



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PARTICIPACIÓN DE MAD2 γ EN EL PUNTO DE MONITOREO DEL HUSO
MITÓTICO Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A PACLITAXEL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

QFI. Miguel Ángel Ramírez Otero

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)
[Instituto Nacional de Cancerología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Lena Ruiz Azuara
[Facultad de Química](#)
Dr. Alejandro Manuel García Carrancá
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)
[Instituto Nacional de Cancerología](#)

Ciudad de México. enero, 2017

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Carcinogénesis del Instituto Nacional de Cancerología perteneciente a la Unidad Periférica de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. El trabajo fue realizado bajo la tutoría del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo y el Dr. Alejandro López Saavedra. Este trabajo fue apoyado por PAPIIT/UNAM número de proyecto IN208815.

Los estudios de Maestría de Miguel Ramírez Otero, numero de CVU 663645, se realizaron con el apoyo de la Beca CONACYT Nacional para posgrado y con el apoyo del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Se agradece el apoyo y la excelente asesoría técnica de la M. en IBB Clementina Castro.

Se agradece y reconoce al comité tutor de este proyecto, constituido por:

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Dr. Lena Ruiz Azuara	Facultad de Química
Dr. Alejandro Manuel García Carrancá	Instituto de Investigaciones Biomédicas

Finalmente se agradece a los miembros del jurado que revisaron y enriquecieron con sus observaciones este trabajo:

Marcela Lizano Soberón	Instituto de Investigaciones Biomédicas
Teresa Imelda Fortoul Van der Goes	Facultad de Medicina
Leonardo Peraza Reyes	Instituto de Fisiología Celular
Enrique Pedernera Asteguiano	Facultad de Medicina
Norma Araceli Bobadilla Sandoval	Instituto de Investigaciones Biomédicas

[Refiriéndose a la llegada del hombre a la luna] *Fue un asombroso logro científico e intelectual para una criatura que en el transcurso de algunos millones de años -un instante en la cronología de la evolución- surgió de los bosques primigenios para lanzarse hacia las estrellas [...] Fue, en todo caso, una deslumbrante reafirmación de la premisa optimista de que el hombre puede hacer que suceda todo lo que imagina.*

The Moon: A GIANT LEAP FOR MANKIND. *TIME*. Viernes, Julio 25, 1969.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Luis Herrera por la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación. Por su confianza, por ser un ejemplo, por sus consejos y su forma particular de sacar lo mejor de mí y de cada una de las personas que lo rodean.

Quiero agradecer especialmente al Dr. Alejandro López por ser la guía de este trabajo. Que, gracias a sus ideas, su paciencia, su forma de enseñar y trabajar hicieron que este trabajo se materializara.

A mis compañeros de laboratorio: Diego, Montse, Yair, Fer Luna, Marisol, Víctor, Armando, Liss, Rodrigo Cásares, Toñita, Tzitzí, y David por su siempre disposición de enseñar, aprender y por hacer que la estancia en el laboratorio siempre fuera amena. Quiero agradecer especialmente a Eunice por esos días del turno nocturno, a Julieta por los abrazos reconfortantes en momentos de crisis y a Fernanda por su amistad incondicional, por su apoyo y estar cuando más la he necesitado. Gracias a todos ellos porque volvieron cada comida, salida, reunión, viaje y tutorial momentos únicos.

A Marco, José y Diddier por su apoyo y tiempo para discutir y enriquecer este trabajo.

A la maestra Clementina Castro por su trabajo invaluable y apoyo técnico. Además, por siempre escuchar nuestras penas y rescatarnos de cualquier apuro.

A Lucy y a Mary por su apoyo.

A mis amigos Giovanni y Erick por recordarme que *You Only Live Once*.

A Rafa por darme ese empujón que necesitaba para decidir estudiar un posgrado.

A YALB por enriquecer mi vida con nuevas ideas y nuevas expectativas.

Finalmente, a mi madre, por ser mi ejemplo y mi soporte en todo momento.

ÍNDICE

ABREVIACIONES	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. El cinetocoro.....	2
1.2. Cascada de señalización del punto de monitoreo del huso mitótico.....	3
1.3. MAD2.....	5
1.4. MAD2 y cáncer.....	8
1.5. MAD2 y quimiorresistencia	9
1.6. Variantes transcripcionales de MAD2	11
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	13
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVOS	13
5.1. Objetivo general.....	13
5.2. Objetivos particulares	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS	14
6.1. Análisis in silico de las isoformas de MAD2.....	14
6.2. Modelado por homología.....	14
6.3. Líneas celulares.....	15
6.4. Determinación de la expresión de MAD2 y sus isoformas	15
6.5. Plásmidos	15
6.6. Transfección transitoria	16
6.7. Determinación del índice mitótico.....	17

6.8.	Análisis de Inmunofluorescencia.....	18
6.9.	Ensayo de ligación por proximidad.....	19
6.10.	Generación de líneas celulares estables.....	20
6.11.	Determinación del IC ₅₀	21
7.	RESULTADOS.....	23
7.1.	La sobreexpresión de MAD2 γ -FLAG disminuye el índice mitótico.....	23
7.2.	Análisis in silico de las isoformas de MAD2.....	23
7.2.1.	Análisis de la estructura de MAD2 β	24
7.2.2.	Análisis de la estructura de MAD2 γ	25
7.2.3.	Identificación de dos motivos conservado en el extremo C-terminal de las isoformas de MAD2.....	27
7.2.3.1.	Identificación del motivo R(L/M)K.....	27
7.2.3.2.	Identificación de un motivo de interacción con MAD2 (MIM).....	27
7.3.	Localización de MAD2 γ	30
7.4.	Co-localización de MAD2 γ con MAD2 α	34
7.5.	Modelo de la participación de MAD2 γ en el SAC.....	38
7.6.	Efecto de la expresión de MAD2 γ sobre la sensibilidad a agentes que alteran la dinámica de microtúbulos.....	39
7.7.	Expresión de MAD2 y su isoformas en líneas celulares de cáncer.....	40
8.	DISCUSIÓN.....	42
9.	CONCLUSIONES.....	45
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	46
11.	ANEXOS.....	52
11.1.	Métodos en extenso.....	52
11.1.1.	Líneas celulares.....	52
11.1.2.	Determinación de la expresión de MAD2 sus isoformas.....	53

