



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ESTUDIO DEL PAPEL DE LA ISOFORMA MAD2-GAMMA EN LA REGULACIÓN DE LA MITOSIS Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA EN CÁNCER

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

ALEJANDRO LÓPEZ SAAVEDRA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología y de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la tutoría del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo.

El financiamiento del trabajo fue gracias al proyecto IN208815 de PAPIIT / UNAM y al proyecto 271928 de la Red Temática, Colegio Mexicano para la Investigación del Cáncer (C-MIC, Redes Temáticas) de CONACyT.

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	VI
ANTECEDENTES.....	1
EL CICLO CELULAR.....	1
LA FASE MITÓTICA O FASE M.....	2
PUNTOS DE INSPECCIÓN EN EL CICLO CELULAR (CHECKPOINTS).....	3
EL PUNTO DE INSPECCIÓN DE LA ESTRUCTURA Y TENSIÓN DEL HUSO MITÓTICO (SAC).....	5
MAD2.....	8
OTRAS INTERACCIONES DE MAD2.....	9
MAD2, EL SAC Y LA RESPUESTA A DAÑO AL DNA.....	11
LA DESREGULACIÓN DE MAD2 EN EL CÁNCER.....	15
MAD2 Y EL EMPALME ALTERNATIVO DE EXONES.....	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	26
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVO.....	26
OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
MÉTODOS.....	27
LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO CELULAR.....	27

MUESTRAS DE TUMORES PRIMARIOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE TESTÍCULO DE CÉLULAS	
GERMINALES.....	27
EXTRACCIÓN DE RNA, RT-PCRS CUANTITATIVOS Y SEMICUANTITATIVOS	28
CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS Y TRANSFECCIONES ESTABLES	29
EVALUACIÓN DEL ÍNDICE MITÓTICO	30
ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD Y TRATAMIENTOS CON CISPLATINO	30
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT	31
INMUNOFLUORESCENCIAS	32
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
RESULTADOS	34
MAD2 γ SE EXPRESA EN DIFERENTES CULTIVOS CELULARES.....	34
LA EXPRESIÓN EXÓGENA DE MAD2 γ DISMINUYE EL ÍNDICE MITÓTICO.....	36
LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE MAD2 γ EN HCT116	38
LA EXPRESIÓN DE MAD2 γ ESTÁ ASOCIADA A LA QUIMIORRESISTENCIA A CISPLATINO EN	
PACIENTES CON CÁNCER DE DE CÉLULAS GERMINALES DE TESTÍCULO	39
LA EXPRESIÓN DE MAD2 γ INCREMENTA EN HCT116 EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON	
CISPLATINO	40
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIÓN.....	47
REFERENCIAS	48

TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. El ciclo celular.....	1
Figura 2. La fase M del ciclo celular	4
Figura 3. Los puntos de inspección del ciclo celular (Checkpoints)	5
Figura 4. El Punto de Inspección de la Estructura y Tensión del Huso Mitótico (SAC).....	7
Figura 5. MAD2 en el SAC y en la respuesta al daño al DNA	14
Tabla 1: La expresión de MAD2 y su asociación con diversos fenotipos en cáncer. Flecha roja: sobre expresión; flecha verde: subexpresión.....	20
Figura 6. La secuencia codificante de las tres isoformas de MAD2	23
Figura 7. Expresión de las isoformas de MAD2 en múltiples líneas celulares de cáncer y en cultivos primarios de fibroblastos de tejido sano.	35
Figura 8. La expresión exógena de MAD γ en la línea celular HCT116	37
Figura 9. La localización intracelular de MAD2 γ	38
Figura 10. La expresión endógena de MAD2 γ y MAD2 α en pacientes con cáncer de testículo de células germinales.....	41
Figura 11. La expresión endógena de MAD2 γ y MAD2 α en HCT116, en respuesta al tratamiento con cisplatino	42

ABREVIATURAS

SAC	Spindle Assembly Checkpoint (Punto de Inspección de la Estructura y Tensión del Huso Mitótico)
DDR	DNA Damage Response (Respuesta al daño al DNA)
MCC	Mitotic Checkpoint Complex (Complejo del Punto de Inspección de la Estructura y Tensión del Huso Mitótico)
MAD2L1	En células humanas: Mitotic Arrest Deficient 2 - Like -1
MAD2 - A	conformación abierta de MAD2
MAD2 - C	conformación cerrada de MAD2
TCGT	Tumores de células germinales de testículo
QRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y cuantitativa

ANTECEDENTES

EL CICLO CELULAR

En su libro *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*, el doctor Rudolph Ludwig Carl Virchow (1821-1902) puntualizó en 1858: *"Omnis cellula e cellula"* Todas las células vienen de células, es decir, la única manera en que una nueva célula exista es que otra célula preexistente se duplique. Específicamente en células eucariontes, todas se reproducen siguiendo una secuencia de dos eventos fundamentales, que se repite durante cada generación celular: duplicación del material genético durante la fase de síntesis (S) y posteriormente la segregación cromosómica y división celular durante la fase mitótica (M); este ciclo de duplicación y división se conoce de forma general como ciclo celular. La mayoría de estos ciclos celulares tienen además fases extras: la fase G1 (entre M y S) y la fase G2 (entre S y M), esto porque las células requieren más tiempo para duplicar su masa de proteínas y organelos de lo que toma las fases S y M (**Figuras 1 y 3**). Las fases G1, S y G2 constituyen la interfase, la cual puede durar en total de 20 a 24 h, mientras que la fase M ocurre apenas durante una 1 h.

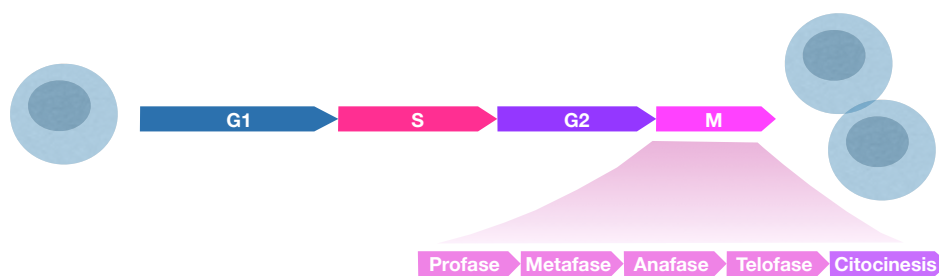


Figura 1. El ciclo celular

Una célula pasa a través de las fases G1, S y G2 durante su ciclo de vida antes de dividirse en la fase M. Después de la citocinesis, cuando la célula parental ha segregado su material genético y citoplasmático a las células hijas, estas a su vez completarán el mismo ciclo.

LA FASE MITÓTICA O FASE M

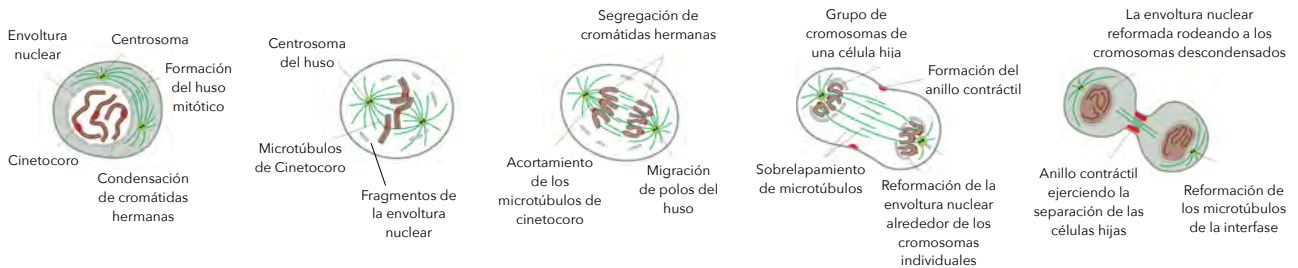
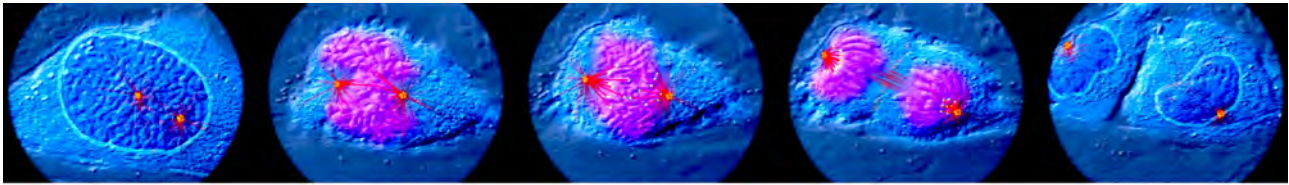
La división celular representa un breve período del ciclo celular, al cual se le conoce como fase mitótica o fase M en las células eucariontes e incluye tanto a la mitosis como a la citocinesis. La mitosis es el proceso donde cada una de las cromátidas hermanas, que componen al cromosoma replicado (previamente en la fase S), es repartida en cada uno de los dos núcleos hijos, mientras que la citocinesis es el proceso donde la célula parental se divide finalmente en dos células hijas y donde el material citoplasmático se reparte entre ambas.

Específicamente, la mitosis ocurre en cuatro etapas, no necesariamente discretas, sino más bien continuas, ya que no es claro exactamente cuando termina una e inicia la otra; estas etapas son: profase, metafase, anafase y telofase (**Figuras 1 y 2**). Durante la Profase los cromosomas, que están constituidos por las dos cromátidas hermanas en estrecha asociación, comienzan a condensarse. Mientras tanto, fuera del núcleo, los centrosomas comienzan a moverse hacia extremos opuestos de la célula y de cada centrosoma comienzan a enlongarse los microtúbulos. A continuación, en una etapa intermedia entre la Profase y la Metafase, conocida como Prometafase, la envoltura nuclear comienza a perder integridad y conforme se elonga la red de microtúbulos, éstos hacen contacto con los cromosomas, específicamente en los cinetocoros de cada cromátida hermana. Esta red de microtúbulos constituyen el huso mitótico, una estructura dinámica que eventualmente jalará los cromosomas hacia los polos opuestos de la célula. Durante la Metafase los cromosomas son llevados a un plano equidistante entre ambos polos del huso mitótico, al cual se le conoce como plano metafásico y donde una vez que todos los cromosomas están alineados comienza de inmediato la Anafase, período donde las proteínas (cohesinas) que mantienen unidas a las cromátidas hermanas son degradadas, provocando la rápida separación y movimiento de las cromátidas hacia los polos del huso, gracias a fuerzas de empuje generadas en los cinetocoros que provocan el acortamiento de los microtúbulos en los extremos

adheridos a los mismos cinetocoros. A este primer período de la anafase, referido como la separación y movimiento de las cromátidas, se le conoce como Anafase A, en distinción de un segundo período de separación y movimiento de los polos del huso mismo, conocido como Anafase B. En este período, las fuerzas generadas en los microtúbulos que no están en contacto directo con los cinetocoros y que más bien se extienden hasta el polo opuesto del huso (microtúbulos interpolares), así como las fuerzas generadas en aquellos microtúbulos de los extremos del huso que están en contacto con la corteza celular (microtúbulos astrales), hacen que los polos mismos se separen más entre sí provocando que la célula se alargue. Durante la Telofase, la última fase de la mitosis, los dos grupos de cromosomas están en los extremos de la célula y comienzan a descondensarse, empacándose en nuevos núcleos hijos gracias a la reformación de envoltura nuclear alrededor de los cromosomas. El huso mitótico ya no es necesario y comienza a desintegrarse. El último período de la fase mitótica es la citocinesis, la división del citoplasma; ésta ocurre típicamente al final de la mitosis, durante la anafase o telofase (**Figura 2**). En la mayoría de las células animales un anillo de microfilamentos de actina se contrae alrededor de la célula en división hasta que finalmente la parte en dos. Cada célula hija recibe una porción de la membrana y citoplasma (incluyendo organelos, tales como las mitocondrias, retículo endoplásmico, lisosomas, etc.) de la célula parental. Interesantemente, existen células como los hepatocitos y células del músculo cardíaco cuyas fases mitóticas no incluyen citocinesis y por tanto son células grandes en tamaño y multinucleadas.

PUNTOS DE INSPECCIÓN EN EL CICLO CELULAR (*CHECKPOINTS*)

El tiempo que tarda una célula en dividirse es controlado por distintos factores, tanto internos como externos. Por ejemplo, normalmente una célula no se divide o tardará más en hacerlo si carece de nutrientes en el medio que la rodea porque la división es un proceso energéticamente muy demandante. Hablando de factores



Profase

Los cromosomas se condensan; la envoltura nuclear se desensambla y comienza la formación del huso mitótico.

Metafase

Después de desintegrarse la envoltura nuclear, los cromosomas se congregan en el ecuador de la célula. Los microtúbulos de cinetocoro unen las cromátidas hermanas con los polos del huso.

Anafase

Las cromátidas hermanas se separan y son llevadas hacia los polos opuestos de la célula por el acortamiento de los microtúbulos de cinetocoro y por el movimiento de los polos del huso, lo que contribuye a la segregación de los cromosomas a las células hijas.

Telofase

Fin de la mitosis. El huso mitótico se desintegra; la envoltura nuclear se vuelve a ensamblar alrededor de los nuevos núcleos y los cromosomas comienzan a descondensarse. Se forma el anillo de constricción que dividirá al citoplasma.

Citocinesis

El citoplasma se divide en dos por el anillo de constricción, el cual constriñe a la célula para crear dos células hijas con un solo núcleo.

Figura 2. La fase M del ciclo celular

Consiste de la mitosis (división de los cromosomas) y la citocinesis (división del citoplasma). La mitosis a su vez, está dividida en Profase, Prometafase, Metafase, Anafase y Telofase. *Figuras adaptadas de: Bruce Alberts y colaboradores. Molecular Biology of THE CELL, 5th edition, Garland Science. P 1072-1073; y E.O. Wilson's. Life on Earth, Vol.2, Guided Tour of the Living Cell, from iBooks™, Apple Inc. P 92.*

internos, para que la célula pueda progresar de una fase del ciclo a la siguiente, debe cumplir ciertos criterios (como puede ser la integridad del DNA al final de la fase S) que son supervisados por puntos de inspección (*checkpoints*) entre cada fase (Figura 3). Si la célula no cumple con los criterios para pasar uno de estos puntos de inspección, entonces el ciclo celular se detiene hasta que el problema se haya solucionado (como puede ser la reparación del DNA dañado). Si la reparación es imposible entonces la célula muere por apoptosis. Ejemplificando las funciones de estos puntos de inspección y como se aprecia en la figura 3, el punto de inspección en la fase G1 evita que la célula entre a la fase S hasta que se hayan recibido ciertas señales promotoras de crecimiento. En la fase G2 un punto de inspección verifica que todo el DNA haya sido copiado y que

no tenga daños antes de entrar a la fase M. Por su parte, en la fase M, el *Punto de Inspección de la Estructura y Tensión del Huso Mitótico*, como veremos a continuación de manera más detallada, evita que la célula termine la mitosis si algún cromosoma no está unido a los microtúbulos del huso mitótico o bien, si estas uniones carecen de la tensión necesaria para mantener al cromosoma en el plano metafásico; solo cuando estos criterios se han cumplido satisfactoriamente continúa la mitosis y la división celular.

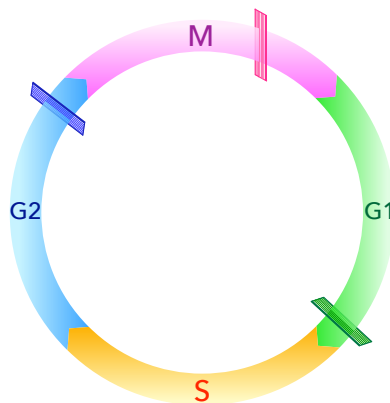


Figura 3. Los puntos de inspección del ciclo celular (*Checkpoints*)

Aseguran que la célula proceda a la siguiente fase del ciclo cuando haya cumplido ciertos criterios que garantizan un correcto funcionamiento de los procesos celulares involucrados en crecimiento, supervivencia y descendencia. Por ejemplo, un punto de inspección en G2 asegura que el DNA esté totalmente copiado y libre de daños antes que éste proceda a segregarse en las células hijas durante la fase M. En la figura, cada punto de inspección se muestra como una rejilla en las fases G1, G2 y M.

