto de 32 ciclos con temperatura de alineamiento a 65°C

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.2% a 90 V, Este se presenta en los resultados.

APÉNDICE C- Inmunofluorescencias

Todas las inmunofluorescencias se realizaron en cubreobjetos de 22 x 22 milímetros, sobre placas de 6 pozos. Los cubreobjetos fueron lavados con etanol y radiados con luz UV por 30 minutos antes de sembrar las células. (Al usar cubres previamente esterilizados en la autoclave se notaban mucho ruido al hacer las inmunofluorescencias). Los pasos son descritos en detalle para la inmunofluorecencia con MAD2 α , con las particularidades mencionadas por separado para los demás experimentos.

Inmunofluorescencia contra MAD2 α

- Se sembraron 100,000 células por pozo, las cuales se dejaron crecer por 24 horas. (A veces es necesario dejarlas mas tiempo, ya que a las 24 horas las células siguen muy redondas). Las células se resuspenden en 1 ml de medio el cual se coloca únicamente sobre el cubreobjetos y no en todo el pozo.
- Las células se prefijaron con varias gotas de formaldehído (Sigma 200-001-8) al 3.7%. (Antes de quitar el medio para evitar remover células mitóticas)
- Posteriormente se quitó el medio y se fijaron las células con formaldehído al 3.7 % por 20 minutos. (suficiente para cubrir el cubreobjetos)
- Las células se lavaron dos veces rápidas con PBS. Si es necesario parar, después del segundo lavado las células se pueden dejar en PBS a 4°C por hasta 3 días.
- Las células se permeabilizaron 15 minutos con tritón al 0.5% (a partir de este paso es importante no dejar que las células se sequen)
- Lavar 2 veces rápidas con PBS
- Bloquear 1 hora con albúmina al 5% (Fraction V, Sigma A2059). Se colocaron 100 μ l sobre el cubreobjetos, el cual se cubrió con un pedazo de parafilm. Es importante que los pedazos de parafilm sean lo más cercano posibles al tamaño del cubreobjetos, en especial es importante que no sean más grandes. También se debe procurar que no se formen burbujas.
- Remover la albúmina (SIN LAVAR) e incubar con el anticuerpo ACA, que marca centrómeros (15-235-F Antibodies Incorporated) 1:200 toda la noche a 4°C en una cámara húmeda y en obscuridad. (a partir de este paso las células deben de estar siempre en obscuridad). Para todos los anticuerpos se colocaron 30 μ l sobre los cubreobjetos cubiertos por un pedazo de parafilm.
- Realizar 4 lavados de 5 minutos en agitación con PBS.
- Colocar anticuerpo MAD2 (abcam ab97777 Lot GR2167-15) 1:200 a 4°C en cámara húmeda y en obscuridad por 24 horas.
- Realizar 4 lavados de 5 minutos en agitación con tween20 al 0.1%
- Colocar anticuerpo anti-rabbit acoplado a TRITC (Zymed 62-6119) en concentración 1:50 en obscuridad y a temperatura ambiente por 1:30 horas.
- Realizar 4 lavados de 5 minutos en agitación con tween20 al 0.1%

- Montar cubreobjetos en laminillas, previamente lavadas y dejadas a secar. Se utilizan 10 μ l de DAPI por cubreobjetos. El DAPI se utiliza en una dilución 1:4 en vectashield sin DAPI (Vector Laboratories H-1000, H-1200). Es muy importante hacer este paso muy lento, para evitar la formación de burbujas. Los cubreobjetos se pueden levantar de los pozos utilizando una aguja y pinzas delgadas. Es importante escurrir los cubreobjetos tocando su orilla contra un papel absorbente. Se debe tener mucho cuidado en poner el lado del cubreobjetos con las células hacia la laminilla.
- Una vez colocados los cubreobjetos se puede presionar con papel absorbente para remover el exceso de DAPI, las laminillas se sellan con barniz de uñas transparentes y se dejan secar en la oscuridad antes de guardarse a 4°C

Immunofluorecencia de MAD2 γ

- Se sembraron 60,000 células en cubreobjetos de 22 x 22 mm
- Después de 24 horas se transfectaron las células como descrito anteriormente. (aquí no es tan importante que las células estén completamente estiradas, pues estarán 24 horas con el medio de transfección)
- Después de 24 horas de transfección fijar y permeabilizar células de la misma manera que esta descrito para MAD2 α .
- Incubar una hora con suero normal de cabra al 5%. Colocar 100 μ l y cubrir con parafilm (descrito en inmunofluorescencia MAD2 α)
- SIN lavar remover bloqueo y colocar anticuerpo anti-FLAG (ab1259, abcam GR132258-1) en una dilución 1:1000 preparada en suero normal de cabra al 5% (30 μ l)
- Incubar toda la noche a 4°C en cámara húmeda y en oscuridad. Desde este paso las células no deben ser expuestas a la luz.
- Realizar 4 lavados de 5 minutos en agitación con PBS
- Montar como descrito anteriormente.

Immunofluorescencia doble

- Realizar todos los pasos descritos para la inmunofluorescencia contra MAD2 γ , hasta los 4 lavados posteriores al anticuerpo anti-FLAG.
- Después de estos 4 lavados, bloquear por una hora con albúmina al 5%
- Colocar anticuerpo anti-MAD2 1:200 por 24 horas en cámara húmeda y oscuridad a 4°C
- Realizar 4 lavados de 5 minutos en agitación con tween al 0.1%
- Incubar 1:30 horas con anticuerpo anti-rabbit acoplado a TRITC
- Realizar 4 lavados de 5 minutos en agitación con tween al 0.1%
- Montar como descrito anteriormente.

Tratamiento con cisplatino

Los pasos para las inmunofluorescencias con células tratadas con cisplatino son los mismos que descritos anteriormente, colocando el tratamiento 24 horas después de sembrar las células en el caso de MAD2 α y 24 horas posteriores a la transfección para MAD2 γ . La única modificación importante es la cantidad de células que se siembran al principio, comenzando con 60,000 células si no es necesario transfectar y 50,000 células si lo es. Es importante procurar que no haya una alta confluencia al colocar el tratamiento, ya que si no a la hora de realizar la inmunofluorescencia las células quedarán demasiado encimadas y la señal no será clara.