11.1.3.	Preparación de bacterias competentes con cloruro de rubidio	54
11.1.4.	Soluciones para la preparación de bacterias competentes	55
11.1.5.	Transformación de bacterias por choque térmico	55
11.2.	Producción científica	56

ABREVIACIONES

BUB1	Budding Inhibited by Benzimidazole 1
C-MAD2	Open MAD2, forma inactiva de MAD2
MAD2	Mitotic Arrest Deficient 2
MCC	Mitotic checkpoint complex
MIM	MAD2 interacting motif
O-MAD2	Closed-MAD2, forma activa de MAD2
PLA	Proximity Ligation Assay
SAC	Spindle assambly checkpoint
SNCG	Sinuclein gamma

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El punto de monitoreo del huso mitótico.....	2
Figura 2. Activación del SAC en el cinetocoro a través del reclutamiento jerárquico de proteínas.....	4
Figura 3. Estructura de O-MAD2 y C-MAD2.....	6
Figura 4. La sobre-expresión de MAD2 γ -FLAG disminuye el índice mitótico.	23
Figura 5. Las isoformas de MAD2 se generan por el empalme alternativo de exones	26
Figura 6. Identificación de dos motivos conservados en el extremo C- terminal de las isoformas de MAD2.....	29
Figura 7. Localización de MAD2 α en la línea celular HCT116 durante la mitosis.	31
Figura 8. Localización de MAD2 γ -FLAG en la línea celular HCT116 durante la mitosis.....	32
Figura 9. Localización de MAD2 γ -FLAG en la línea celular HeLa durante la mitosis.....	33
Figura 10. MAD2 γ se localiza en lo cinetocoros durante la mitosis	34
Figura 11. MAD2 γ -GFP co localiza con MAD2 α	34
Figura 12. BUBR1 y SGO1 se localizan en la región centrómero-cinetocoro durante la prometafase.	35
Figura 13. MAD2 γ interacciona con MAD2 α en el ensayo de ligación por proximidad (Proximity Ligation Assay, PLA).	36
Figura 14. MAD2 γ interacciona con MAD2 α en el ensayo de ligación por proximidad (Proximity Ligation Assay	37
Figura 15. Rol propuesto de la isoformas de MAD2 en el punto de monitoreo del huso mitótico.....	38
Figura 16. La sobre-expresión de MAD2 γ disminuye la sensibilidad a agentes que alteran la dinámica de microtúbulos.	40
Figura 17. Expresión de MAD2 y sus isoformas en líneas celulares de cáncer. ...	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. MAD2 y resistencia a cisplatino y paclitaxel.....	10
Tabla 2. Proteínas usadas en el análisis in silico de las isoformas de MAD2	14
Tabla 3. Lista de plásmidos	16
Tabla 4. Lista de anticuerpos	19
Tabla 5. Estructuras de MAD2 en complejo con otras proteínas del SAC resueltas por cristalografía de rayos X o RMN	24

RESUMEN

Antecedentes: MAD2 α tiene un papel central en el punto de monitoreo del huso mitótico (SAC, por sus siglas en inglés; *Spindle Assembly Checkpoint*) que consiste en una cascada de interacciones proteína-proteína que inhiben la mitosis cuando hay defectos en la unión de los microtúbulos del huso a los cinetocoros. Se ha observado que la disrupción de estas interacciones conlleva a un SAC defectuoso y a la generación de aneuploidías, una característica distintiva del cáncer. Además, una menor expresión de MAD2 α se ha asociado con la resistencia al paclitaxel en diferentes tipos de cáncer. Se han descrito dos variantes transcripcionales de MAD2 α : MAD2 β y MAD2 γ , cuya sobre-expresión también se ha asociado a alteraciones en el SAC y a la quimiorresistencia. Lo anterior sugiere que no solo MAD2 α tiene un papel en la resistencia a fármacos, sino que también sus isoformas pudieran tener un papel relevante en este proceso. Sin embargo, se desconoce los mecanismos por los cuales pudieran estar participando. **Pregunta de investigación:** ¿La alteración en el SAC y la quimiorresistencia observadas por la expresión de MAD2 γ podrían estar asociadas con la interacción de esta isoforma con otras proteínas de la vía SAC? **Hipótesis:** MAD2 γ interacciona con otras proteínas del SAC y modula de forma negativa su función. **Objetivo general.** Determinar la interacción de MAD2 γ con proteínas que participan en el SAC y establecer si estas interacciones se asocian con la quimiorresistencia a paclitaxel. **Resultados.** En este trabajo mostramos que una sobre-expresión exógena de MAD2 γ en la línea celular HCT116 causa una disminución en el índice mitótico después del tratamiento con paclitaxel, lo que sugiere una alteración en el SAC. Se identificaron dos motivos en el extremo C-terminal de ambas isoformas de MAD2 α ; uno de localización en los cinetocoros y otro de interacción con MAD2 α . Se observó por inmunofluorescencia que MAD2 γ se localiza en la región centrómero-cinetocoro de los cromosomas durante la mitosis, además de co-localizar con MAD2 α , congruente con la presencia de estos motivos. La cercanía y posible interacción de MAD2 α con MAD2 γ fue comprobada por PLA. La sobre-expresión estable de MAD2 γ en la línea celular HCT116 se asoció con una menor sensibilidad a paclitaxel y a colcemida. Tomado en conjunto, nuestros resultados proponen un modelo que

sugiere la participación de MAD2 γ en el SAC. En un contexto de sobre-expresión, MAD2 γ es reclutada a los cinetocoros y ahí puede interaccionar con MAD2 α impidiendo que interaccione con otras proteínas y que realice su función. Esto ocasiona la salida temprana de la mitosis, lo que explica la menor sensibilidad a paclitaxel. Lo anterior es importante porque MAD2 γ se encuentra diferencialmente expresada en líneas celulares de cáncer, donde pudiera estar participando en la quimiorresistencia a los agentes que alteran la dinámica de los microtúbulos.

1. INTRODUCCIÓN

La segregación cromosómica depende de la correcta unión de los cromosomas a los microtúbulos del huso mitótico. Esto se obtiene cuando los extremos positivos de los microtúbulos se unen con los cinetocoros. Tales uniones permiten la bi-orientación de los cromosomas, un estado en el cual, las dos cromátidas hermanas están unidas a polos opuestos del huso. Esto permite que cada cromátida sea jalada a extremos opuestos durante la división celular (Foley *et al.*, 2014).