EL PUNTO DE INSPECCIÓN DE LA ESTRUCTURA Y TENSIÓN DEL HUSO MITÓTICO (SAC)

La mitosis es un momento vulnerable para la célula ya que errores en la segregación cromosómica traen como consecuencia aneuploidía y/o daño al DNA, que comprometen la supervivencia y la continuidad del ciclo celular. De ahí la importancia de un punto de inspección antes de la anafase, que asegure la correcta segregación cromosómica, es decir que las células hijas reciban el número correcto de cromosomas. Este punto de inspección es el conocido como *Punto de Inspección de la Estructura y*

Tensión del Huso Mitótico o **SAC** por sus siglas en inglés (*Spindle Assembly Checkpoint*) y como nos referiremos en lo sucesivo debido a la simplicidad del término. Es un mecanismo conservado en todos los eucariontes, que retrasa la segregación cromosómica, específicamente evitando el inicio de la Anafase. Diversas proteínas participan en este mecanismo, incluyendo aquellas con actividad cinasa, tales como MPS1 (*monopolar spindle protein 1*) y BUB1 (*budding uninhibited by benomyl 1*) entre otras, así como aquellas sin actividad cinasa como MAD1 y MAD2 (*mitotic arrest deficient 1 and 2*), BUB3 y BUBR1 (*BUB1 - related 1*) entre otras. Como se aprecia en la **figura 4**, el SAC se activa cuando al menos un cinetocoro no está unido a los microtúbulos del huso mitótico, o bien cuando esta unión es débil, es decir, carece de la tensión suficiente para que ambas cromátidas estén alineadas en el plano metafásico y estén orientadas a los polos del huso. Este cinetocoro libre o la unión débil de los cinetocoros a microtúbulos genera una señal difusa a la que se le ha llamado "señal de espera" que indica a la célula que debe esperar un tiempo antes de comenzar la segregación cromosómica. La activación del SAC inicia con la inhabilitación de APC/C (*Anaphase-promoting complex / Cyclosome*) para llevar a cabo su función de ubiquitin ligasa. APC/C promueve la separación y segregación de las cromátidas hermanas a través de la ubiquitinación y subsecuente degradación (dependiente del proteasoma) de CICLINA B (la cinasa maestra que regula el avance de la mitosis) y de la SECURINA, liberando entonces a la enzima SEPARASA, la que a su vez promueve la proteólisis de los complejos de COHESINAS que mantienen unidas a las cromátidas hermanas. Para inhabilitar a APC/C, el SAC cataliza la formación de un complejo proteico conocido como el *Complejo del Punto de Inspección Mitótico*, **MCC** por sus siglas en inglés (*Mitotic Checkpoint Complex*), el cual a su vez interactúa e inhibe a CDC20, el cofactor que activa a APC/C (**Figura 4**). Por otra parte, en respuesta a la falta de tensión causada por una posible unión incorrecta entre los microtúbulos y el cinetocoro, se activa un mecanismo de corrección de errores dependiente de AURORA B, la cual promueve la separación de microtúbulos y cinetocoros, dándose una nueva oportunidad para la unión y tensión correctas entre éstos. Lograda la unión cinetocoro - microtúbulos o bien la tensión correcta entre éstos, la señal del SAC se extingue mediante la liberación de

CDC20 del complejo MCC y consecuente activación de APC/C, promoviendo entonces la separación y segregación de las cromátidas hermanas, es decir la anafase, dándose por terminada la mitosis.

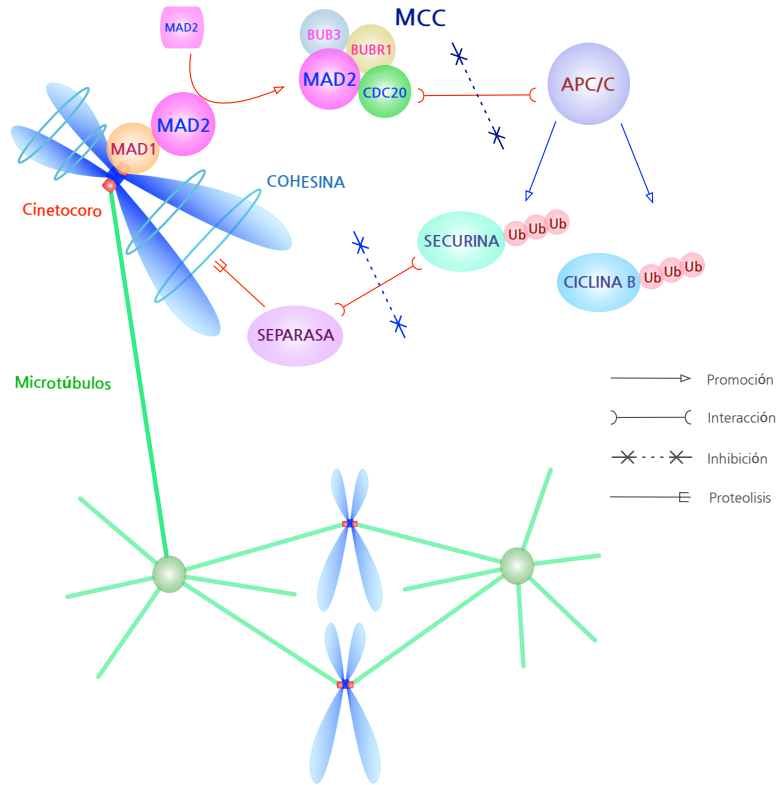


Figura 4. El Punto de Inspección de la Estructura y Tensión del Huso Mitótico (SAC)

El cinetocoro (rojo) que no está unido a los microtúbulos del huso (verde) activa la señal del SAC: MAD1 y MAD2 se unen a ese cinetocoro y MAD2 activa la formación del complejo MCC mediante la unión a CDC20, impidiendo entonces que APC/C pueda promover la ubiquitinación y posterior degradación de CICLINA-B y SECURINA, inhibiéndose de esta manera a la SEPARASA, para que no pueda romper los anillos de COHESINAS que mantienen unidas a las cromátidas hermanas. La unión de MAD2 a CDC20 se debe a un cambio de conformación de MAD2, desde un estado "abierto" (forma poligonal en rosa pálido), MAD2-A hacia un "estado cerrado" (forma circular en rosa intenso) MAD2-C. El modelo de "Templado de MAD2" propone que la formación de MAD2-C se cataliza por la unión de MAD2-A al heterodímero MAD1/MAD2-C en el cinetocoro. Finalmente, cuando el cinetocoro se une a los microtúbulos y se logra la tensión necesaria en esa unión, la señal del SAC se extingue: se libera CDC20 del MCC y activa a APC/C, promoviendo la liberación de la SEPARASA, la cual rompe los anillos de COHESINAS que mantienen unidas a las cromátidas hermanas, comenzando así la Anafase, es decir, la segregación de las cromátidas hermanas a las células hijas.

MAD2

El gen humano MAD2L1 (*Mitotic Arrest Deficient 2 - Like 1*) se localiza en el cromosoma 4q27 y su secuencia codificante contiene 5 exones. Fue identificado por vez primera en mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, en las cuales no se activaba el arresto en mitosis cuando eran incubadas en presencia de inhibidores de la dinámica de microtúbulos, específicamente el benomilo y como consecuencia de la segregación aberrante de cromosomas estas células eran sensibles al tratamiento y morían ¹. Posteriormente, el ortólogo humano de este gen fue también identificado en la línea celular de cáncer cérvicouterino HeLa. Se observó que la identidad del ORF entre la secuencia humana y la de *S. cerevisiae* era de 60%, mientras que la identidad en la secuencia peptídica era de 40% ². En este mismo trabajo también determinaron el peso de la proteína (aproximadamente 24 kDa) y que era importante para la activación del SAC cuando las células eran tratadas con nocodazol. Más aun, ellos determinaron la localización intracelular de MAD2 durante la interfase y la mitosis: MAD2 estaba presente en los cinetocoros durante la prometafase y prácticamente ausente durante la metafase y anafase, lo que sugería que MAD2 podía estar monitorizando la unión del huso mitótico al cinetocoro y por tanto activar el SAC.

En lo sucesivo, a lo largo de este texto, estaremos hablando de la proteína humana MAD2L1, pero por simplicidad, solo la llamaremos MAD2.

MAD2 es una proteína conservada en todos los eucariontes y como se observa en la **figura 4**, es un componente clave en la activación del SAC y del MCC. Precisamente, la interacción entre MAD2 y CDC20 es la que impide la función de APC/C y por tanto el inicio de la anafase. Los modelos actuales proponen que los cinetocoros libres funcionan como plataformas de activación de MAD2, donde este sufre un cambio de conformación desde un estado "abierto" en su forma soluble, MAD2-A (forma poligonal en la figura 4) hasta un estado "cerrado", MAD2-C (forma circular en la figura 4). El

modelo conocido como "Templado de MAD2" propone que el heterodímero MAD2-C/MAD1 que se localiza en el cinetocoro, es quien cataliza la conversión de MAD2-A a MAD2-C, habilitando entonces su unión a CDC20 y la formación del complejo MCC³.

Además de su participación directa en la formación del complejo MCC y consecuente inhibición de APC/C, se ha visto que MAD2 también regula la estabilidad de la unión entre el cinetocoro y los microtúbulos, independientemente del SAC. De hecho, Kabeche y Compton⁴ observaron que la sobreexpresión de MAD2 en células humanas diploides estabilizaba esta unión a tal magnitud que se disminuía la corrección de uniones defectuosas entre cinetocoros y microtúbulos, promoviendo de esta manera errores en la segregación cromosómica, tales como la aparición de cromosomas rezagados durante la anafase. El mecanismo involucrado en esta función estabilizadora de MAD2 consiste en la deslocalización de AURORA B, la cual se sabe promueve la corrección de las uniones defectuosas entre microtúbulos y cinetocoros mediante la desestabilización de dichas uniones. Los autores proponen que la fracción soluble de MAD2, es decir, la que no se une al cinetocoro, es la que ejerce esta función de estabilización de unión entre cinetocoro y microtúbulos del huso mitótico y que esto puede ser la causa de la inestabilidad cromosómica que se observa en aquellos tumores donde se ha observado la sobreexpresión de MAD2⁴.

OTRAS INTERACCIONES DE MAD2

MAD2 ha cobrado importancia más allá de su participación en la mitosis, pues se han reportado interacciones proteicas de MAD2 con diversas proteínas que participan en otros mecanismos o vías metabólicas en la célula, lo cual sugiere que MAD2 podría ser una proteína con múltiples funciones. Ejemplos de tales interacciones incluyen al receptor de cinasas de tirosinas c-KIT en células hematopoiéticas progenitoras, interacción que promueve el ciclo celular de estas en respuesta a los factores de crecimiento de stem cells (SCF) y al de granulocito-macrófago CSF (GM-CSF)⁵.

Por otro lado, también se ha reportado la interacción con la metaloproteasa-disintegrina, convertasa del factor de necrosis tumoral α , TACE, cuya implicación funcional no ha sido estudiada ⁶; y también con el dominio citoplasmático del receptor de insulina, IR ⁷. En este último estudio los autores no soportan una función de la insulina en el control del ciclo celular, de modo que la interacción de MAD2 con el IR solo podría implicar la participación de MAD2 en la activación de cinasas MAP en la vía de señalización de la insulina, entonces tampoco es clara la función de esta interacción.

Otra interacción demostrada es con el receptor de estrógenos β , ER β ⁸. Los autores hipotetizan que esta interacción podría ser importante en la regulación de la proliferación de las células endoteliales de vasos sanguíneos cuando hay una ruptura de los mismos, ya que MAD2 es después de todo una proteína de ciclo celular y la expresión de ER β es inducida cuando se presenta dicho daño en vasos sanguíneos. También hipotetizan que ER β podría tener un papel en la proliferación celular, no relacionado a su función como factor de transcripción.

En el cáncer de colon hay una frecuencia alta de mutaciones del gen supresor de tumores APC (poliposis adenomatosa coli) y estas mutaciones han sido asociadas a la inestabilidad cromosómica (INC) en estos tumores. Zhang y colaboradores demostraron que esta INC puede ser debida a la interacción directa entre mutantes truncadas de APC con MAD2 ⁹, evitando de esta forma la función normal de MAD2 en la regulación del SAC, promoviendo los errores en la segregación cromosómica y en última instancia la inestabilidad genómica, característica funcional (los conocidos "*Hallmarks*" del cáncer) de prácticamente todos los tumores sólidos.

En líneas celulares de cáncer gástrico Wang y colaboradores determinaron a través de inmunoprecipitaciones que MAD2 interactúa también con SURVIVINA ¹⁰. Los autores no discuten a profundidad pero la interacción es interesante dado que, como veremos a continuación, la expresión de MAD2 se ha asociado con la sensibilidad o resistencia a agentes antineoplásicos, tanto en líneas celulares de cáncer, como en

ensayos clínicos. SURVIVINA es una proteína miembro de la familia IAP (inhibidores de apoptosis) e inhibe la activación de caspasas 3, 7 y 9, por lo que su sobre expresión se relaciona con supervivencia. De hecho el gen *Birc5* (el que codifica para SURVIVINA) está sobre expresado en tumores, pero normalmente no se expresa en tejidos diferenciados normales ¹¹. Adicionalmente, SURVIVINA participa en la regulación de la segregación cromosómica a través de la interacción con el Complejo Pasajero Cromosómico, el cual garantiza la correcta unión entre el huso mitótico y los cromosomas y éxito de la citocinesis ¹².

Estos estudios nos sugieren que además de las funciones de regulación en la mitosis, hay importantes implicaciones de MAD2 en otras vías celulares que requieren de más investigación y completa elucidación. Una de estas vías y que se describe con más detalle a continuación, es la respuesta a daño del DNA.

MAD2, EL SAC Y LA RESPUESTA A DAÑO AL DNA

La vía SAC no solo es relevante durante la mitosis, podría parecer sorprendente o inesperado que también fuera importante en otras vías, tales como la respuesta al daño del DNA y al parecer, MAD2 tiene un papel fundamental en esta asociación, como veremos a continuación:

Murayukomo y colaboradores describieron la interacción de MAD2 con hREV7, una subunidad de la DNA polimerasa ζ , la cual a su vez participa en la reparación de lesiones al DNA causadas por radiación UV ¹³. Dado que la sobreexpresión de hREV7 no alteró el ciclo celular, es posible que esta interacción no esté involucrada en las funciones de MAD2 en el SAC, de modo que es posible pensar de forma alterna en la participación de MAD2 en las funciones de reparación de la DNA polimerasa ζ . Los autores sugieren que la subunidad hREV7 podría estar funcionando ya sea en el acarreamiento de la polimerasa al sitio de daño, o bien en el funcionamiento mismo de

la polimerasa. Aunque no se estudia en el artículo y tampoco se propone ¿sería posible que la interacción de MAD2 con hREV7 tuviera una participación en estas funciones, es decir al final de cuentas, en la reparación del daño al DNA?

Las cinasas ATR, ATM y CHK1, así como la proteína RAD51/CHK2, son componentes de la vía **DDR** (por sus siglas en inglés: *DNA Damage Response*). Cuando hay daño al DNA por rompimiento de doble cadena se activan las cinasas ATM y ATR, esta última fosforila y activa a CHK1, la cual a su vez activa una cascada de señalización que promueve la interrupción ("arresto") del ciclo celular y la reparación del DNA dañado ¹⁴. Por su parte, RAD51 es un componente clave de la vía de reparación por recombinación homóloga, se une a las cadenas libres del DNA resultantes de los rompimientos y es un marcador de daño al DNA ¹⁵. Lawrence y colaboradores observaron en *C. elegans* que la interrupción de la mitosis no solo requiere del SAC, sino también de ATR y que CHK1 fosforilado se halla también en los cinetocoros cuando estos no están unidos aun al huso mitótico, o bien cuando hay una interrupción prolongada de la mitosis. Ambas cinasas, ATR y CHK1, son indispensables para mantener un huso mitótico bipolar, de lo contrario, en ausencia de una o ambas, se presentan husos mitóticos multipolares. Además, los componentes del SAC también juegan un papel en la respuesta a daño del DNA. La disminución de MAD1 provoca la aparición de focos de RAD51, lo que indica que MAD1 es necesario para evitar daño espontáneo al DNA. Por otro lado, cuando hay daño inducido al DNA por agentes químicos como la hidroximetilurea (HU), o bien por radiación ionizante, MAD2 se relocaliza a la periferia nuclear en *C. elegans*, o bien en el núcleo en células humanas en interfase y colocaliza con focos de RAD51, esta relocalización depende de MAD1, ATR y ATM. Además de ello, MAD2, MAD1 y BUBR1 son necesarias para reparar los rompimientos de cadena sencilla o doble (donde se acumula la señal de RAD51) ¹⁶.

En otro estudio por Chilà y colaboradores, se observó en líneas celulares de osteosarcoma U2OS que precisamente MAD2 es fosforilada por CHK1 y que ambas proteínas interactúan físicamente. Observaron también que la inhibición de CHK1

indujo muerte celular a consecuencia de mitosis aberrantes y fallas en la activación del SAC. Tanto CHK1 como MAD2 colocalizan en el núcleo celular tanto en condiciones normales, como bajo tratamiento con cisplatino, donde los niveles de ambas proteínas aumenta, incluyendo en la región perinuclear de la célula ¹⁷.

En cuanto a RAD51/CHK2, que como mencionamos, es parte de la vía DDR y es un componente clave de la vía de reparación por recombinación homóloga, Clemenson y colaboradores reportaron que en *S. cerevisiae*, el tratamiento con nocodazol activa el SAC y al mismo tiempo ocasiona la fosforilación de RAD51. Esta fosforilación es independiente del daño al DNA porque el nocodazol no causa un daño directo al DNA y porque no participan otros componentes del DDR. Sin embargo, esta fosforilación sí depende de la presencia de MAD2. Los autores proponen que en ciertos tipos de daño al DNA, ambos puntos de control (SAC y DDR) se activan y que la activación del SAC podría contribuir a la adaptación o bien a la recuperación del DNA dañado ¹⁸.

El SAC no solo estaría participando en la activación del DDR, sino que también podría estar involucrado en otras vías de reparación del DNA, como ocurre con la vía **NER** (*Nucleotide Excision Repair*). Específicamente, según el reporte de Fung y colaboradores, ¹⁹, MAD2 interactúa con las proteínas XPD y ERCC1. Esta interacción depende del dominio N terminal de MAD2 y tanto XPD como MAD2, colocalizan en el núcleo celular. Los autores observaron además que la sobre expresión de MAD2 compite con la unión XPD - XPA cuando hay daño al DNA, es decir, los niveles de XPD son menores en el coimmunoprecipitado con XPA cuando hay daño al DNA y también hay menores niveles de inmunodetección de YH2AX. Los autores sugieren por tanto que los altos niveles de MAD2 podrían interferir con la respuesta a daño a DNA y por tanto conferir quimiosensibilidad en la quimioterapia contra el cáncer. En la **figura 5** se muestran algunas de las interacciones que hemos mencionado.

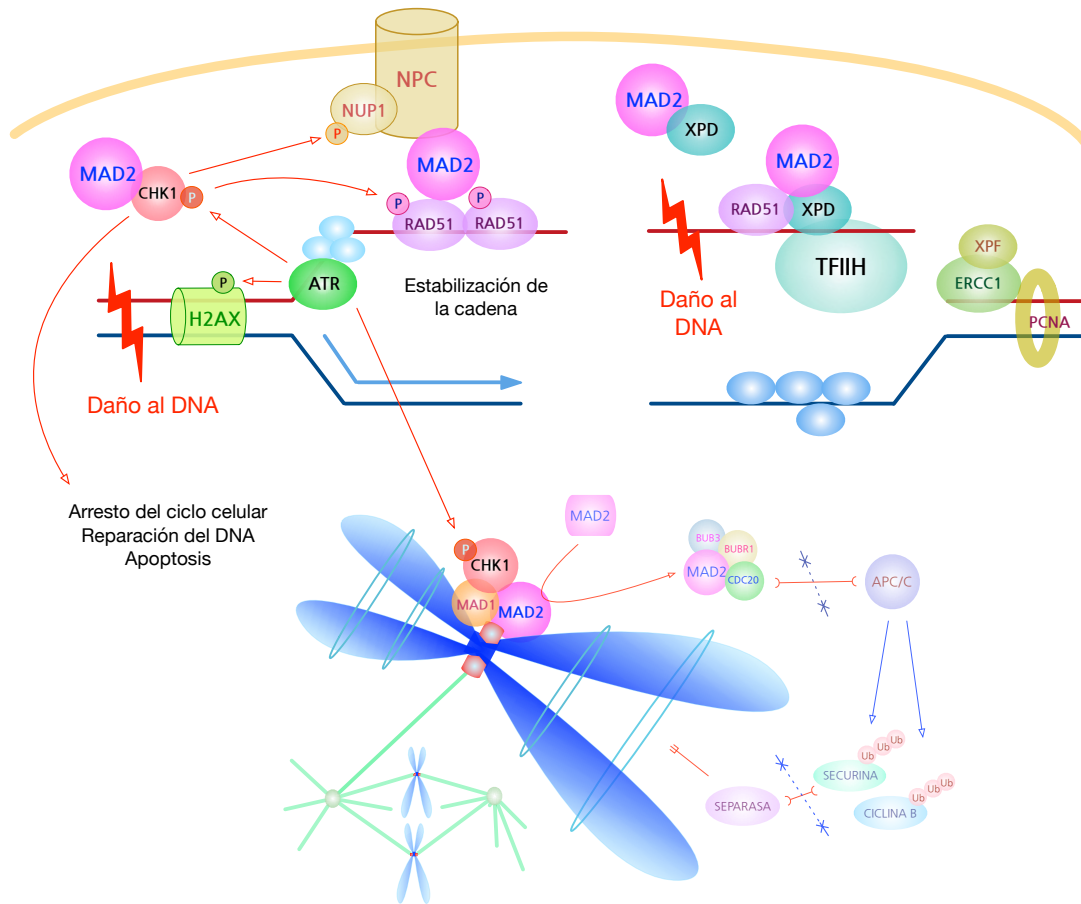


Figura 5. MAD2 en el SAC y en la respuesta al daño al DNA

La proteína MAD2 se ha visto involucrada en diversas interacciones como las ya mencionadas en el texto y con el complejo del poro nuclear (NPC), así como en vías de reparación del DNA, tales como el DDR, Recombinación homóloga y NER. Adicionalmente, proteínas del DDR, tales como CHK1 también se hallan en los cinetocoros promoviendo el arresto en metafase tras el daño al DNA. Esto es un ejemplo de como las vías que sensan el daño, que detienen el ciclo celular y que reparan el daño, están integradas y que funcionan en conjunto a lo largo del ciclo celular. Interesantemente, MAD2 es un denominador común en todas estas vías.

Recientemente, la vía SAC ha sido considerada como un blanco terapéutico prometedor. Esto debido a que mientras la inhibición del ciclo celular en general puede inducir solo quiescencia (las células de cáncer no mueren, sino que están latentes), la inhibición del avance de la mitosis ofrece más posibilidades para matar a las células de cáncer²⁰. Específicamente, esta inhibición o "arresto" puede lograrse mediante el daño

al DNA, ya sea físico o químico, lo que ocasiona problemas en la unión de los cinetocoros al huso mitótico y consecuentemente la activación de la vía SAC, siempre que esté funcionando correctamente. Las consecuencias de un arresto prolongado en mitosis van desde la apoptosis, catástrofe mitótica, senescencia, etc, dependiendo de la línea celular y del inhibidor empleado ²¹⁻²³. Por tanto, podemos sugerir que una vía SAC débil o defectuosa en las células de cáncer puede conducir a la resistencia a quimioterapia, es decir a los agentes que inhiben la dinámica del huso mitótico o que dañan el DNA. Justamente MAD2 juega un papel muy importante en el arresto mitótico dependiente de la vía SAC e inducido por agentes que dañan el DNA, así lo demuestran varios estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, que han asociado la expresión aberrante de MAD2 con la sensibilidad o resistencia a agentes quimioterapéuticos que dañan el DNA ^{10,19,22,24-28}.

LA DESREGULACIÓN DE MAD2 EN EL CÁNCER

Dada la diversificación en sus funciones, no nos sorprenden las consecuencias biológicas que trae consigo la desregulación de MAD2, tanto a nivel transcripcional, postranscripcional o postraducciona, incluyendo la desregulación en la localización intracelular de la proteína. Los cambios en la expresión de MAD2, así como de otros componentes del SAC, han sido motivo de muchos estudios enfocados en las implicaciones moleculares y clínicas, sobre todo en cáncer. A continuación se describen algunos de estos estudios, resumidos también en la **tabla 1**:

En diversos estudios de perfiles de expresión en cáncer de mama se ha observado la sobre expresión de MAD2 en contraste con el tejido no tumoral adyacente²⁹. Además, en tumores primarios de carcinoma ductal invasivo, la sobre expresión de MAD2 se ha asociado con mayor inestabilidad cromosómica ³⁰ y con altos niveles de HER2 ³¹. La sobre expresión de MAD2 en pacientes con cáncer de mama se ha asociado también con una mayor recurrencia, menor supervivencia libre de recaída,

menor supervivencia global, mayor metástasis y muerte ^{29,32}. Mientras que en líneas celulares triple negativas para receptores, el silenciamiento de MAD2 redujo la migración e invasividad *in vitro* ²⁹.

En cáncer gástrico hay hallazgos similares. Se ha observado una mayor sobre expresión de MAD2 en el tejido tumoral versus el tejido normal y dicha sobre expresión se ha asociado con el grado de diferenciación del tumor (adenocarcinoma bien diferenciado) y con la presencia de metástasis en ganglios linfáticos o en el hígado ^{33,34}. Adicionalmente, también se ha estudiado la localización intracelular de MAD2; en el tejido tumoral la proteína es citoplasmática y nuclear y la intensidad de la señal es fuerte, lo que señala que la proteína es abundante. Mientras tanto, en el tejido normal la proteína se ha encontrado principalmente en citoplasma, aunque también puede haber en núcleo y la tinción no es tan intensa. Mientras mayor es la presencia de MAD2 en el núcleo, mayor es la presencia de metástasis en ganglios linfáticos ³⁴ y la mayor presencia de MAD2 en el tejido tumoral versus el tejido normal (C/N > 3) se ha asociado a mayor metástasis en el hígado ³³.

En adenocarcinoma de colon, nuevamente la expresión de MAD2 es mayor en tejido tumoral versus el correspondiente tejido normal y la localización intracelular es principalmente citoplasmática. Adicionalmente, la sobre expresión de MAD2 se asocia con el grado de diferenciación tumoral, en este caso con los tumores bien diferenciados y análogamente, como en el estudio anterior con cáncer gástrico, cuando la relación de expresión de MAD2 entre el tejido tumoral y el correspondiente tejido normal (C/N) es mayor a 2, también hay correlación con metástasis en ganglios linfáticos ^{35,36}.

En cáncer renal también hay un estudio donde comparan la expresión de MAD2 (por QRT-PCR) entre tipos histológicos del tumor o bien con el tejido normal ³⁷. En ese estudio observan que MAD2 está sobre expresado en el subtipo papilar en comparación con el subtipo cromóforo o bien con el tejido normal. Los autores

sugieren que este resultado podría estar relacionado al hecho de que los tumores renales papilares típicamente presentan trisomías.

En el carcinoma hepatocelular la expresión de MAD2 (por QRT-PCR y western blot) es más alta en el tejido tumoral que en el tejido normal y adicionalmente, los autores del estudio sugieren que la expresión de MAD2 tiende a incrementar conforme van progresando los estadios de la enfermedad ³⁸. De hecho, dado que la expresión ya es alta desde los estadios más bajos, los autores sugieren que la sobre expresión de MAD2 puede ser un evento relativamente temprano y un potencial indicador de pronóstico. También se observa que la alta expresión de MAD2 correlaciona con una menor supervivencia global, con un grado histológico pobremente diferenciado y con un Ki-67 más alto, es decir con mayor proliferación de las células tumorales.

En el cáncer cérvicouterino localmente avanzado (estadios IIIa - IIIb) hay un estudio donde muestran la sobre expresión de MAD2 en el grupo de pacientes donde la quimioterapia neoadyuvante basada en cisplatino no fue efectiva y donde hubo progresión de la enfermedad. En contraste, en el grupo de pacientes donde sí funcionó la quimioterapia neoadyuvante, es decir, donde hubo remisión parcial o completa y donde el pronóstico es mejor, la expresión de MAD2 fue significativamente menor que en el grupo anterior de pacientes. En todos los casos la localización de MAD2 fue nuclear ²⁴.

Por otro lado, en cáncer de ovario se ha observado que los bajos niveles proteicos de MAD2, determinado por inmunohistoquímica, han correlacionado con menor supervivencia libre de recurrencia en pacientes con cáncer de ovario de distintos tipos histológicos ³⁹; con menor supervivencia libre de progresión en pacientes con carcinoma seroso de ovario de alto grado post-quimioterapia ^{40,41}; y con menor supervivencia global y mayor recaída de la enfermedad en pacientes con adenocarcinoma seroso de ovario, post-cirugía y tratados con terapia basada en cisplatino ⁴². Adicionalmente, en estos estudios se ha observado que la localización

intracelular de MAD2 es tanto nuclear, como perinuclear, principalmente cuando los niveles proteicos son bajos, ya que cuando son más altos, la localización es principal e intensamente nuclear ^{39,41}. Una posible explicación a estas observaciones es que en los estudios *in vitro* se observa que la baja expresión o la inhibición de la expresión de MAD2 en líneas celulares de cáncer de ovario se asocia con una mayor resistencia a paclitaxel y que además, esta subexpresión puede deberse a la regulación de MAD2 por el miRNA-433, sobre expresado en dichas líneas celulares quimiorresistentes ⁴⁰, lo que sugiere a su vez, que los bajos niveles de MAD2 pueden asociarse a la resistencia a quimioterapia y a una recurrencia más temprana ⁴¹.

También en cáncer de esófago se ha visto la sobre expresión de MAD2 cuando se compara el tejido tumoral versus el tejido normal adyacente, medida por QRT-PCR; y además la sobre expresión de MAD2 en líneas celulares de cáncer de esófago se asocia a la quimiorresistencia a paclitaxel y docetaxel, no así a 5-fluorouracilo y cisplatino. No obstante, la baja expresión, es más común en el grupo de pacientes en estadios avanzados de la enfermedad y con metástasis ⁴³. Es interesante que en el Esófago de Barrett, también hay un estudio donde vieron que los pacientes con tumores pobremente diferenciados, es decir los más agresivos con potencial metastásico, también tenían los menores niveles de expresión de MAD2, aunque sólo eran dos pacientes ⁴⁴.

En cáncer de testículo también se ha determinado, a través de inmunohistoquímica, los niveles de MAD2, comparando entre el tejido tumoral y el normal, o bien entre distintos tipos histológicos del tumor. El cáncer de testículo de células germinales, o tumor de células germinales de testículo (TCGT), es el tumor sólido más frecuente en hombres de 20 a 40 años de edad y representa el 60% de todas las neoplasias malignas en este grupo de edad ⁴⁵. Este tipo de tumor se subdivide a su vez en tumores de tipo No seminoma o seminoma, siendo este último el subtipo histológico más común (50% de todos los TCGTs). En un par de estudios independientes se localizó por inmunohistoquímica a MAD2 en el núcleo y se observó

que los niveles proteicos de MAD2 son menores en los TCGT, tipo seminoma, en comparación con el tejido sano, o bien en comparación con TCGTs - No seminoma ^{45,46}. En contraste, los niveles de MAD2 sí son mas elevados en los TCGTs - No seminoma (en particular el carcinoma embrionario y el de "Yolk sac") cuando se compara con el tejido sano ⁴⁵. En el estudio de Fung y colaboradores hacen ensayos funcionales *in vitro* con líneas celulares de cáncer de testículo y observan que los menores niveles nucleares de MAD2 correlacionan con un menor índice mitótico en respuesta a nocodazol. Por tanto, los autores sugieren que los bajos niveles nucleares de MAD2 en los TCGTs, tipo seminoma podrían correlacionar con un SAC defectuoso ⁴⁶. Esto es interesante porque ya hemos discutido con anterioridad que un SAC defectuoso puede tener un efecto en la respuesta a la quimioterapia y de hecho, en un estudio previo por estos autores, se observó que la inhibición de MAD2 en líneas celulares de cáncer de testículo correlacionaba con mayor resistencia al tratamiento con cisplatino ²⁶.