Cuando existen errores en la unión de los microtúbulos con los cinetocoros se activa el punto de monitoreo del huso mitótico (SAC por sus siglas en inglés; *Spindle Assembly Checkpoint* y referido así a lo largo de este texto), cuya función principal es inhibir el progreso de la anafase evitando la incorrecta segregación de las cromátidas hermanas (Foley & Kapoor, 2013).

El SAC es un mecanismo conservado en la evolución que incluye las Ser/Thrcinasas MPS1 y BUB1, así como, las proteínas no cinasas MAD1, MAD2, BUB3 y BUBR1. Estas proteínas atrasan la segregación de los cromosomas mediante la inactivación de CDC20, un cofactor del Complejo Promotor de la anafase / Ciclosoma (APC/C). El APC/C desencadena la segregación cromosómica a través de la ubiquitinación y subsecuente degradación dependiente del proteosoma de CICLINA B y de SECURINA. El APC/C marca a la CICLINA B y a la SECURINA para su ubiquitinación mediante el reconocimiento de secuencias denominadas cajas de muerte (D-box) presentes en estas proteínas. El APC/C posee numerosos cofactores que incluyen a CDC20 y CDH1 que junto con APC10 forman un sitio de reconocimiento de las cajas de muerte. El SAC cataliza la formación de un inhibidor de CDC20 denominado MCC (*Mitotic Checkpoint Complex*, complejo del punto de control mitótico) que es un hetero-tetrámero formado por CDC20, MAD2, BUBR1 y BUB3. De tal forma que inhibiendo a CDC20, el SAC inhibe la actividad del APC/C y detiene el progreso de la mitosis (Foley & Kapoor, 2013; figura 1).

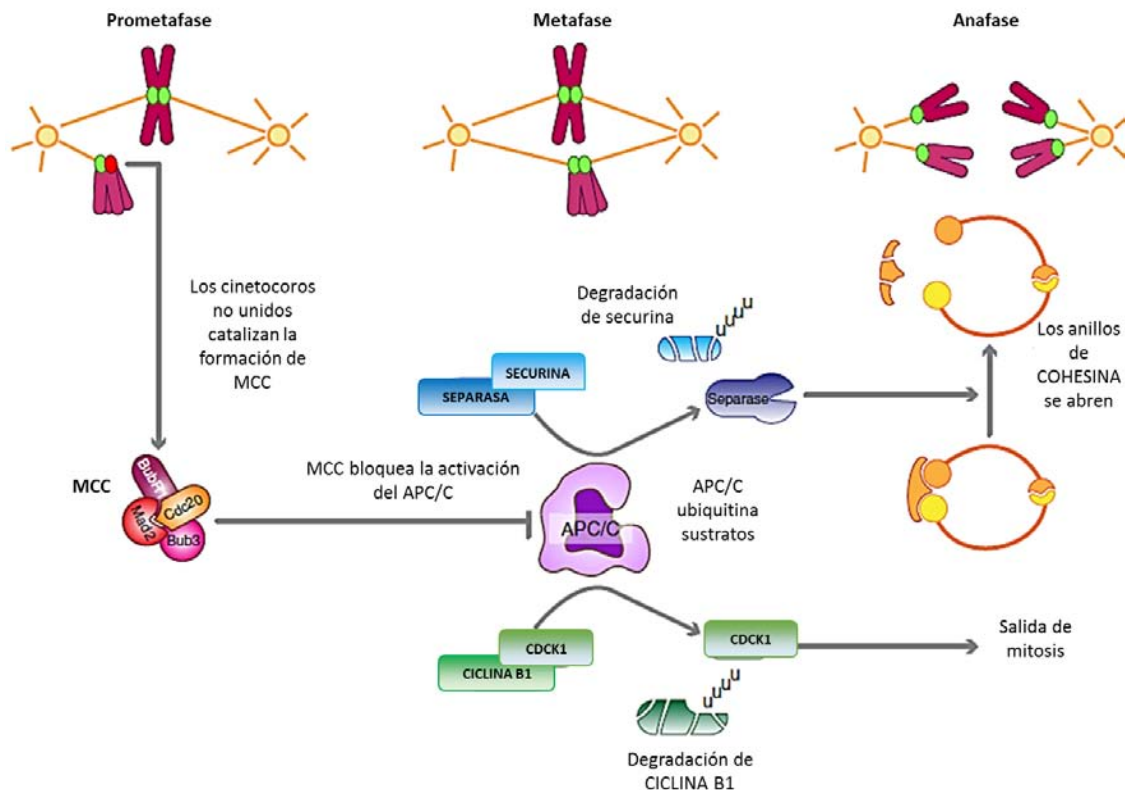


Figura 1. El punto de monitoreo del huso mitótico. Durante las primeras etapas de la mitosis (prometáfase), los cinetocoros no unidos al huso mitótico catalizan la formación del MCC compuesto por BUBR1, BUB3, MAD2 y CDC20, lo que lleva a la inhibición del APC / C. Una vez que todos los cromosomas se alinean con sus cinetocoros unido al huso (metafase), la generación del MCC se detiene, lo que permite a CDC20 activar a APC / C, que conduce a la ubiquitilación y degradación de la SECURINA y la CICLINA B1 permitiendo la salida de la mitosis (modificada de Lara-Gonzalez, Westhorpe, & Taylor, 2012).

1.1. El cinetocoro

Trabajos pioneros llevados a cabo por Conly Rieder mostraron que la señal del SAC se genera en los cinetocoros. El cinetocoro es una estructura compleja que comprende más de 100 proteínas que se ensamblan en el centrómero de cada cromátida hermana. Estas proteínas se pueden clasificar en dos grupos funcionales: el cinetocoro interno que está íntimamente asociado con el DNA centromérico y el cinetocoro externo que interacciona con microtúbulos. El cinetocoro interno está compuesto por la variante de la histona H3 denominada CENP-A que a su vez recluta proteínas de la Red Constitutiva Asociada al Centrómero (CCAN, *Constitutive Centromere Associated Network*). Dentro de las proteínas de CCAN se encuentran CENPC, CENPH, CENPI, CENPK to CENPU, CENPW, CENPX. El

cinetocoro externo incluye el súper-complejo KMN que está compuesto por KNL1 (KNL1 y ZWINT-1), las cuatro subunidades de MIS12 (NNF1, MIS12, DSN1 y NSL1/MIS14) y las cuatro unidades de NDC80 (HEC1, NUF2, SPC24 y SPC25) (Lischetti & Nilsson, 2015; Sacristan & Kops, 2015). El complejo MIS12 une el complejo KMN al cinetocoro interno, mientras que el complejo NDC80 y KNL1 puede unir directamente microtúbulos y reclutar proteínas del SAC.