Los estudios anteriormente descritos y otros más en la literatura que se han hecho tanto en estudios clínicos, como *in vitro* , nos sugieren que la desregulación de MAD2 es un evento muy frecuente (si acaso no es requisito) en el cáncer. Además esta desregulación parece estar involucrada ya sea en la respuesta a la terapia anticáncer o bien, en el pronóstico y/o progresión de la enfermedad. De manera interesante, es más común que MAD2 esté sobre expresado en cáncer, sobre todo en el tejido tumoral versus el tejido sano y que esta sobre expresión esté asociada a la presencia de metástasis en ganglios, a la recurrencia y a la supervivencia. Estos hallazgos destacan la importancia de conocer los mecanismos moleculares en los cuales MAD2 participa en distintas vías importantes en la carcinogénesis, como son el ciclo celular, vías de reparación del DNA, muerte celular, motilidad celular, etc. y que entonces nos permita pensar en estrategias de diagnóstico o terapéuticas que consideren a MAD2 y a otras proteínas cuyo papel aún se desestima en el tratamiento contra el cáncer.

Tabla 1: La expresión de MAD2 y su asociación con diversos fenotipos en cáncer. Flecha roja: sobre expresión; flecha verde: subexpresión.

MAD2	Fenotipo	Referencia
↑	Tumores primarios de carcinoma de mama ductal invasivo : Mayor inestabilidad cromosómica y altos niveles de HER2.	Scintu y col, 2007 Du y col, 2011
↑	Pacientes con cáncer de mama: Mayor recurrencia, menor supervivencia libre de recurrencia, menor supervivencia global, mayor metástasis y muerte.	Wang y col, 2015 vantVeer y col, 2002
↓	Líneas celulares de cáncer de mama triple negativas: Reducción de migración e invasividad.	Wang y col, 2015
↓	Tumores de cáncer de ovario: menor supervivencia libre de recurrencia; menor supervivencia libre de progresión post-quimioterapia; menor supervivencia global; mayor recaída en pacientes post-cirugía y tratados con cisplatino.	McGrogan y col, 2014 Furlong y col, 2012 Park y col, 2013 Nakano y col, 2012
↓	Líneas celulares de cáncer de ovario: Mayor resistencia a paclitaxel.	Furlong y col, 2012
↑	Cáncer de esófago: mayor en tejido tumoral versus normal. Líneas celulares de cáncer de esófago: quimiorresistencia a paclitaxel y docetaxel	Tanaka y col, 2008
↓	Esófago de Barret: Tumores pobremente diferenciados y con potencial metastásico	Soak y col, 2004
↑	Cáncer de testículo: Mayor en los tumores de células germinales de testículo (TCGT), tipo No Seminoma, que en tejido normal o en TCGT, tipo Seminoma.	Fung y col, 2007 Borum Auensen y col, 2010
↓	Líneas celulares de cáncer de testículo, TCGT tipo Seminoma: Menor índice mitótico en respuesta a nocodazol. Líneas celulares de cáncer de testículo: Quimiorresistencia a cisplatino	Fung y col, 2007 Fung y col, 2006
↑	Cáncer gástrico: Mayor presencia en tejido tumoral versus normal: asociación con grado de diferenciación del tumor y con metástasis a ganglios linfáticos e hígado. Mayor presencia de la proteína en el núcleo celular.	Tanaka y col, 2001 Wang y col, 2009
↑	Adenocarcinoma de colon: Localización citoplasmática de la proteína. Asociación con tumores bien diferenciados y con metástasis a ganglios.	Li y col, 2003 Li y col, 2004
↑	Mayor en tejido tumoral de cáncer renal, subtipo papilar, que en el subtipo cromóforo. Los subtipos papilares son los mas trisómicos.	Pinto y col, 2007
↑	Carcinoma hepatocelular: mayor en tejido tumoral versus normal, en especial en estados avanzados de la enfermedad: Menor supervivencia global, grado histológico pobremente diferenciado, Ki67 alto,	Zhang y col, 2008
↑	Cáncer cérvicouterino: Resistencia a la terapia neoadyuvante basada en cisplatino. Progresión de la enfermedad.	Morishita y col, 2012

MAD2 Y EL EMPALME ALTERNATIVO DE EXONES

Como se muestra en la **figura 6A** y como habíamos dicho con anterioridad, la secuencia codificante de MAD2 consta de cinco exones y el producto proteico de 205 aminoácidos tiene un peso de alrededor de 24 kDa. Sin embargo, Fang Yin y colaboradores identificaron una variante transcripcional de MAD2 a la que llamaron MAD2 β ²⁷. Como se muestra en la **figura 6B**, esta isoforma se produce por el *empalme alternativo* (*Alternative Splicing* en inglés) de los exones 2 y 4, es decir se elimina el exón 3 y como es de esperarse, el potencial producto proteico es más pequeño, de aproximadamente 90 aminoácidos y 11 kDa. El empalme alternativo de los exones produce un cambio en el marco de lectura, por lo que el dominio carboxilo terminal de MAD2 β es distinto al de la isoforma completa de MAD2, es decir **MAD2 α** , como a lo largo de este texto nos referiremos.

MAD2 β fue detectada solo en dos sublíneas celulares de cáncer gástrico resistentes al tratamiento con adriamicina y vincristina: SGC7901/VCR y SGC7901/ADR, no así en la línea parental SGC7901, la cual era sensible a los tratamientos. Los autores observaron que tanto en las dos sublíneas mencionadas o bien en la parental transfectada con un vector de expresión para MAD2 β , disminuía la expresión de MAD2 α y consecuentemente también disminuía el índice mitótico, es decir la fracción de células detenidas en mitosis a consecuencia del tratamiento con adriamicina y vincristina. Este dato es importante porque sugiere que la expresión de MAD2 β no permite una correcta activación del SAC y esto provoca que las células no respondan al tratamiento mediante el arresto en mitosis, lo cual se traduce en errores en la segregación cromosómica y en un escape a la activación de apoptosis. Precisamente los autores observan que con la expresión de MAD2 β se disminuye la apoptosis y aumenta el número de células multinucleadas (resultado de los errores en la segregación cromosómica). Por tanto, los autores concluyen que la expresión de MAD2 β contribuye al fenotipo quimiorresistente mediante la subexpresión de MAD2 α y la interrupción de

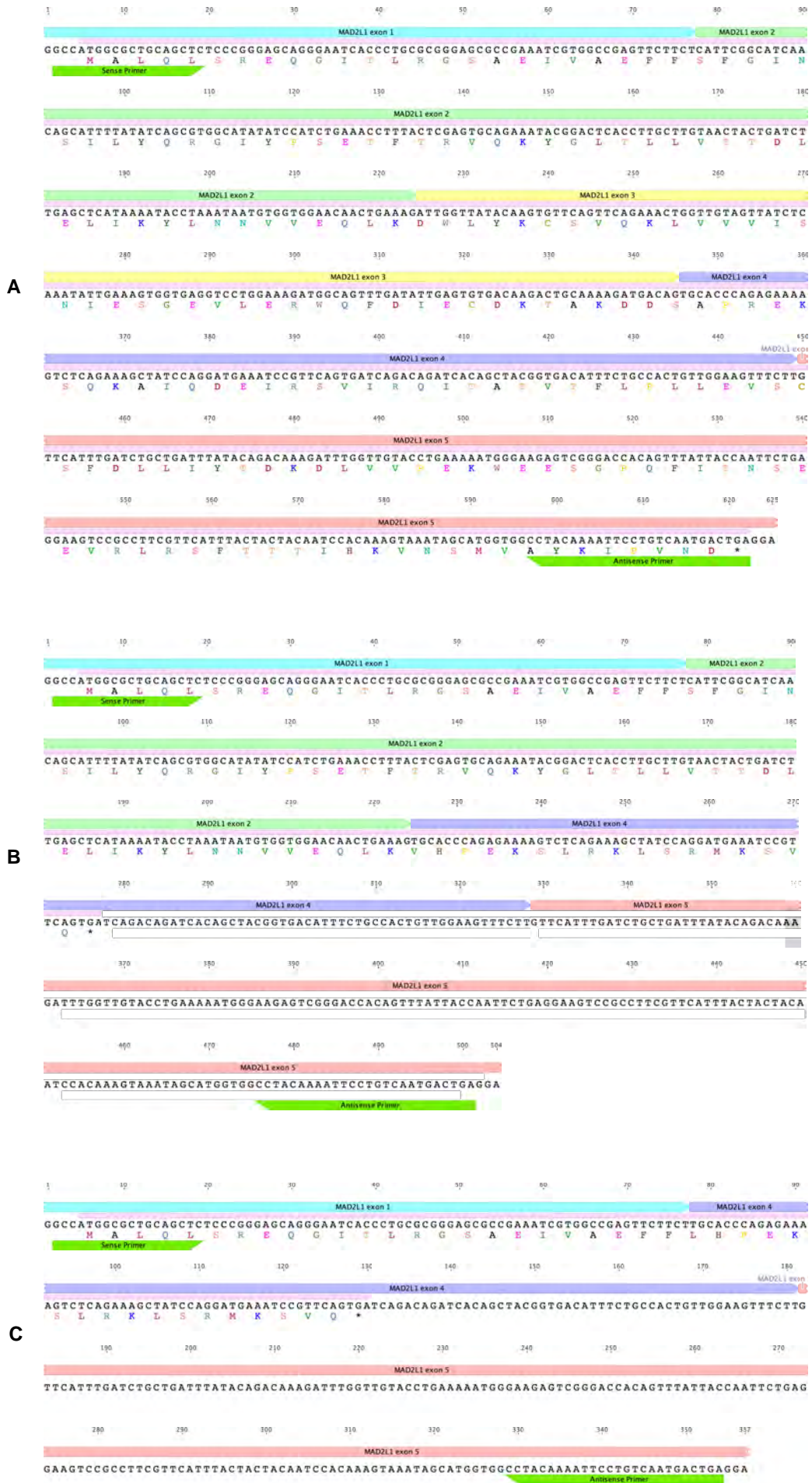
la activación del SAC, lo cual va de acuerdo a lo que mencionamos anteriormente en la sección: MAD2, el SAC y el daño al DNA.

La presente tesis tiene que ver también con el tema del *empalme alternativo* de exones en MAD2, ya que en ella se reporta la expresión de otra isoforma a la que hemos llamado **MAD2 γ** para seguir con la nomenclatura establecida por Yin y colaboradores ²⁷ y por tanto, como ya mencionamos, a la isoforma mayor de MAD2 la renombraremos en este trabajo como MAD2 α . La isoforma MAD2 γ se genera por el *empalme alternativo de los exones 1 y 4*, eliminándose los exones 2 y 3, **figura 6C**. Dado el papel de MAD2 α y MAD2 β en la regulación del SAC, de su variable expresión en tejidos tumorales y líneas celulares y de la asociación con la respuesta al daño del DNA, nos abocamos a estudiar el papel de la nueva isoforma MAD2 γ en todas estas funciones, de tal manera que nos ayude entender la versatilidad de funciones de MAD2 en la biología del cáncer y en general en la biología celular.

Siguiente página:

Figura 6. La secuencia codificante de las tres isoformas de MAD2

Mostrada como una barra color rosa pálido, la secuencia codificante de (A) MAD2L1 ² (MAD2 α), con un marco de lectura abierto de 618 pb, de 5 exones y que se traduce en una proteína de 205 aminoácidos. (B) MAD2 β ²⁷ no contiene el exón 3 de MAD2, con un marco de lectura de 273 pb y se traduce en un péptido de 90 aminoácidos. (C) La nueva isoforma MAD2 γ , no contiene a los exones 2 y 3 y su marco de lectura es de 126 pb, que se traducen en un péptido de 41 aminoácidos. *Imagen creada de Geneious, V. 8.1.7 (Biomatters Software License), usando la secuencia de MAD2L1, NM_002358.*



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según se trate de tejido tumoral, tejido sano, grado histológico o de diferenciación del tumor, la expresión y localización intracelular de MAD2 pueden variar significativamente y asociarse a distintos parámetros clínicos. Estas variaciones afectan al menos dos importantes funciones de MAD2: la activación del SAC y la respuesta al daño del DNA. Aun no es clara la razón de estas variaciones, aunque sí se conocen algunos mecanismos de regulación transcripcional y postraducciona que pudieran contribuir a la explicación. Una forma de regulación postranscripcional es el *empalme alternativo de exones (alternative splicing)* y debido a este mecanismo conocemos a MAD2 β , una isoforma que contribuye a la quimiorresistencia a fármacos antineoplásicos que dañan el DNA en líneas celulares de cáncer gástrico, posiblemente mediante la inhibición de la activación del SAC y de los niveles normales de MAD2²⁷. Adicionalmente, nosotros reportamos ahora otra isoforma, producto también del *empalme alternativo de exones*, a la que hemos llamado MAD2 γ . Como ha ocurrido con otras proteínas del SAC, MAD2 ha sido propuesto como un blanco terapéutico y dado su papel en la carcinogénesis y en la respuesta al tratamiento quimioterapéutico en cáncer, es muy importante entender los diferentes factores que afectan su regulación y su función. Es por ello que es necesario estudiar y caracterizar las isoformas producto del *empalme alternativo de exones* de MAD2, no solo *in vitro*, sino también de manera translacional en tumores de pacientes, estudiar la asociación entre su expresión y distintos parámetros clínicos y cómo pueden tener un papel predictor en el diagnóstico o en el tratamiento. Esto es particularmente importante e interesante en MAD2 γ , ya que no hay un conocimiento o reporte previos de esta isoforma.

Un modelo interesante para estudiar la asociación entre la expresión de las isoformas de MAD2 y la respuesta a daño del DNA es el cáncer de testículo de células germinales (TCGT). El tratamiento estándar para este tipo de tumores es la quimioterapia basada en platino (cisplatino o carboplatino), cuyo mecanismo de daño

se basa en la interacción directa con el DNA, formando entrecruzamientos ínter e intracatenarios, cuya falta de reparación conducen a la muerte celular. Cerca del 80% de los pacientes responden exitosamente a esta terapia ⁴⁷; sin embargo, aún hay un 20% de estos pacientes que no responden al tratamiento y por ello es importante elucidar los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de resistencia o sensibilidad a la quimioterapia. Previamente se mencionó que en este tipo de cáncer se han observado cambios en la expresión de MAD2 y que tanto los ensayos *in vitro* como en tumores sugieren que esta expresión diferencial puede afectar la activación del SAC y la respuesta al tratamiento con cisplatino ^{26,46} ¿Será solo la expresión diferencial de MAD2? o quizás de forma más específica ¿Será la expresión diferencial de isoformas de MAD2, como MAD2 γ , las que realmente tengan un impacto en estos mecanismos?

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existirá alguna asociación entre la expresión de MAD2 γ y la activación del SAC, así como con la respuesta al tratamiento con agentes antineoplásicos en cáncer?

HIPÓTESIS

La expresión de MAD2 γ regula la activación del SAC y está asociada con la quimiorresistencia a agentes antineoplásicos en cáncer.

OBJETIVO

Estudiar la expresión de MAD2 γ en cultivos celulares y en tumores, así como su asociación con la activación del SAC y con la respuesta al tratamiento basado en cisplatino.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 🍏 Estudiar la expresión de MAD2 γ en líneas celulares de distintos tipos de cáncer y en cultivos primarios de células no cancerosas.
- 🍏 Determinar la localización intracelular de MAD2 γ .
- 🍏 Estudiar el efecto de la expresión de MAD2 γ en la activación del SAC .
- 🍏 Estudiar la expresión de MAD2 γ en muestras de tumores de células germinales de testículo y determinar la asociación con la respuesta sensible o resistente al tratamiento con la quimioterapia basada en cisplatino.

MÉTODOS

LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares de cáncer HeLa, SiHa y C33A (cáncer cervicouterino); T24 y 1A6 (cáncer de vejiga); NT2-D1 (cáncer de testículo); y U373 (glioblastoma), fueron cultivadas con medio DMEM (Life Technologies, Inc. Massachusetts, USA). En tanto, las líneas HCT116 y HT29 (cáncer de colon) fueron mantenidas en medio de cultivo McCoy's 5A (Life Technologies, Inc. Massachusetts, USA). Por su parte, cultivos primarios de fibroblastos no cancerosos fueron cultivados hasta el pasaje 9 en medio DMEM-F12 (Life Technologies, Inc. Massachusetts, USA). Estos medios fueron suplementados con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 1% de antibióticos/antimicóticos (Life Technologies, Inc. Massachusetts, USA); y los cultivos fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Por otra parte, las líneas SW48 y SW480 (cáncer de colon) fueron mantenidas en medio Leibovitz (Life Technologies, Inc. Massachusetts, USA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), 1% de antibióticos/antimicóticos y a una temperatura de 37°C.

MUESTRAS DE TUMORES DE CÉLULAS GERMINALES DE TESTÍCULO

En un estudio previo en nuestro laboratorio se describió el reclutamiento de los pacientes con cáncer de testículo de células germinales en el Instituto Nacional de Cancerología, así como los criterios clínicos empleados para determinar la sensibilidad o resistencia a la quimioterapia basada en cisplatino⁴⁸. Brevemente, todos los pacientes tuvieron un esquema de quimioterapia de tres o cuatro ciclos de bleomicina-etopósido-cisplatino (BEP). Un oncólogo del Instituto determinó la respuesta bioquímica a la quimioterapia a través de biomarcadores tumorales específicos: α -fetoproteína, la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana y la deshidrogenasa láctica. Después del tercer o cuarto ciclo de quimioterapia, la respuesta fue evaluada con los

marcadores tumorales y con tomografía computarizada de tórax y abdomen. Los pacientes fueron clasificados como sensibles al tratamiento si presentaron una respuesta completa, sin evidencia de lesiones residuales, o bien si tuvieron una resección quirúrgica completa de las lesiones residuales, negativos a los marcadores tumorales y si la histopatología mostró necrosis, fibrosis o teratoma maduro. Por el contrario, los pacientes fueron clasificados como resistentes si presentaban persistencia a los marcadores tumorales, enfermedad residual no resecable o si mostraron progresión. El proyecto fue sometido y aprobado por el Comité de Ética del Instituto y los pacientes firmaron consentimiento informado. En este estudio se contó con 59 muestras de tumor, 36 de ellas de pacientes sensibles al tratamiento y las restantes 23, de pacientes resistentes al tratamiento.

EXTRACCIÓN DE RNA, RT-PCRS CUANTITATIVOS Y SEMICUANTITATIVOS

Se extrajo el RNA total de las líneas celulares de cáncer y de los cultivos primarios de fibroblastos no cancerosos a través del *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN Co., Limburg, Netherlands). Por otro lado, el RNA total de los tumores primarios fue extraído usando *TRIzol* (Life Technologies, Inc. Massachusetts, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los niveles de expresión de todas las isoformas de MAD2 fueron evaluadas por RT-PCR semicuantitativo, usando un oligonucleótido sentido dirigido al exón 1 (5' - TAAGCTTAAGCCATGGCGCTGCAGCTC - 3') y un oligonucleótido antisentido que dirigido al exón 5 (5' - CGGATCCTCAGTCATTGACAGGAATTTTGTAGG - 3'), donde las secuencias subrayadas corresponden a sitios de restricción *HindIII* y *BamHI* respectivamente (**Figura 6**). Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo de 94°C / 2'; 30 ciclos de 94°C / 30" - 74°C / 30" - 72°C / 30" y 1 ciclo de 72°C / 5'. La amplificación de β -Actina fue usada como referencia. La amplificación específica de MAD2 γ fue realizada a través de otro oligonucleótido sentido que flanquea dirigido al exón 1 (5' - GGGAGCAGGGAATCACC - 3') y de un oligonucleótido antisentido que hibrida con el empalme de los exones 1 y 4 (5' - CTCTGGGTGCAAGAAGAACTC - 3'). Las condiciones

de PCR fueron así: 1 ciclo de 94°C / 2'; 30 ciclos de 94°C / 30'' - 64°C / 30'' - 72°C / 30'' y 1 ciclo de 72°C / 5'. Por otro lado, la expresión de MAD2 γ y MAD2 α en los tumores y en HCT116 se midió de forma cuantitativa por RT-PCR en tiempo real, usando sondas Taqman y oligonucleótidos diseñados mediante el software *Primer Express 3.0* (Life Technologies, Inc. Massachusetts, USA). Para MAD2 γ la secuencia de la sonda fue VIC - CGAGTTCTTCTTGCACCCA, el oligonucleótido sentido fue 5' - GGGAGCGCCGAAATCG - 3' y el oligonucleótido antisentido fue 5' - CCTGGATAGCTTTCTGAGACTTTTCT - 3'. Para MAD2 α , la secuencia de la sonda fue VIC - NED - ATTGAGTGTGACAAGACT, la del oligonucleótido sentido fue 5' - CCTGGAAAGATGGCAGTTTGA - 3' y la del oligonucleótido antisentido fue 5' - TGGGTGCACTGTCATCTTTTG - 3'. Las condiciones de PCR fueron: 50°C/2'; 95°C/10' y 40 ciclos de 95°C/30'' - 60°C/1'. La amplificación de HPRT fue usada como referencia (Hs99999909_m1, Cat. 4331182 from Life Technologies, Inc. Massachusetts, USA.). Los datos de cuantificación relativa se analizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS Y TRANSFECCIONES ESTABLES

Para construir el vector de expresión de MAD2 γ , se amplificó la región codificante de esta isoforma a partir del cDNA proveniente de la retro-transcripción del RNA total de HCT116 y se insertó en el vector pcDNA 3.0. A su vez, de esta construcción se subclonó el inserto de MAD2 γ en el vector VL3-Flag-MAD2, del que previamente la secuencia de MAD2 α fue removida. El vector original VL3-Flag-MAD2 fue donado por el Dr. Robert Benezra (Addgene #16047, Massachusetts, USA) ⁴⁹. Posteriormente, la línea celular HCT116 fue transfectada con las construcciones pcDNA-MAD2 γ , VL3-Flag-MAD2 γ y con el vector vacío pcDNA 3.0, usando lipofectamina LTX y reactivo PLUS (Life Technologies, Inc., Massachusetts, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las transfectantes estables de HCT116, denominadas como HCT116/MAD2 γ y HCT116/pcDNA, fueron seleccionadas con 800 μ g/ml de G418 (Promega Corp. Wisconsin, USA)

por 3 semanas y fueron mantenidas posteriormente con medio completo suplementado además con 100 µg/ml de G418.

EVALUACIÓN DEL ÍNDICE MITÓTICO

Se sembraron 300,000 células de HCT116, HCT116/MAD2 γ y HCT116/pcDNA en placas de 6 pozos, por triplicado, por 24 h. Las células se sincronizaron en la fase de ciclo celular G1-S usando doble bloqueo con timidina 2 mM (Sigma-Aldrich Co., Missouri, USA), cada bloqueo fue de 12 h y entre ambos bloqueos las células se incubaron con medio fresco libre de timidina por 12 h. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS dos veces y luego se incubaron en medio que contenía 100 nM de taxol por 12 h para de esta manera activar la vía SAC. Después de las 12 h con taxol las células fueron incubadas con una solución hipotónica (HEPES 10 mM, EGTA 260 nM, KCl 40 mM) por 30 min, luego fueron colectadas en tubos cónicos para fijarlas con una solución fría de Metanol/Ácido acético (3:1) a -20°C por 30 min. Las células fijadas fueron lavadas tres veces con la misma solución de fijación y colocadas en portaobjetos en frío, se dejaron secar y después se tiñeron con eosina y azul de metileno. Posteriormente, las células fueron contadas, tanto las interfásicas como las mitóticas, a través de la plataforma de escaneo *Metafer-4* (Metasystems GmbH, Altlusheim, Alemania), el cual está montado en un microscopio vertical motorizado Axio-imager Z2 (Carl Zeiss AG, Jena, Alemania). Los índices mitóticos fueron determinados como el porcentaje de la relación de células mitóticas entre el total de células contadas.

ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD Y TRATAMIENTOS CON CISPLATINO

El concentración IC₅₀ para cisplatino en HCT116 fue determinada usando el ensayo de viabilidad con sulforodamina B (SRB) ⁵⁰. Brevemente, se sembraron 3000 células en placas de 96 pozos y se incubaron por 24 h. A continuación, las células fueron tratadas con distintas concentraciones de cisplatino (Technoplatin, Columbia Lab, México) por

otras 24 h. Luego del tratamiento, las células fueron fijadas con una solución fría (4°C) de ácido tricloroacético al 10% (peso/volumen) por 1 h. Inmediatamente después, las células fueron lavadas, se dejaron secar y se tiñeron con SRB por 30 min, el exceso de tinción fue lavado con una solución de ácido acético al 1% (vol/vol). Después de dejarse secar, el SRB que está adherido a las proteínas se disuelve en Tris-Base 10 mM para luego determinar la OD a 510 nm en un lector de placas. El análisis se realizó por triplicado en tres experimentos independientes y el IC₅₀ se calculó usando una regresión lineal de los datos de dosis-respuesta. Posteriormente, para evaluar la expresión relativa de MAD2 γ y MAD2 α en HCT116 en respuesta al tratamiento con cisplatino, se sembraron 300,000 células en placas de 6 pozos y se incubaron por 24 h. A continuación, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de cisplatino (10, 20, 25, 30 y 35 μ M) y se incubaron por 24 h antes de la extracción de RNA total y de los ensayos de RT-PCR en tiempo real. Los experimentos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT

Las proteínas totales fueron extraídas resuspendiendo las células en un buffer de lisis (50 mM HEPES, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% NP40) que contiene inhibidores de proteasas y fosfatasas (EZBlockTM, AMS, Biotechnology, Abingdon, UK). Por otro lado, las proteínas de las fracciones nuclear y citoplasmática fueron extraídas usando el *Chemicon's Nuclear Extraction Kit* (Millipore Corp, Cat 2900, Darmstadt, Alemania), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de proteínas fue determinada usando el *DC Protein Assay kit* (Bio-Rad Inc., California, USA). Para la electroforesis se usaron cantidades iguales de proteína en un gel de poliacrilamida-SDS al 18% y luego las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF (Immobilon-P, Millipore Corp. Darmstadt, Alemania). Para el Western-blot, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios MAD2-N19 y β -Actina (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) toda la noche. Después de la incubación con los anticuerpos

secundarios correspondientes, la señal fue visualizada usando el sustrato de peroxidasa *Novex Chemiluminescent HRP substrate* (Life Technologies, Inc., Massachusetts, USA.).

INMUNOFLUORESCENCIAS

Para las inmunofluorescencias de MAD2 α se utilizó el anticuerpo primario policlonal de abcam rabbit anti-MAD2L1 (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 proteína 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 por 20 minutos con formaldehído al 3.7 % y se permeabilizaron con tritón X-100 al 0.5% por 15 minutos. Las células se bloquearon con BSA al 5% (Fraction V, Sigma A2059) por 1 hora y posteriormente se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo ACA en una dilución 1:200. Posteriormente se incubó con el anticuerpo anti-MAD2 en dilución 1:200 por 24 horas a 4°C. El anticuerpo TRITC anti-rabbit se utilizó por 1.5 h en una dilución 1:50 a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se montaron en laminillas con medio de montaje para fluorescencia Vectashield:Vectashield con DAPI 4:1 (Vector laboratorios H-1000, H-1200). Por otro lado, para la inmunofluorescencias de MAD2 γ , se utilizó el anticuerpo policlonal goat anti-DDDDK tag (anti-FLAG) acoplado a FITC (Abcam, ab1259, 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 toda la noche a 4°C en una dilución 1:1000 en suero normal de cabra al 5%. Para las inmunofluorescencias dobles 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.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significancia estadística de las diferencias entre los índices mitóticos de las células que sobre expresan MAD2 γ y las células control fue analizada usando las pruebas de Kruskal-Wallis y t de Student. Por su parte, las diferencias en los niveles de expresión endógena de MAD2 γ y MAD2 α en HCT116, en respuesta al tratamiento con las concentraciones crecientes de cisplatino, fueron analizadas usando una prueba de ANOVA de dos colas. Para comparar los niveles de expresión de MAD2 γ y MAD2 α en los pacientes con cáncer de testículo de células germinales, entre el grupo de pacientes resistentes al tratamiento y los sensibles al mismo, se usó una prueba de Mann-Whitney, considerando significativamente estadístico un valor de $P \leq 0.05$. El punto de corte usado para distinguir la sobreexpresión y subexpresión de MAD2 γ y MAD2 α (basado en la cuantificación relativa) entre los dos grupos de pacientes, fue calculado usando una curva ROC (*receiver operating characteristic*), la cual es usada en la investigación biomédica para evaluar efectividad de un biomarcador que distingue a los individuos con cierta condición médica de aquellos que no la tienen, en este caso la resistencia cisplatino ⁵¹. La efectividad es determinada calculando el área bajo la curva (AUC), donde 0.5 es discriminación aleatoria y 1.0 es discriminación perfecta. El índice de Youden (J) es la distancia vertical máxima entre la curva ROC y la diagonal o línea de variación aleatoria y es comúnmente usado para establecer el punto de corte óptimo ^{52,53}. Este índice es una medida de la efectividad global del biomarcador, es una función de la sensibilidad y especificidad y ocurre en el punto de corte óptimo (C) que determina si un paciente es resistente ⁵². Con dicho punto de corte se estimó mediante un modelo de regresión logística la asociación cruda y ajustada entre MAD2 γ y la respuesta al cisplatino. Los datos se analizaron mediante los programas *Stata V.12* (Texas, USA) y *GraphPad-Prism V.6*. (California, USA).

RESULTADOS

MAD2 γ SE EXPRESA EN DIFERENTES CULTIVOS CELULARES

Con el objetivo de conocer el estatus de expresión general de MAD2 en tipos de cáncer de distinto origen, se usaron diferentes líneas celulares de cáncer y también cultivos primarios de fibroblastos, provenientes de tejido sano (pases 4 y 9). Por medio de RT-PCR semicuantitativo y usando un par de oligonucleótidos dirigidos a los exones 1 y 5 como se muestra en la **figura 6A**, obtenemos una serie de productos de PCR mostrados en la **Figura 7**. Además de la esperada banda de aproximadamente 620 pb, correspondiente a MAD2 α , observamos otras dos bandas amplificadas. La secuenciación de estas bandas reveló que la de 620 pb (la superior) efectivamente correspondía al gen MAD2L1, previamente descrito por Li y colaboradores ², es decir MAD2 α (**Figura 6A**). La segunda banda en la **Figura 7**, de aproximadamente 500 pb correspondía a la secuencia de MAD2L1, pero sin el exón 3, es decir correspondía a la secuencia de MAD2 β , que como ya mencionamos en la introducción, es la isoforma de MAD2 reportada previamente por Yin y colaboradores ²⁷ (**Figura 6B**). Finalmente, la tercera banda en la **Figura 7**, de aproximadamente 350 pb correspondía a una secuencia de MAD2L1 que carecía de los exones 2 y 3 (**Figura 6C**). Usando las bases de datos *Genome Browser* de la Universidad de California, Santa Cruz (UCSC) y *GenBank*, determinamos que este transcrito corresponde a una secuencia EST (*expressed sequence tag*) generada por el proceso de *empalme alternativo de exones* del gen MAD2L1 [GenBank: BP368492]. En base a este análisis de secuencias, podemos confirmar la identificación de una tercera isoforma de MAD2L1 a la que hemos llamado MAD2 γ . Esta nueva isoforma contiene un marco de lectura abierto de 126 pb con el que se predice un producto peptídico de 41 aminoácidos. Como podemos observar en la **figura 7**, las isoformas MAD2 β y MAD2 γ se expresan a distintos niveles en los diferentes cultivos celulares. Específicamente, la expresión de MAD2 γ es más alta en

HCT116 (cáncer colorectal); SiHa (cáncer de cérvix); T24 y 1A6 (cáncer de vejiga); U373 (glioblastoma) y T47D (cáncer de mama). En contraste, la expresión de MAD2 γ es menor en las líneas SW48, HT29 y SW480 (cáncer de colon); HeLa y C33A (cáncer de cérvix); y NT2-D1 (cáncer de testículo). La expresión de MAD2 γ también es baja en los cultivos primarios de fibroblastos de tejido sano.