El cinetocoro coordina al menos cuatro funciones en la segregación de los cromosomas. (1) El cinetocoro ancla la cromatina a los microtúbulos, (2) cuando no están unidos previene el avance del ciclo celular generando la señal del SAC. (3) Los cinetocoros corrigen uniones incorrectas con los microtúbulos para asegurar que cada cromosoma tenga una unión bipolar al huso mitótico. Finalmente, (4) los cinetocoros mueven direccionalmente los cromosomas. Los defectos en cualquiera de estas funciones pueden generar una segregación ineficiente y ser una fuente de inestabilidad cromosómica (Stukenberg & Burke, 2015).

1.2. Cascada de señalización del punto de monitoreo del huso mitótico

MAD1, MAD2 y BUBR1/MAD3 (*Mitotic Arrest Deficient*) así como MPS1 y BUB1 y BUB3 (*Budding Inhibited by Benzimidazole*) son proteínas centrales del punto de monitoreo mitótico y forman una cascada de señalización que involucra interacciones proteína-proteína y reacciones de fosforilación que en conjunto regulan la actividad de APC y su cofactor CDC20.

El reclutamiento del complejo MAD1/C-MAD2 a los cinetocoros no unidos al huso mitótico es uno de los pasos más importantes para la iniciación de la cascada de señalización del SAC. Descubrimientos recientes nos han permitido comprender mejor cómo se lleva a cabo este proceso. Primero, MPS1 es reclutada a los cinetocoros por un mecanismo dependiente de AURORA B. AURORA B es parte del complejo pasajero cromosómico (CPC) y se concentra en el centrómero, esta concentración depende de la interacción de la SURVIVINA y la BORELINA (componentes del CPC) con la treonina 3 fosforilada de la histona H3 y con la treonina 120 de la histona H2A, respectivamente. La actividad de AURORA B es necesaria para la iniciación del SAC y estimula el rápido reclutamiento de MPS1.

MPS1 se une al dominio homólogo de la calponina de NDC80 y fosforila a KNL1 en el motivo MELT (M[D/E][I/L/V/M][S/T], lo que crea sitios de unión para el dímero BUB1-BUB3 (Lischetti & Nilsson, 2015). BUB1 fosforila la Thr120 de la histona H2A lo que crea una retroalimentación positiva para el reclutamiento de MPS1. El dímero BUB1-BUB3 contribuye a reclutar a BUBR1-BUB3. Finalmente, MPS1 fosforila a BUB1 con lo que promueve la unión de MAD1/MAD2 a los cinetocoros. Una vez unido al cinetocoro, el complejo MAD1/MAD2 cataliza la conversión de la forma soluble de MAD2 a su forma activa, que se puede unir tanto a CDC20 como a BUB3/BUBR1 para formar el MCC, un inhibidor del APC/C (figura 2). El APC/C unido al MCC es incapaz de poli-ubiquitinar sus sustratos, por lo que, el ciclo celular se detiene hasta que se corrijan los errores en la unión de los microtúbulos al cinetocoro.

Otra proteína del cinetocoro que regulan la unión a los microtúbulos incluye el complejo RZZ, formado por ROD, ZW10 y ZWILCH. Este complejo es reclutado por NDC80 que a su vez recluta el complejo DINEINA/DINACTINA. RZZ es esencial para el reclutamiento de MAD1 y MAD2, por lo que se le considera un componente del SAC.

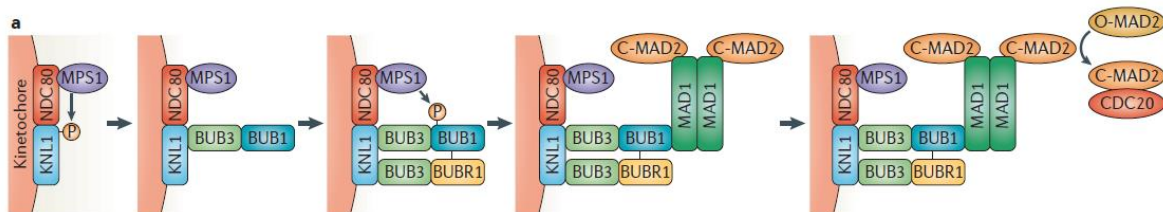


Figura 2. Activación del SAC en el cinetocoro a través del reclutamiento jerárquico de proteínas. KKNL1 y NDC80 son proteínas del cinetocoro que forman un andamio para el reclutamiento de las de proteínas del SAC. BUB3 forma complejos separados con BUB1 y BUBR1; MPS1 recluta al dímero BUB1-BUB3 y BUB1 permite la localización de BubR1. A continuación, un heterotetrámero de MAD1-MAD2 se une al cinetocoro a través de una interacción MAD1-BUB1 y posiblemente a través de un receptor adicional. Una vez unidos a los cinetocoros el complejo MAD1-MAD2 facilita la activación del SAC a través de la conversión catalítica de O-MAD2 a C-MAD2 (modificada de London & Biggins, 2014).

Una vez que todos los cromosomas se unieron al huso, la señal del SAC se debe de extinguir en todos los cinetocoros, de esta manera la célula puede proseguir con la mitosis. Tres cosas deben de completarse para asegurar el fin de la señal. Primero, las proteínas del SAC deben de ser removidas o inactivadas. Segundo, la

velocidad de la unión de la proteína del SAC se debe de reducir. Finalmente, el MCC citoplasmático que inhibe al APC/C se debe desensamblar (Lischetti & Nilsson, 2015).