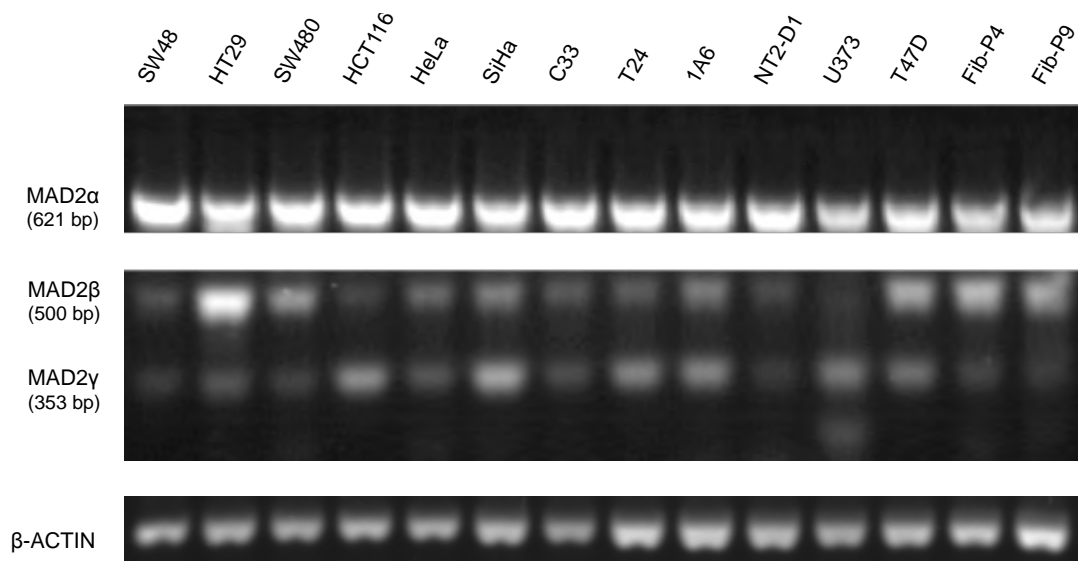


Figura 7. Expresión de las isoformas de MAD2 en múltiples líneas celulares de cáncer y en cultivos primarios de fibroblastos de tejido sano.

Las tres isoformas de MAD2 fueron amplificadas simultáneamente a través de oligonucleótidos que hibridan en el exón 1 y 5. A través de secuenciación, se determinó que las bandas de 621 pb y 500 pb correspondían a MAD2L1 (MAD2 α)² y MAD2 β ²⁷ respectivamente, mientras que la tercera banda, la mas pequeña, correspondía a la secuencia EST de GenBank BP368492. La amplificación de β -Actina fue usada como control interno. Las tres isoformas se expresan de forma diferencial entre las distintas líneas celulares. Específicamente, la expresión de MAD2 γ es mas alta en las líneas celulares de cáncer HCT116 (colon); SiHa (cérvix); T24 y 1A6 (vejiga); U373 (glioblastoma) y T47D (mama). Por el contrario, la expresión de MAD2 γ es mas baja en las líneas celulares SW48, HT29 y SW480 (colon); HeLa y C33 (cérvix); NT2-D1 (testículo) y en cultivos primarios de fibroblastos no cancerosos (Fib-P4 y Fib-P9).

LA EXPRESIÓN EXÓGENA DE MAD2 γ DISMINUYE EL ÍNDICE MITÓTICO

Como se ha indicado anteriormente, MAD2 α es un regulador importantísimo de la vía SAC, de modo que su inactivación o expresión aberrante es causa de errores en el funcionamiento de dicha vía y por tanto en la segregación cromosómica ^{2,54,55}. Es por ello que quisimos estudiar el papel que pudiera tener MAD2 γ en la activación de la vía SAC y para ello evaluamos el índice mitótico en HCT116, la cual fue elegida por tener una vía SAC funcional. Ésta es una línea celular con estabilidad cromosómica y un cariotipo prácticamente diploide ^{56,57}. HCT116 fue transfectada con la construcción pcDNA-MAD2 γ y el vector vacío pcDNA, la expresión exógena fue confirmada por RT-PCR y Western-blot (**Figuras 8A y 8B**). Después de 48 h, las células fueron tratadas con taxol al 100 nM, el cual es un agente que desestabiliza la dinámica de los microtúbulos del huso mitótico y por tanto activa la vía SAC. El resultado de este tratamiento fue que la sobreexpresión de MAD2 γ disminuyó el índice mitótico en comparación con las células no transfectadas o las transfectadas con el vector vacío (**Figura 8C**). Este hallazgo sugiere que MAD2 γ y MAD2 α podrían estar jugando papeles opuestos en la activación de la vía SAC, es decir, la activación de dicha vía es menos eficiente en las células que sobre expresan MAD2 γ en comparación con las células que no tienen esta sobre expresión. Al parecer, MAD2 γ está afectando la activación eficiente del SAC, impidiendo el arresto en mitosis en presencia de un agente que perturba la dinámica de los microtúbulos.

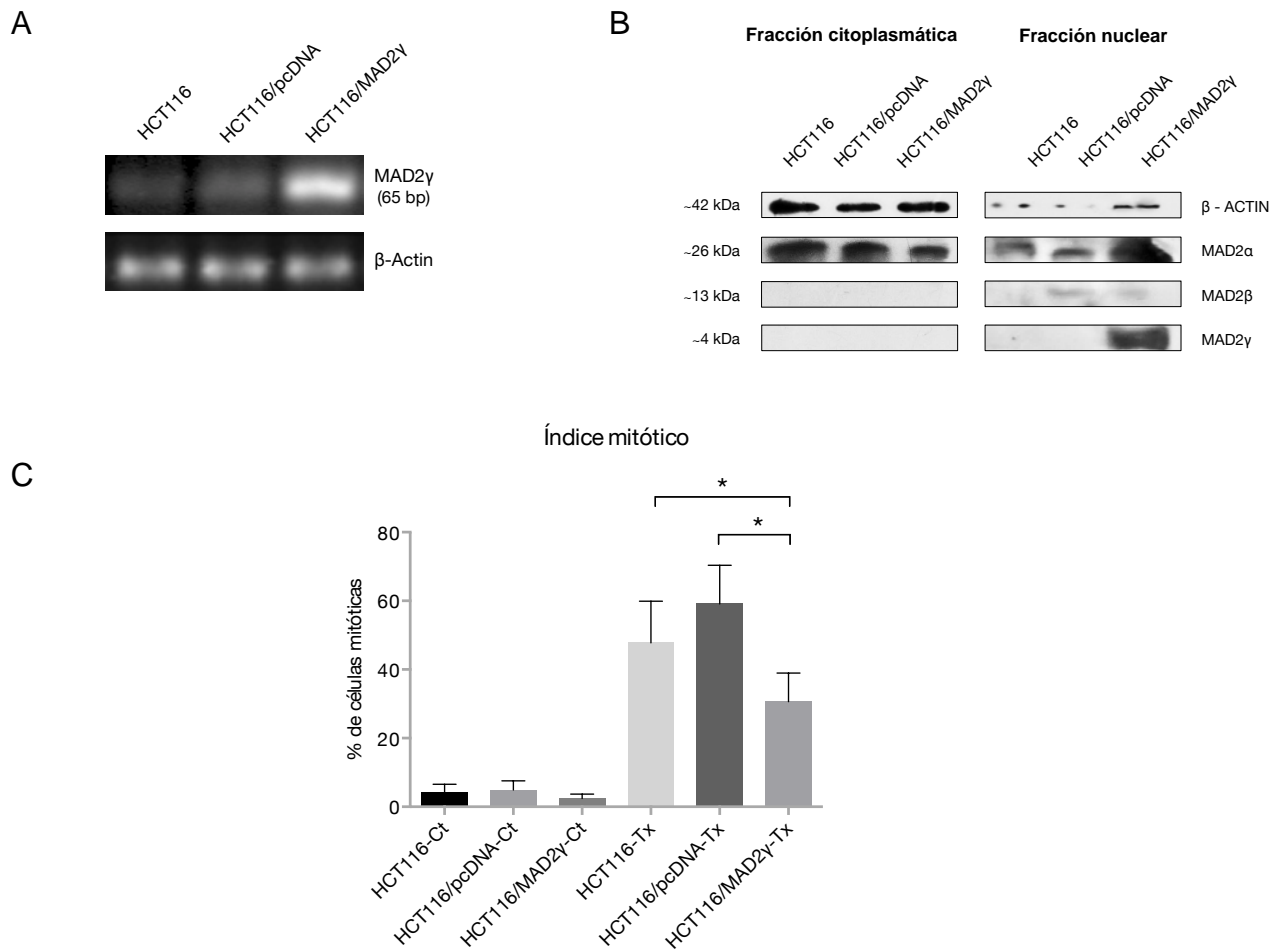


Figura 8. La expresión exógena de MAD γ en la línea celular HCT116

(A) El nivel de expresión de MAD γ fue evaluado por RT-PCR semicuantitativo, usando oligonucleótidos específicos dirigidos al exón 1 (sentido) y al empalme de los exones 1 y 4 (antisentido). (B) Los niveles proteicos fueron detectados por Western-blot usando el anticuerpo policlonal N-19 contra MAD2 (Santa Cruz, sc-6330), el cual reconoce el N-terminal de MAD2. (C) Cuando las células fueron tratadas con taxol (Tx) 100 nM por 12 h, el índice mitótico disminuyó significativamente en las células que sobreexpresan MAD2 γ , en comparación con las células no transfectadas (HCT116-Tx, P= 0.03) o con las transfectadas con el vector vacío (HCT116/pcDNA - Tx, P = 0.0001).

LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE MAD2 γ EN HCT116

El Western-blot de la **Figura 8B** reveló que MAD2 γ se encontró exclusivamente en la fracción nuclear de las células transfectadas con el vector de expresión de esta isoforma, mientras que MAD2 α se encontró tanto en el núcleo como en el citoplasma. De hecho, varios estudios han reportado la localización de MAD2 α en el núcleo, en el citoplasma o en ambos, dependiendo de la línea celular, del tumor estudiado o hasta del subtipo histológico de este ^{24,34,40,45,46}. MAD2, en asociación con MAD1, se ha observado también en la envoltura nuclear debido a que interactúa con el complejo del poro nuclear ⁵⁸⁻⁶¹. Para estudiar la localización intracelular de MAD2 γ , la línea celular HCT116 fue transfectada con la construcción Flag-MAD2 γ y como se observa en la **Figura 9**, la inmunofluorescencia contra el péptido etiqueta FLAG confirmó la localización nuclear de MAD2 γ en el núcleo, tal como se preveía en el Western-blot.

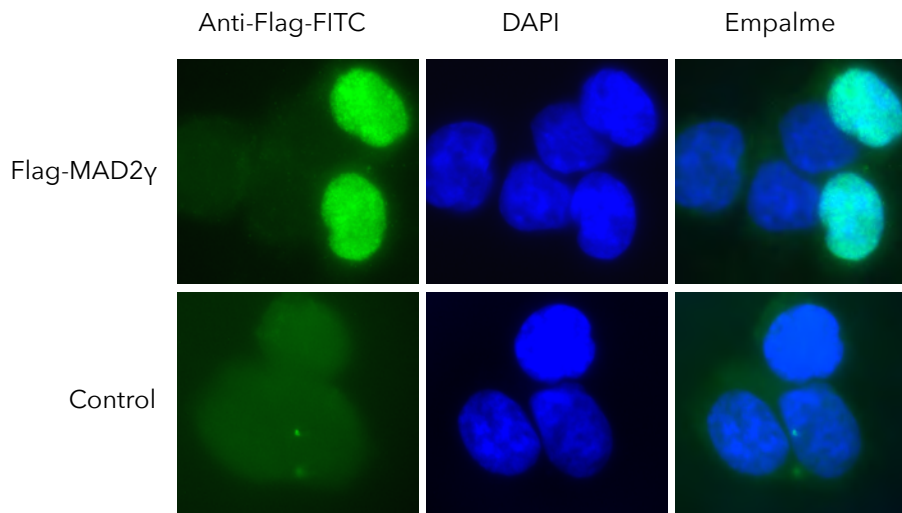


Figura 9. La localización intracelular de MAD2 γ

La línea celular HCT116 fue transfectada con la construcción Flag-MAD2 γ (eficiencia de transfección de aproximadamente 50%). Después de 48 h las células fueron fijadas y MAD2 γ fue detectada por inmunofluorescencia usando el anticuerpo *FITC-coupled-anti-DDDK tag* (ab1259, Abcam, Biotech Co., Cambridge, UK), el cual reconoce al péptido etiqueta FLAG. MAD2 γ se localizó en el núcleo de las células.

LA EXPRESIÓN DE MAD2 γ ESTÁ ASOCIADA A LA QUIMIORRESISTENCIA A CISPLATINO EN PACIENTES CON CÁNCER DE TESTÍCULO DE CÉLULAS GERMINALES

Como se mencionó en la sección de Antecedentes, los defectos en la vía SAC se han asociado con resistencia a agentes quimioterapéuticos que inhiben la dinámica de microtúbulos o bien dañan el DNA ^{22,62,63} y por otro lado, MAD2 se ha asociado con la respuesta al daño al DNA ^{22,28,64}, en particular los altos niveles de MAD2 se han asociado a la resistencia a cisplatino, tanto in vitro como in vivo ^{24,25,28}. Se ha propuesto que el dominio N-terminal de MAD2 es importante en esta asociación, ya que este interactúa con proteínas involucradas en la reparación del DNA, específicamente XPD y ERCC1 ¹⁹. Por tanto, dado que MAD2 γ conserva el dominio N-terminal de MAD2 y que además como hemos visto, su sobre expresión inhibe la activación de la vía SAC, pensamos que la expresión de MAD2 γ podría estar relacionada con la respuesta a cisplatino, un agente quimioterapéutico que daña el DNA. Para probar esta hipótesis, usamos muestras de tumores primarios de pacientes con cáncer de testículo de células germinales (TCGT). La sensibilidad a la quimioterapia basada en cisplatino en cáncer de testículo es ampliamente conocida, se sabe que cerca del 80% de los pacientes responden exitosamente a esta terapia ⁴⁷, aunque aún hay un 20% de estos pacientes que resistente al tratamiento. Por tanto, el cáncer de testículo es un buen modelo para estudiar los mecanismos celulares involucrados en el desarrollo de resistencia o sensibilidad a la quimioterapia. Las muestras de pacientes se agruparon en resistentes y sensibles a la terapia basada en cisplatino, de acuerdo a criterios clínicos previamente descritos ⁴⁸. Analizamos la expresión endógena de MAD2 α y MAD2 γ en ambos grupos de pacientes por RT-PCR cuantitativo en tiempo real. Como se mencionó en la sección de métodos, el punto de corte para definir sobreexpresión o subexpresión no fue elegido de forma arbitraria, sino que se hizo un análisis de la curva ROC para calcular el área bajo la curva (AUC) y determinar el punto de corte en la curva usando el índice de Youden (J). El valor AUC fue de 0.6962 (95% CI [0.569, 0.822]) y el mejor punto de corte para comparar la cuantificación relativa de la expresión de MAD2 γ fue de 3.091 (J =

0.3923) (**Figura 10A**). Por encima de este punto de corte, la expresión endógena de MAD2 γ fue significativamente más alta en el grupo de pacientes que presentaron resistencia a la terapia basada en cisplatino, aproximadamente el 70% de los pacientes resistentes, mientras que solo el 30% de los pacientes sensibles a la terapia sobreexpresaron esta isoforma, $P=0.003$ (**Figura 10B**). Estos resultados sugieren que los pacientes que sobreexpresan MAD2 γ tienen más probabilidad de presentar resistencia a la quimioterapia (OR = 5.25, 95% CI [1.623783, 16.97425], $P = 0.006$). En contraste, los niveles de expresión relativa de MAD2 α entre los pacientes sensibles y resistentes al tratamiento, no mostraron diferencias significativas, $P = 0.98$ (punto de corte = 1.33; AUC = 0.4032, 95% CI [0.269, 0.538]; J = 0.1315) (**Figura 10C**). Por tanto, solamente la sobreexpresión de MAD2 γ está asociada con la resistencia a la terapia basada en cisplatino.

LA EXPRESIÓN DE MAD2 γ INCREMENTA EN HCT116 EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON CISPLATINO

La línea celular HCT116 fue expuesta a distintas concentraciones de cisplatino por 24 h y posteriormente se midió la expresión relativa de MAD2 α y MAD2 γ por QRT-PCR. Observamos un incremento significativo en los niveles endógenos de MAD2 γ , dosis-dependiente, en respuesta al cisplatino, especialmente alrededor del valor de IC_{50} a 24 h ($IC_{50} = 29 \mu M$). Por el contrario, la expresión endógena de MAD2 α aumentó solo muy ligera y no significativamente (**Figura 11**). Estos hallazgos sugieren que las células que sobrevivieron por encima de la concentración IC_{50} , es decir las que resistieron al tratamiento, respondieron mediante la sobre expresión de MAD2 γ . Este dato concuerda con los hallazgos en pacientes con TCGT, donde solo MAD2 γ está incrementada en los pacientes resistentes a la terapia basada en cisplatino.

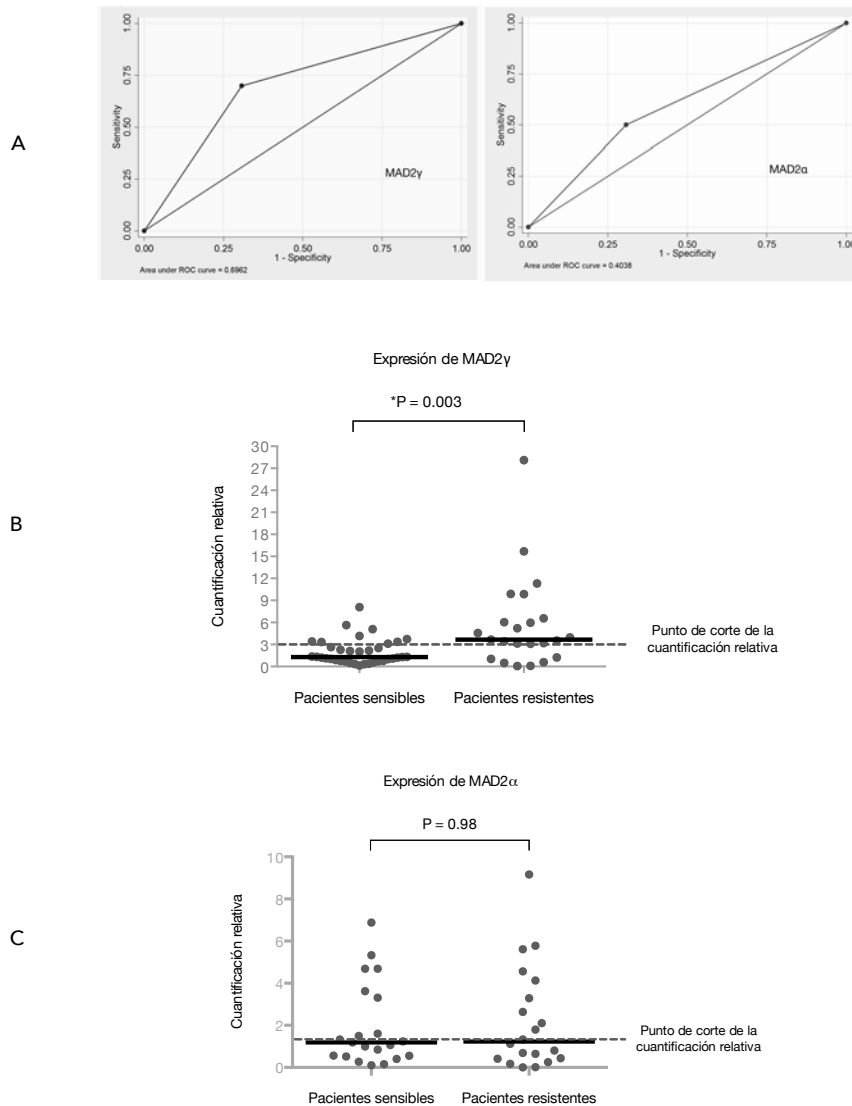


Figura 10. La expresión endógena de MAD2 γ y MAD2 α en pacientes con cáncer de testículo de células germinales (A) Se empleó una curva de ROC y el índice de Youden (J) para determinar el punto de corte óptimo que distinga la expresión de las isoformas de MAD2 entre pacientes sensibles y resistentes al tratamiento. El punto de corte para MAD2 γ fue de 3.09 y para MAD2 α fue de 1.33 (B) y (C) Al realizar la cuantificación relativa de las isoformas de MAD2 por RT-PCR cuantitativo en tiempo real se observó que MAD2 γ se sobreexpresa en el 70% de los pacientes resistentes al tratamiento, mientras que solo el 30% de los pacientes sensibles al tratamiento sobreexpusieron MAD2 γ . No hubo diferencias significativas en los niveles de MAD2 α entre los dos grupos de pacientes.

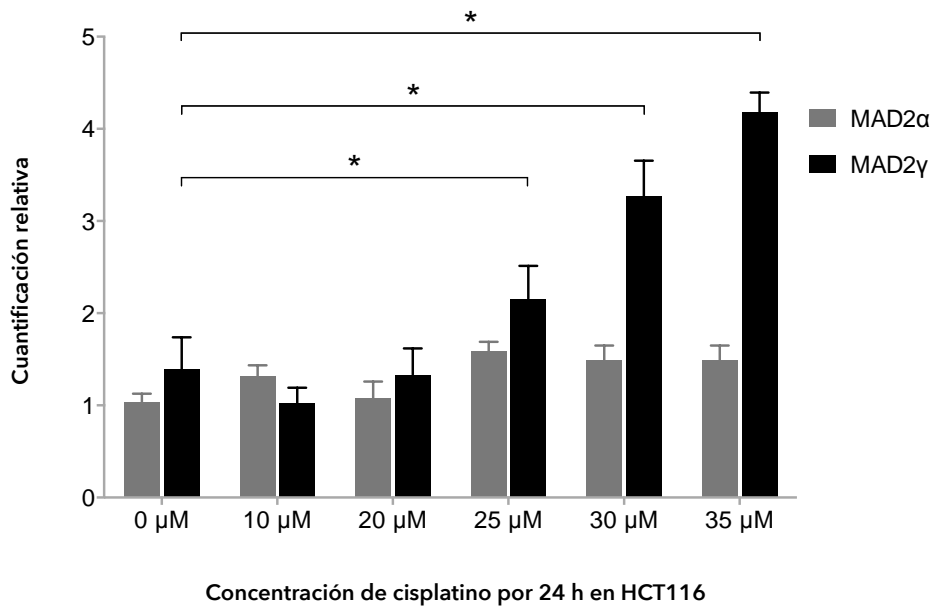


Figura 11. La expresión endógena de MAD2 γ y MAD2 α en HCT116, en respuesta al tratamiento con cisplatino

La línea celular HCT116 fue expuesta a distintas concentraciones de cisplatino por 24 h y posteriormente los niveles endógenos del transcrito de MAD2 γ y MAD2 α fueron medidos por RT-PCR cuantitativo en tiempo real. Las células tratadas con cisplatino mostraron un incremento significativo en la expresión de MAD2 γ , en especial cuando fueron tratadas con la concentración IC₅₀ o mayor (IC₅₀ = 29 μ M). En contraste, los niveles endógenos de MAD2 α incrementaron ligeramente y sin significancia estadística.

DISCUSIÓN

En el presente estudio hemos identificado una nueva isoforma de MAD2, a la que hemos nombrado MAD2 γ . Esta isoforma se expresó en distintos niveles en varias líneas celulares de cáncer y en cultivos primarios de fibroblastos de tejido sano (**Figura 7**). También observamos que la isoforma MAD2 β , reportada previamente por Yin y colaboradores ²⁷, está presente en todas las líneas celulares de cáncer. La expresión de MAD2 β es más alta en las líneas celulares de cáncer de colon HT29 y SW480, la línea del cáncer de mama T47D y también en los fibroblastos normales. En varias líneas

celulares observamos una relación inversa entre los niveles de MAD2 β y MAD2 γ y desconocemos la razón. Yin y colaboradores ²⁷ observaron una relación inversa similar entre los niveles de MAD2 α y MAD2 β y sugirieron que el proceso de *empalme alternativo de exones* no solo cambia la estructura de los transcritos y de las proteínas codificadas, sino que también regula la cantidad de los transcritos. Esta sugerencia es consistente con otros genes, tales como aquellos que codifican para la proteína SR (*splicing regulator*) SC35 y la tipo-SR HTRA2- β 1, donde ambas pueden regular la selección del sitio de empalme de los exones en el transcrito, dependiendo de la concentración de las proteínas ^{65,66}. Sin embargo, como se muestra en las **Figuras 10 y 11**, no detectamos tal relación inversa en los niveles de MAD2 α y MAD2 γ entre los pacientes sensibles y resistentes al tratamiento con cisplatino, ni en HCT116. No obstante, en este estudio no analizamos los niveles de expresión de MAD2 β y sería interesante investigar si existe una interrelación entre los niveles de expresión de MAD2 β y MAD2 γ .

Posteriormente analizamos el papel que MAD2 γ pudiera tener en la regulación del SAC mediante la expresión exógena de esta isoforma en una línea celular con una vía SAC funcional, HCT116 ^{56,57}. Observamos que las células que sobreexpresaban MAD2 γ presentaban un menor índice mitótico (**Figura 8C**). Este resultado sugiere que MAD2 γ y MAD2 α podrían tener funciones opuestas en la regulación de la vía SAC cuando los niveles de MAD2 γ sean mayores que los niveles de MAD2 α . A este respecto, se ha observado que el proceso de *empalme alternativo de exones* en otros componentes de la vía SAC también compromete su función normal. Sze y colaboradores ⁶⁷ reportaron una isoforma de MAD1, a la que llamaron MAD1 β , que afectaba el SAC y que causaba la formación de puentes anafásicos y un número aberrante de cromosomas cuando se sobre expresaba en líneas celulares de hepatoma tratadas con agentes inhibidores de la dinámica de microtúbulos del huso mitótico. Los autores sugirieron que MAD1 β podría tener una función opuesta a MAD1 α en el control de la vía SAC en la hepato-carcinogénesis. Por otro lado, Yin y colaboradores, como ya

hemos mencionado ²⁷, observaron que la sobreexpresión de MAD2 β en líneas celulares de cáncer gástrico tratadas con adriamicina y vincristina disminuía también el índice mitótico y la apoptosis. Los autores sugirieron que esta deficiencia en la vía SAC promovía la resistencia a largo plazo a la quimioterapia en las células de cáncer gástrico. Estas hipótesis a su vez concuerdan con estudios cada vez más numerosos, en donde se ha reconocido a la activación de la vía SAC y al arresto prolongado en mitosis como alternativas efectivas en la terapia contra el cáncer ^{20,23,62}. Esto debido a que se ha observado una eficacia clínica limitada para aquellos fármacos dirigidos a la maquinaria que regula la entrada a ciclo celular (fase G1) y la síntesis del DNA (fase S). Es decir, aun no es claro hasta qué punto el uso de estos fármacos resulta realmente en muerte celular o solo en un arresto de la proliferación de las células tumorales, permitiendo la generación de células quiascentes, pero viables. Es por ello que se ha propuesto que al bloquear la mitosis, es decir, causando un arresto prolongado, se pueden encender vías pro-apoptóticas a través de la fosforilación de BCL-XL y BCL2 por los complejos CICLINA B - CDK1; o también a través de la activación de BAX y BAK, también por CDK1, por citar unos ejemplos ²⁰. Ejemplos de fármacos antineoplásicos que pueden lograr el arresto prolongado en mitosis son aquellos que inhiben la dinámica del huso mitótico, como los taxanos, pero también aquellos que inducen daño al DNA, incluyendo aquellos dirigidos contra la actividad de la topoisomerasa. De hecho, evidencia reciente demuestra que para inducir muerte a través de daño al DNA, se requiere de un SAC funcional ^{22, 63}. Por tanto, una vía SAC alterada no puede promover un arresto prolongado en mitosis, lo que explicaría la disminución del índice mitótico en las células HCT116 que sobre expresan MAD2 γ y a su vez, la vía SAC alterada contribuye a la quimiorresistencia a los agentes que dañan el DNA ⁶². Esto es consistente con nuestras observaciones en los pacientes con cáncer de células germinales de testículo y en la propia línea celular HCT116: La mayoría de los pacientes resistentes a la quimioterapia basada en cisplatino sobre expresaron significativamente a MAD2 γ en comparación con los pacientes sensibles a la terapia y en el caso de

HCT116, aquellas células que resistieron al tratamiento a cisplatino por arriba del IC₅₀ respondieron con un aumento significativo de los niveles endógenos de MAD2 γ .

Por otro lado, MAD2 γ fue detectada en el núcleo de las células cuando fue expresada exógenamente en HCT116. Se ha reportado en distintos estudios que MAD2 se localiza tanto en el núcleo, como en el citoplasma, o en ambos compartimentos, dependiendo de la línea celular, la muestra tumoral y el subtipo histológico^{24,34,40,45,46}. También se sabe que MAD2 puede estar en la envoltura nuclear, esto debido a que interactúa con el complejo del poro nuclear (NPC)⁵⁸⁻⁶¹. Lee y colaboradores⁵⁹ reportaron que Tpr, un componente del NPC interactúa con MAD2 y que el dominio C-terminal de MAD2 es necesario para esta interacción. De hecho, al inhibir a TPR la localización de MAD2 cambió del NPC al núcleo, lo que disminuyó la unión de MAD2 con MAD1 y con CDC20 y en consecuencia también se indujo anafase prematura y errores en la segregación cromosómica. Esto indica que la interacción entre el C-terminal de MAD2 α y TPR es importante para la localización intracelular y funcionamiento adecuado de MAD2. Dado que MAD2 γ carece del dominio C-terminal de MAD2 α , se esperaría entonces que MAD2 γ se localizará en el núcleo. Sería interesante determinar si la localización intracelular de MAD2 γ podría afectar la función normal de MAD2 α .

No sabemos si el proceso de *empalme alternativo de exones* en los transcritos que codifican los diferentes componentes de la vía SAC, constituye un mecanismo de adaptación empleado por las células tumorales para sobrevivir a la quimioterapia. De hecho, otros estudios han propuesto que en ciertos casos el *empalme alternativo de exones* puede estar involucrado en la respuesta celular al daño al DNA. Por ejemplo, Filippov y colaboradores.⁶⁸ demostraron que las células de osteosarcoma deficientes en P53 y tratadas con mitomicina C modulaban su respuesta al daño al DNA y sobrevivían mediante la sobreexpresión de SRp55, el cual es un factor regulador del proceso de *empalme alternativo de exones*. A su vez, la sobreexpresión de este factor

provocaba un cambio en el *empalme alternativo de exones* del transcrito codificante del receptor FAS (CD95) para favorecer la expresión de una variante transcripcional de supervivencia sFAS soluble, en contra de la expresión de la forma hidrofóbica FAS que normalmente está unida a la membrana celular y que tiene una función pro-apoptótica. De esta manera, las células pueden responder directamente a los agentes de estrés externos mediante cambios en la expresión de factores reguladores del proceso de *empalme alternativo de exones*, lo cual a su vez modifica el patrón de expresión de genes blanco. Falta estudiar si alguno de los componentes de la vía SAC pudiera ser blanco de estos cambios en la expresión de factores reguladores del *empalme alternativo de exones*. Mu y colaboradores ⁶⁹ reportaron interesantes resultados que tienen que ver con el potencial para inducir catástrofe mitótica en células de cáncer. Ellos inhibieron el factor Cdc5L, el cual regula el proceso de *empalme alternativo de exones* de varios genes involucrados en la mitosis en la respuesta al daño al DNA. Al afectar este proceso, la inhibición de Cdc5L causaba un prolongado arresto mitótico y una activación persistente de la vía SAC, eventualmente llevando a las células a catástrofe mitótica. Los investigadores también observaron que Cdc5L está normalmente sobreexpresado en muestras de osteosarcoma y cáncer cervicouterino y que además, la viabilidad de la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa era disminuida cuando las células eran transfectadas con siRNA para Cdc5L. Solo como dato curioso, en la **figura 7** se muestra que la línea celular SiHa, de cáncer cervicouterino, expresa altos niveles de MAD2 γ . Sería interesante estudiar la posible correlación entre la expresión de los factores SRp55 y Cdc5L, el *empalme alternativo de exones* de MAD2, la regulación de la vía SAC y la respuesta hacia agentes que dañan al DNA en múltiples líneas celulares de cáncer y tejidos tumorales.