MAD1 y MAD2 son removidas de los cinetocoros por un mecanismo denominado *stripping*. Este proceso es llevado a cabo por Dineinas citoplasmáticas que se unen a los microtúbulos unidos a los cinetocoros y remueven las proteínas del SAC (Wang, Jin, Higgins, & McKnight, 2014). Además, existen mecanismos independientes de Dineinas que involucran fosfatasas. El silenciamiento del SAC depende de PP1, que es reclutada a los cinetocoros a través de un motivo de unión a KNL-1. PP1 se une a los residuos de aminoácidos conservados SSILK y RVSF cerca del extremo N-terminal de KNL-1 donde desfosforila residuos dentro del motivo MELT. La regulación de la actividad de PP1 está asociada a la regulación de una segunda proteína fosfatasa (PP2A, Wang *et al.*, 2014).

Otro mecanismo involucrado en el silenciamiento del SAC es mediado por p31^{comet}, esta, fue descubierta originalmente como una proteína de unión a MAD2 que participa en la progresión de ciclo celular a través del final de mitosis (Habu & Kim, 2002). p31^{comet} se une a C-MAD2 unida a MAD1 y bloquea el reclutamiento de O-MAD2 (ver más adelante). La estructura de p31^{comet} es muy similar a MAD2, lo que sugiere que actúa como un inhibidor competitivo del ensamble del complejo O-MAD2-C-MAD2 (Yang *et al.*, 2007). Además, p31^{comet} se asocia con el MCC citoplasmático y con la AAA-ATPasa TRIP31 con el fin de promover el desensamble del MCC (Ye *et al.*, 2015). Por tanto, existen dos papeles de p31^{comet} en el silenciamiento del SAC, uno en los cinetocoros para inhibir la activación de MAD2 y otro en el citoplasma para extraer a MAD2 del MCC.

1.3. MAD2

MAD2 (*Mitotic Arrest Deficient 2*) es un componente esencial del SAC. Es codificada por el gen MAD2L1 que se ubica en el brazo largo del cromosoma 4 (4q27), contiene 5 exones y se transcribe a un mRNA de 1453 pares de bases. MAD2 es una proteína de 205 aminoácidos (25 kDa) con un solo dominio del tipo HORMA (por Hop1p, Rev7p y MAD2; Avram *et al.*, 2014). En la interfase se localiza en el núcleo y durante

la mitosis se localiza en el citoplasma con una acumulación en los cinetocoros de los cromosomas no unidos a los microtúbulos del huso.

La estructura de MAD2 consiste en tres capas: una capa central formada por 3 α -hélices (α A, α B y α C), una región formada por 6 láminas beta (ordenadas β 7– β 8– β 6– β 4– β 5– β 1) por un lado y un pequeño β -harpin (β 2, β 3) por el otro (Figura 3, Luo *et al.*, 2000).

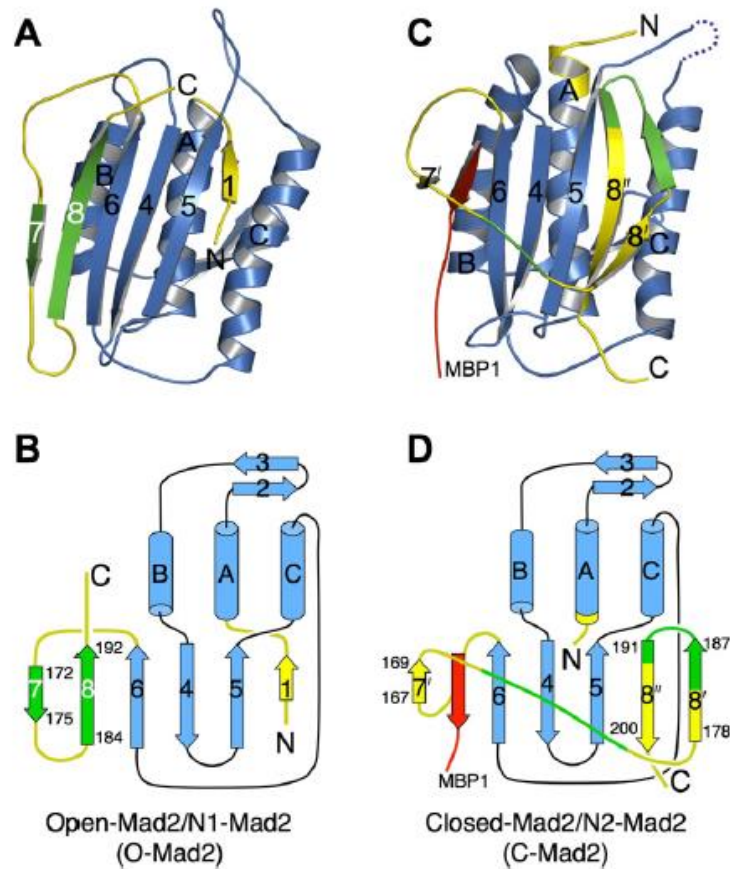


Figura 3. Estructura de O-MAD2 y C-MAD2. Diagramas de listón y topología de O-MAD2 (A, B) y C-MAD2 (C, D) (PDB 1DUJ; modificado de Yang *et al.*, 2007).

Usualmente, una proteína tiene una única estructura tridimensional nativa con la más baja energía de Gibbs. Sin embargo, MAD2 muestra las características de una proteína metamórfica y es capaz de adoptar dos conformaciones diferentes. Una forma inactiva llamada O-MAD2 (Open MAD2) y una forma activa llamada C-MAD2 (Closed MAD2). La transición de O-MAD2→C-MAD2 procede

espontáneamente con una vida media de 9 h y la reacción contraria es 6 veces más lenta (Luo *et al.*, 2004). Esta velocidad en la inter conversión radica en la magnitud del cambio, el cual implica un re arreglo de la estructura secundaria y terciaria de 60 sobre 205 aminoácidos. En O-MAD2, el extremo N-terminal forma un giro y una lámina beta corta ($\beta 1$) que se conecta con la parte central de la proteína. En la transición a C-MAD2, este segmento pierde su conformación y se reconfigura adicionando 2 giros a la alfa hélice A. El extremo C-terminal sufre un cambio aún más dramático, en O-MAD2, el extremo C-terminal forma las láminas $\beta 7$ y $\beta 8$ (con giros conectores) que se unen con la lámina $\beta 6$. En C-MAD2 todo este segmento se mueve hacia el lado opuesto y forma dos nuevas laminas: $\beta' 8$ y $\beta 8''$, con una red de puentes de hidrogeno totalmente diferentes. De manera global, la transición C-MAD2 relocaliza el N-terminal para dar cabida al segmento C-terminal que expone la lámina $\beta 6$ que estaba oculta en O-MAD2 (Skinner *et al.*, 2008; Li, *et al.*, 2014).

La forma abundante de MAD2 en células en interfase es O-MAD2, mientras que, C-MAD2 solo se genera durante la mitosis (Luo *et al.*, 2004). Para entender cómo se lleva a cabo la inter-conversión a la forma activa de MAD2 es importante mencionar que esta proteína interacciona tanto con MAD1, como con CDC20. La estructura cristalográfica del complejo MAD2/MAD1 fue descrita por Sironi y cols. en el 2002 (Sironi, Mapelli, & Knapp, 2002). En este trabajo se describe por primera vez que MAD1 interacciona exclusivamente con C-MAD2. Esto es debido a que el Motivo de Interacción con MAD2 (MIM) de MAD1 se une con aminoácidos de la lámina $\beta 6$ de C-MAD2, que como se mencionó anteriormente, se encuentra oculta en O-MAD2. Además, se describe que el extremo C-terminal de MAD2 se re-arregla para abrazar el MIM en una estructura que los autores denominaron “cinturón de seguridad”. Posteriormente, Luo y cols. demostraron que CDC20 se une a la misma región en C-MAD2 que MAD1. Por lo tanto, su unión es mutuamente excluyente (Luo, Tang, Rizo, & Yu, 2002). MAD2 forma un complejo constitutivo con MAD1 a través del ciclo celular, pero durante la mitosis este complejo es reclutado a los cinetocoros que no están unidos a microtúbulos. Este evento indica la activación del punto de monitoreo de la mitosis. Por otro lado, dos grupos de manera

independiente describieron la estructura cristalográfica del dímero C-MAD2/O-MAD2 (Mapelli, Massimiliano, Santaguida, & Musacchio, 2007; Yang *et al.*, 2008). En conjunto estos resultados dieron luz al modelo de templado que propone que en la interfaz de MAD1/C-MAD2 se une O-MAD2 y se lleva a cabo la conversión catalítica de O-MAD2→C-MAD2 (Luo *et al.*, 2004). C-MAD2 libre es capaz entonces de unirse a CDC20 y formar el MMC y llevar a cabo la señalización del SAC.

1.4. MAD2 y cáncer

Theodor Boveri sugirió que las células aneuploides se generaban debido a alteraciones en la mitosis y que estas células eran precursoras de células tumorales. Hoy en día, se sabe que la aneuploidía es una característica común de tumores sólidos y un factor que contribuye a la carcinogénesis. Con el fin de mantener el mismo cariotipo cada ciclo celular, la célula debe asegurar que cada célula hija solo reciba una copia de cada cromosoma. Ya que el proceso es controlado por el SAC, alteraciones en este punto de control resultan en células aneuploides. En este sentido, se ha sugerido que la inestabilidad cromosómica, que se encuentra en la mayoría de las células cancerosas humanas, es el resultado de un SAC defectuoso (Cheung *et al.*, 2005).

Las alteraciones en la expresión de MAD2 está asociadas con un defecto en el SAC, con la tumorigénesis, así como con la progresión tumoral. El grupo de Benezra demostró que la sobre-expresión de MAD2 en ratones conduce a aparición de una amplia variedad de neoplasias (Sotillo *et al.*, 2007). Asimismo, la expresión de MAD2 disminuye la sobrevivencia de ratones en un modelo ortotópico de osteosarcoma (Tao *et al.*, 2014). Recientemente Bargiela-Iparraguirre y colaboradores encontraron que MAD2 y BUBR1 están sobre-expresados en líneas celulares de cáncer gástrico. Cuando disminuyeron los niveles de estas proteínas observaron una disminución en la proliferación, la migración y la invasión celular, lo que sugiere que los altos niveles de expresión de MAD2 y BUBR1 contribuyen a mantener las características del cáncer avanzado (Bargiela-Iparraguirre *et al.*, 2014).

1.5. MAD2 y quimiorresistencia

Además de su papel en la tumorigénesis, numerosas investigaciones, tanto *in vitro* como *in vivo*, sugieren que MAD2 tiene un papel relevante en la generación de resistencia a quimioterapéuticos, especialmente en el caso de agentes que dañan al DNA y a fármacos que alteran la dinámica de los microtúbulos. Cheung y cols encontraron que en líneas de cáncer nasofaríngeo que presentaban una menor expresión de MAD2 se correlacionaba con una menor sensibilidad a cisplatino en comparación con líneas que presentaban mayores niveles de MAD2. Mientras que, la expresión exógena de MAD2 en células de carcinoma nasofaríngeo aumentó la sensibilidad a este fármaco (Cheung *et al.*, 2005). Los autores de este estudio sugieren que el aumento en la sensibilidad al cisplatino está asociado a un SAC defectuoso y activación de la apoptosis (Cheung *et al.*, 2005). Investigaciones subsecuentes encontraron resultados similares en líneas de cáncer de testículo de células germinales (Fung *et al.*, 2006) y de cáncer gástrico (Du *et al.*, 2006).

Por otro lado, ya que el paclitaxel detiene el ciclo en mitosis y genera la activación del SAC, se ha estudiado la asociación entre MAD2 y la sensibilidad a dicho fármaco. Se ha encontrado que cuando se disminuyen los niveles MAD2 a través del uso de siRNAs, las células son menos sensibles al paclitaxel (Bargiela-Iparraguirre *et al.*, 2014; Prencipe *et al.*, 2009; Sudo, Nitta, Saya, & Ueno, 2004). Se ha propuesto que la inducción de un fenotipo senescente como posible mecanismo responsable (Prencipe *et al.*, 2009). Recientemente, se observó que la sobreexpresión exógena del miR493-3p en la línea celular HeLa disminuye los niveles de MAD2, lo que también se asoció a una menor sensibilidad al paclitaxel (Tambe, Pruikkonen, Mäki-jouppila, & Chen, 2016).

En contraste, Tanaka y colaboradores encontraron que una mayor sensibilidad a paclitaxel correlaciona con una menor expresión de MAD2 y BUBR1 en líneas celulares de carcinoma de esófago de células escamosas (Tanaka *et al.*, 2008). En otro estudio, la disminución de BUBR1, pero no de MAD2, se asoció con la adquisición de resistencia a cisplatino en la línea de cáncer de ovario SKOV3 (Yan *et al.*, 2007).