CONCLUSIÓN

Diversos trabajos sugieren que el status de la vía SAC es importante para determinar la sensibilidad tanto a los inhibidores de la dinámica del huso mitótico, como a los agentes de daño al DNA ⁶². Nuestros datos sugieren que MAD2 γ , una nueva isoforma de MAD2, podría alterar el funcionamiento de la vía SAC y como consecuencia, esto podría estar asociado a la quimiorresistencia a los agentes que dañan el DNA, tales como cisplatino. Dicha quimiorresistencia se observó en el grupo de pacientes con cáncer de células germinales de testículo y en la línea celular HCT116 que sobre expresaron MAD2 γ . Los resultados resaltan la importancia de identificar cambios en los patrones del *empalme alternativo de exones* que puedan comprometer la función normal de la vía SAC y en consecuencia alterar la respuesta a la quimioterapia en cáncer.

REFERENCIAS

1. Li R, Murray AW. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 1991; 66:519-31.
2. Li Y, Benezra R. Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science* 1996; 274:246-8.
3. Foley EA, Kapoor TM. Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14:25-37.
4. Kabeche L, Compton DA. Checkpoint-independent stabilization of kinetochore-microtubule attachments by Mad2 in human cells. *Curr Biol* 2012; 22:638-44.
5. Ito S, Mantel CR, Han M-K, Basu S, Fukuda S, Cooper S, Broxmeyer HE. Mad2 is required for optimal hematopoiesis: Mad2 associates with c-Kit in MO7e cells. *Blood* 2007; 109:1923-30.
6. Nelson KK, Schlöndorff J, Blobel CP. Evidence for an interaction of the metalloprotease-disintegrin tumour necrosis factor α convertase (TACE) with mitotic arrest deficient 2 (MAD2), and of the metalloprotease-disintegrin MDC9 with a novel MAD2-related protein, MAD2 β . *Biochemical Journal* 1999; 343:673.
7. O'Neill TJ, Zhu Y, Gustafson TA. 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. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272:10035-40.
8. Poelzl G, Kasai Y, Mochizuki N, Shaul PW, Brown M, Mendelsohn ME. Specific association of estrogen receptor beta with the cell cycle spindle assembly checkpoint protein, MAD2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:2836-9.

9. Zhang J, Zhang J, Neisa R, Neisa R, Mao Y, Mao Y. Oncogenic Adenomatous polyposis coli mutants impair the mitotic checkpoint through direct interaction with Mad2. *Molecular Biology of the Cell* 2009; 20:2381-8.
10. Wang L, Yin F, Du Y, Chen B, Liang S, Zhang Y, Du W, Wu K, Ding J, Fan D. Depression of MAD2 inhibits apoptosis and increases proliferation and multidrug resistance in gastric cancer cells by regulating the activation of phosphorylated survivin. *Tumour Biol* 2010; 31:225-32.
11. Lv Y-G, Yu F, Yao Q, Chen J-H, Wang L. The role of survivin in diagnosis, prognosis and treatment of breast cancer. *J Thorac Dis* 2010; 2:100-10.
12. Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 2007; 5:1-10.
13. Murakumo Y, Roth T, Ishii H, Rasio D, Numata S, Croce CM, Fishel R. A human REV7 homolog that interacts with the polymerase zeta catalytic subunit hREV3 and the spindle assembly checkpoint protein hMAD2. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275:4391-7.
14. Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, et al. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes & Development* 2000; 14:1448-59.
15. Sigurdsson S, Van Komen S, Petukhova G, Sung P. Homologous DNA pairing by human recombination factors Rad51 and Rad54. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277:42790-4.
16. Lawrence KS, Chau T, Engebrecht J. DNA Damage Response and Spindle Assembly Checkpoint Function throughout the Cell Cycle to Ensure Genomic Integrity. *PLoS Genet* 2015; 11:e1005150-28.

17. Chilà R, Celenza C, Lupi M, Damia G, Carrassa L. Chk1-Mad2 interaction: a crosslink between the DNA damage checkpoint and the mitotic spindle checkpoint. *Cell Cycle* 2013; 12:1083-90.
18. Clémenson C, Marsolier-Kergoat M-C. The spindle assembly checkpoint regulates the phosphorylation state of a subset of DNA checkpoint proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 2006; 26:9149-61.
19. Fung MKL, Han H-Y, Leung SCL, Cheung HW, Cheung ALM, Wong Y-C, Ling M-T, Wang X. MAD2 interacts with DNA repair proteins and negatively regulates DNA damage repair. *J Mol Biol* 2008; 381:24-34.
20. Manchado E, Guillaumot M, Malumbres M. Killing cells by targeting mitosis. *Cell Death Differ* 2012; 19:369-77.
21. Maskey D, Yousefi S, Schmid I, Schmid IES, Zlobec I, Perren A, Friis R, Simon H-U. ATG5 is induced by DNA-damaging agents and promotes mitotic catastrophe independent of autophagy. *Nat Commun* 2013; 4:2130.
22. Nitta M, Kobayashi O, Honda S, Hirota T, Kuninaka S, Marumoto T, Ushio Y, Saya H. Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents. *Oncogene* 2004; 23:6548-58.
23. Jackson JR, Patrick DR, Dar MM, Huang PS. Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *Nat Rev Cancer* 2007; 7:107-17.
24. Morishita M, Sumi T, Nakano Y, Teramae M, Fukuda T, Nobeyama H, Yoshida H, Matsumoto Y, Yasui T, Ishiko O. Expression of mitotic-arrest deficiency 2 predicts the efficacy of neoadjuvant chemotherapy for locally advanced uterine cervical cancer. *Exp Ther Med* 2012; 3:341-6.
25. Cheung HW, Jin D-Y, Ling M-T, Wong Y-C, Wang Q, Tsao SW, Wang X. Mitotic arrest deficient 2 expression induces chemosensitization to a DNA-damaging

- agent, cisplatin, in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Research* 2005; 65:1450-8.
26. Fung MKL, Cheung H-W, Ling M-T, Cheung ALM, Wong Y-C, Wang X. Role of MEK/ERK pathway in the MAD2-mediated cisplatin sensitivity in testicular germ cell tumour cells. *Br J Cancer* 2006; 95:475-84.
 27. Yin F, Du Y, Hu W, Qiao T, Ding J, Wu K, Liu Z, Fan D. Mad2 β , an alternative variant of Mad2 reducing mitotic arrest and apoptosis induced by adriamycin in gastric cancer cells. *Life Sciences* 2006; 78:1277-86.
 28. Dotiwala F, Harrison JC, Jain S, Sugawara N, Haber JE. Mad2 prolongs DNA damage checkpoint arrest caused by a double-strand break via a centromere-dependent mechanism. *Curr Biol* 2010; 20:328-32.
 29. Wang Z, Katsaros D, Shen Y, Fu Y, Canuto EM, Benedetto C, Lu L, Chu W-M, Risch HA, Yu H. Biological and Clinical Significance of MAD2L1 and BUB1, Genes Frequently Appearing in Expression Signatures for Breast Cancer Prognosis. *PLoS ONE* 2015; 10:e0136246.
 30. Scintu M, Vitale R, Prencipe M, Gallo AP, Bonghi L, Valori VM, Maiello E, Rinaldi M, Signori E, Rabitti C, et al. Genomic instability and increased expression of BUB1B and MAD2L1 genes in ductal breast carcinoma. *Cancer Letters* 2007; 254:298-307.
 31. Du J, Du Q, Zhang Y, Sajdik C, Ruan Y, Tian X-X, Fang W-G. Expression of cell-cycle regulatory proteins BUBR1, MAD2, Aurora A, cyclin A and cyclin E in invasive ductal breast carcinomas. *Histol Histopathol* 2011; 26:761-8.
 32. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415:530-6.

33. Tanaka K, Nishioka J, Kato K, Nakamura A, Mouri T, Miki C, Kusunoki M, Nobori T. Mitotic checkpoint protein hsMAD2 as a marker predicting liver metastasis of human gastric cancers. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92:952-8.
34. Wang L, Yin F, Du Y, Du W, Chen B, Zhang Y, Wu K, Ding J, Liu J, Fan D. MAD2 as a key component of mitotic checkpoint: A probable prognostic factor for gastric cancer. *Am J Clin Pathol* 2009; 131:793-801.
35. Li G-Q, Li H, Zhang H-F. Mad2 and p53 expression profiles in colorectal cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2003; 9:1972-5.
36. Li G-Q, Zhang H-F. Mad2 and p27 expression profiles in colorectal cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2004; 10:3218-20.
37. Pinto M, Soares MJ, Cerveira N, Henrique R, Ribeiro FR, Oliveira J, Jerónimo C, Teixeira MR. Expression changes of the MAD mitotic checkpoint gene family in renal cell carcinomas characterized by numerical chromosome changes. *Virchows Arch* 2007; 450:379-85.
38. Zhang S-H, Xu A-M, Chen X-F, Li D-H, Sun M-P, Wang Y-J. Clinicopathologic significance of mitotic arrest defective protein 2 overexpression in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 2008; 39:1827-34.
39. McGrogan B, Phelan S, Fitzpatrick P, Maguire A, Prencipe M, Brennan D, Doyle E, O'Grady A, Kay E, Furlong F, et al. Spindle assembly checkpoint protein expression correlates with cellular proliferation and shorter time to recurrence in ovarian cancer. *Hum Pathol* 2014; 45:1509-19.
40. Furlong F, Fitzpatrick P, O'Toole S, Phelan S, McGrogan B, Maguire A, O'Grady A, Gallagher M, Prencipe M, McGoldrick A, et al. Low MAD2 expression levels associate with reduced progression-free survival in patients with high-grade serous epithelial ovarian cancer. *J Pathol* 2012; 226:746-55.

41. Park PE, Jeong JY, Kim SZ, Park JY. 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* 2013; 47:418-25.
42. Nakano Y, Sumi T, Teramae M, Morishita M, Fukuda T, Terada H, Yoshida H, Matsumoto Y, Yasui T, Ishiko O. Expression of the mitotic-arrest deficiency 2 is associated with chemotherapy resistance in ovarian serous adenocarcinoma. *Oncology Reports* 2012; 28:1200-4.
43. Tanaka K, Mohri Y, Ohi M, Yokoe T, Koike Y, Morimoto Y, Miki C, Tonouchi H, Kusunoki M. Mitotic checkpoint genes, hsMAD2 and BubR1, in oesophageal squamous cancer cells and their association with 5-fluorouracil and cisplatin-based radiochemotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2008; 20:639-46.
44. Doak SH, Doak S, Jenkins GJS, Parry EM, Griffiths AP, Baxter JN, Parry JM. Differential expression of the MAD2, BUB1 and HSP27 genes in Barrett's oesophagus-their association with aneuploidy and neoplastic progression. *Mutat Res* 2004; 547:133-44.
45. Burum-Auensen E, Skotheim RI, Schjølberg AR, Roislien J, Lothe RA, Clausen OPF. Spindle proteins are differentially expressed in the various histological subtypes of testicular germ cell tumors. *J Carcinog* 2010; 9:1-1.
46. Fung MKL, Cheung HW, Wong H-L, Yuen H-F, Ling M-T, Chan K-W, Wong Y-C, Cheung ALM, Wang X. MAD2 expression and its significance in mitotic checkpoint control in testicular germ cell tumour. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773:821-32.
47. Schmoll HJ, Souchon R, Krege S, Albers P, Beyer J, Kollmannsberger C, Fossa SD, Skakkebaek NE, de Wit R, Fizazi K, et al. European consensus on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG). 2004. pages 1377-99.

48. Mendoza J, Martínez J, Hernández C, Pérez-Montiel D, Castro C, Fabián-Morales E, Santibáñez M, González-Barrios R, Díaz-Chávez J, Andonegui MA, et al. Association between ERCC1 and XPA expression and polymorphisms and the response to cisplatin in testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 2013; 109:68-75.
49. Wassmann K, Liberal V, Benezra R. Mad2 phosphorylation regulates its association with Mad1 and the APC/C. *EMBO J* 2003; 22:797-806.
50. Voigt W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol Med* 2005; 110:39-48.
51. Zou KH, Hall WJ, Shapiro DE. Smooth non-parametric receiver operating characteristic (ROC) curves for continuous diagnostic tests. *Stat Med* 1997; 16:2143-56.
52. Schisterman EF, Perkins NJ, Liu A, Bondell H. Optimal cut-point and its corresponding Youden Index to discriminate individuals using pooled blood samples. *Epidemiology* 2005; 16:73-81.
53. Esteghamati A, Ashraf H, Khalilzadeh O, Zandieh A, Nakhjavani M, Rashidi A, Haghazali M, Asgari F. Optimal cut-off of homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) for the diagnosis of metabolic syndrome: third national surveillance of risk factors of non-communicable diseases in Iran (SuRFNCD-2007). *Nutr Metab (Lond)* 2010; 7:26.
54. Shah JV, Cleveland DW. Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell* 2000; 103:997-1000.
55. Michel LS, Liberal V, Chatterjee A, Kirchwegger R, Pasche B, Gerald W, Dobles M, Sorger PK, Murty VV, Benezra R. MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* 2001; 409:355-9.

56. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997; 386:623-7.
57. Thompson SL, Compton DA. Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. *J Cell Biol* 2008; 180:665-72.
58. Quimby BB, Arnaoutov A, Dasso M. Ran GTPase regulates Mad2 localization to the nuclear pore complex. *Eukaryotic Cell* 2005; 4:274-80.
59. Lee SH, Sterling H, Burlingame A, McCormick F. Tpr directly binds to Mad1 and Mad2 and is important for the Mad1-Mad2-mediated mitotic spindle checkpoint. *Genes & Development* 2008; 22:2926-31.
60. Schweizer N, Ferrás C, Kern DM, Logarinho E, Cheeseman IM, Maiato H. Spindle assembly checkpoint robustness requires Tpr-mediated regulation of Mad1/Mad2 proteostasis. *The Journal of Cell Biology* 2013; 203:883-93.
61. Rodriguez-Bravo V, Maciejowski J, Corona J, Buch HK, Collin P, Kanemaki MT, Shah JV, Jallepalli PV. Nuclear pores protect genome integrity by assembling a premitotic and Mad1-dependent anaphase inhibitor. *Cell* 2014; 156:1017-31.
62. Tao W. The mitotic checkpoint in cancer therapy. *Cell Cycle* 2005; 4:1495-9.
63. Vogel C, Vogel C, Kienitz A, Müller R, Bastians H. The mitotic spindle checkpoint is a critical determinant for topoisomerase-based chemotherapy. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280:4025-8.
64. Mikhailov A, Cole RW, Rieder CL. DNA damage during mitosis in human cells delays the metaphase/anaphase transition via the spindle-assembly checkpoint. *Curr Biol* 2002; 12:1797-806.
65. Sureau A, Gattoni R, Dooghe Y, Stévenin J, Soret J. SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *EMBO J* 2001; 20:1785-96.

66. van Leuken RJ, Luna-Vargas MP, Sixma TK, Wolthuis RMF, Medema RH. Usp39 is essential for mitotic spindle checkpoint integrity and controls mRNA-levels of Aurora B. *Cell Cycle* 2014; 7:2710-9.
67. Sze KM-F, Ching Y-P, Jin D-Y, Ng IO-L. Role of a novel splice variant of mitotic arrest deficient 1 (MAD1), MAD1beta, in mitotic checkpoint control in liver cancer. *Cancer Research* 2008; 68:9194-201.
68. Filippov V, Schmidt EL, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ. Splicing and splice factor SRp55 participate in the response to DNA damage by changing isoform ratios of target genes. *Gene* 2008; 420:34-41.
69. Mu R, Wang Y-B, Wu M, Yang Y, Song W, Li T, Zhang W-N, Tan B, Li A-L, Wang N, et al. Depletion of pre-mRNA splicing factor Cdc5L inhibits mitotic progression and triggers mitotic catastrophe. *Cell Death Dis* 2014; 5:e1151.