Tabla 1. MAD2 y resistencia a cisplatino y paclitaxel

Cisplatino				Paclitaxel			
Tipo de cáncer	Estatus de MAD2 α	Fenotipo	Referencia	Tipo de cáncer	Estatus de MAD2 α	Fenotipo	Referencia
Carcinoma nasofaríngeo	↓	Resistente	Cheung <i>et al.</i> , 2005	Gástrico	↓	Resistente	Bargiela-Iparraguirre <i>et al.</i> 2014
Gástrico	↓	Resistente	Du <i>et al.</i> , 2006	Mama	↓	Resistente	Prencipe <i>et al.</i> 2009; Sudo <i>et al.</i> 2004
Células germinales de testículo	↓	Resistente	Fung <i>et al.</i> , 2008	Ovario	↓	Resistente	Furlong <i>et al.</i> 2012; Fu <i>et al.</i> 2007
Esófago	-	No hay relación	Tanaka <i>et al.</i> , 2008	Esófago	↑	Resistente	Tanaka <i>et al.</i> , 2008
Cervicouterino	↑	Resistente	Morishita <i>et al.</i> , 2012				

De manera general, la evidencia sugiere que una menor expresión de MAD2 se asocia con la adquisición de resistencia tanto a cisplatino, como a paclitaxel. Sin embargo, hay estudios que muestran resultados contradictorios. Lo anterior sugiere que existen mecanismos, aún no estudiados, por los cuales alteraciones en el SAC conducen a la resistencia a agentes quimioterapéuticos (tabla 1).

1.6. Variantes transcripcionales de MAD2

En el año 2006 Yin y cols. describieron la primera variante transcripcional de MAD2 generada por empalme alternativo de exones, la cual designaron como MAD2 β . En el presente trabajo nos referiremos a las variantes transcripcionales como isoformas. El análisis genético reveló que MAD2 β carece del exón 3 del transcrito de MAD2 (Yin *et al.*, 2006). Esta isoforma se encontró en las líneas de cáncer gástrico SGC7901/VCR y SGC7901/ADR resistentes a vincristina y adriamicina, respectivamente y no en la línea parental SGC7901. Cuando se expresó de manera exógena MAD2 β en la línea celular SGC7901, tanto el mRNA, como la proteína MAD2 disminuyó de manera significativa en comparación con las células sin transfectar y esto se correlacionó con una menor sensibilidad a vincristina, adriamicina y mitomicina. En conjunto, estos resultados indican que la expresión de la isoforma MAD2 β disminuye la expresión de MAD2, lo que contribuye al desarrollo de un fenotipo resistente a fármacos (Yin *et al.*, 2006).

Recientemente, en nuestro grupo de investigación describimos una nueva isoforma de MAD2 a la que denominamos MAD2 γ (López-Saavedra *et al.*, 2016). Esta isoforma fue nombrada siguiendo el alfabeto griego y se propuso que la isoforma canónica o mayor sea renombrada como MAD2 α . En este trabajo se adoptará esta nomenclatura por claridad. MAD2 γ se deriva del empalme alternativo de MAD2 α , carece de los exones 2 y 3 y genera un transcrito más pequeño que MAD2 α y MAD2 β . De manera interesante la expresión ectópica de MAD2 γ en la línea celular HCT116 de cáncer de colon disminuyó el índice mitótico, lo que sugiere una alteración en el SAC. Además, la sobreexpresión de MAD2 γ endógena (pero no la de MAD2 α) en pacientes con cáncer de testículo de célula germinales se asoció a una resistencia a la quimioterapia basada en cisplatino (López-Saavedra *et al.*, 2016).

Los trabajos llevados a cabo por Yin y cols. y por López-Saavedra y cols. sugieren que no solo MAD2 α tiene un papel en la resistencia a fármacos, sino que también sus isoformas pudieran tener un papel relevante en este proceso. Sin embargo, se desconoce los mecanismos por los cuales pudieran estar participando.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El funcionamiento del SAC depende de la interacción coordinada de sus componentes. Se ha observado que la interrupción de estas interacciones conduce a la quimiorresistencia, pero los mecanismos moleculares subyacentes son poco entendidos. Se ha sugerido que la sobre-expresión de las isoformas de MAD2 alteran el SAC. Sin embargo, no se ha determinado una participación directa de ellas, en especial de MAD2 γ , en el SAC ni cómo esto pudiera conducir a la quimiorresistencia.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La alteración en el SAC y la quimiorresistencia observadas por la expresión de MAD2 γ podrían estar asociadas con la interacción de esta isoforma con otras proteínas de la vía SAC?

4. HIPÓTESIS

MAD2 γ interacciona con otras proteínas del SAC y modula de forma negativa su función.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar la interacción de MAD2 γ con proteínas que participan en el SAC y establecer la asociación de estas interacciones con la quimiorresistencia a paclitaxel.

5.2. Objetivos particulares

- Identificar motivos en las isoformas de MAD2 que le permitan interactuar con otras proteínas del SAC.
- Identificar la localización de MAD2 γ durante la mitosis.
- Determinar la interacción de MAD2 γ con otras proteínas del SAC.
- Determinar el efecto de la sobre expresión de MAD2 γ sobre la sensibilidad a paclitaxel.
- Determinar la expresión de las isoformas de MAD2 en diferentes líneas celulares de cáncer.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Análisis *in silico* de las isoformas de MAD2

Para identificar motivos en las isoformas de MAD2 que pudieran mediar interacciones funcionales con otras proteínas del SAC se hizo un alineamiento entre el extremo C-terminal de las isoformas con motivos en proteínas del SAC reportados en la literatura que median interacciones proteína-proteína. La secuencia de las proteínas se obtuvo de UNIPROT (<http://www.uniprot.org/>) y la alineación fue realizada usando MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Para verificar si existe conservación los motivos que presentaron una mayor similitud, se alinearon con sus contrapartes en otras especies. La tabla siguiente indica la clave de las proteínas analizadas.

Tabla 2. Proteínas usadas en el análisis *in silico* de las isoformas de MAD2

Proteína	Gen	Especie	Entrada de UNIPROT
MAD2 α	MAD2L1	<i>Homo sapiens</i>	Q13257
MAD1	MAD1L1	<i>Homo sapiens</i>	Q9Y6D9
MAD1	Mad1I1	<i>Mus musculus</i>	Q9WTX8
MAD1	Mad1	<i>Drosophila melanogaster</i>	Q7KND8
MAD1	MAD1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LTY1
MAD1	MAD1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P40957
SGO2	SGO2L	<i>Homo sapiens</i>	Q562F6
MKLp2	KIF20A	<i>Homo sapiens</i>	O95235
FAT10	UBD	<i>Homo sapiens</i>	O15205
INSR	INSR	<i>Homo sapiens</i>	P06213
CDC20	CDC20	<i>Homo sapiens</i>	Q12834
CDC20	Cdc20	<i>Mus musculus</i>	Q9JJ66
CDC20	CDC20	<i>Bos taurus</i>	F1MRW5
CDC20	Cdc2o	<i>Xenopus leavis</i>	Q8AVG7

6.2. Modelado por homología

Las estructuras terciarias de las isoformas de MAD2 fueron predichas por modelado por homología usando SwissModel (<http://swissmodel.expasy.org/>). El molde utilizado fue la estructura IGO4. Los diagramas de listón fueron generados usando el programa CCP4MG (<http://www.ccp4.ac.uk/MG/>).

6.3. Líneas celulares

En este trabajo se utilizó la línea celular de adenocarcinoma de colon HCT116 (ATCC CCL-247) ya que cuenta con un SAC funcional y no presenta inestabilidad cromosómica. También se usó la línea celular de adenocarcinoma de cérvix HeLa (ATCC CCL-2) puesto que en ella se ha estudiado ampliamente la biología molecular del SAC. Ambas líneas celulares se adquirieron de ATCC.

La línea celular HCT116 fue mantenida en medio McCoy's 5A (Gibco, Cat. No. 26600080) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco, Cat. No. 26140079) sin antibióticos. La línea celular HeLa fue mantenida en medio DMEM (Gibco, Cat. No. 26140079) suplementado con 10 % de SFB sin antibióticos. Las células se mantuvieron en incubación a 37° C y 5 % de humedad. Para los experimentos se utilizaron los pases del 8 al 20.

La características y condiciones de cultivo de las líneas celulares utilizadas para la determinación de la expresión de MAD2 y sus isoformas se describen en la tabla 1 de anexos.

6.4. Determinación de la expresión de MAD2 y sus isoformas

Con el fin de conocer la expresión de MAD2 α y sus isoformas en diferentes líneas celulares de cáncer, se determinó su estatus por RT-PCR. Para ello, se extrajo RNA total con TriZol (Invitrogen Cat. No. 15596026) conforme a las recomendaciones del fabricante. El RNA se re-suspendió en agua tratada con DPC, se cuantificó y guardó a -80° C hasta su uso. Se Sintetizó cDNA a partir de 1-2 μ g de RNA con el kit GeneAmp PCR Core Kit (Invitrogen Cat. No. N8080143) conforme a las recomendaciones del fabricante. Los *primers* utilizados, así como las condiciones de PCR se describen en las tablas 2-5 de anexos.

6.5. Plásmidos

Para producir los plásmidos, se transformaron bacterias de la cepa DH5 α de *E. coli* sensibilizadas con cloruro de rubidio mediante el método de choque térmico. Las bacterias transformadas se sembraron en placas con LB agar con antibiótico (ampicilina 100 μ g/mL o Kanamicina 50 μ g/mL) y se dejaron crecer a 37 °C por no

más de 16 h. Se tomó una colonia y se creció en medio LB con antibiótico por no más de 16 h.

Tabla 3. Lista de plásmidos

Nombre	Origen	Antibiótico de selección	Referencia
MAD2γ-FLAG	Propio	Ampicilina	(López-Saavedra <i>et al.</i> , 2016)
MAD2γ-GFP	Propio	Kanamicina	No publicado
MAD2γ/pCDNA3.0	Propio	Ampicilina	(López-Saavedra <i>et al.</i> , 2016)
EGFP-C1	Clontech	Kanamicina	N/A
pCDNA3.0	Invitrogen	Ampicilina	N/A

Los plásmidos se purificaron con el kit Maxiprep (Qiagen Cat. No. 12163) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para verificar la presencia del inserto. Los plásmidos se digirieron según el siguiente protocolo:

Reactivo	Cantidad
Plásmido	500 ng
Buffer React2	2 µL
<i>Hind</i> III	0.5 µL
H ₂ O	-
Volumen total	20 µL

La reacción se incubó a 37 °C por 1 hora. Posteriormente se adicionó 1.2 µL de NaCl (1M) y 0.5 µL de enzima *Bam*HI y se incubó por 1 h a 37 °C. Se corrió 5 µL de reacción con 1 µL de buffer de carga en un gel de agarosa al 1 %.

6.6. Transfección transitoria

Para estudiar la localización subcelular de MAD2γ, las líneas HCT116 y HeLa se transfectaron de manera transitoria con los plásmidos MAD2γ-FLAG o MAD2γ-GFP. Se sembraron 5x10⁵ células por pozo en una placa de 6 pozos y se cultivaron por 24 h, después se retiró el medio y se sustituyó por un mL de medio Optimem (Gibco, Cat. No. 11058021). Las células se transfectaron con Xfect (Clontech Cat. No. 631317) conforme a las recomendaciones del fabricante. En breve, se mezclaron 100 µL de buffer de reacción (*Xfect reaction buffer*) con 4-5 µg de plásmido y 0.3 µL

de polímero (*Xfect polymer*) por cada microgramo de plásmido. Se agitó y se dejó que se formaran las nano partículas por 10 min, posteriormente se goteó sobre las células. El medio de transfección fue sustituido por medio fresco después de no más de 8 h. La eficiencia se determinó a las 24 h post transfección horas utilizando como control el plásmido EGFP-C1.

6.7. Determinación del índice mitótico

Para determinar si la expresión de MAD2-FLAG modificaba el porcentaje de células que se detienen en mitosis después de activar el SAC con paclitaxel, se determinó el índice mitótico. Se realizó una transfección transitoria como se describe en el apartado 6.6. Después de 24 h, las células se bloquearon con 2 mM de Timidina (sigma Cat. No. T9250) por 18 h. Posteriormente se lavaron 2 veces con PBS y se expusieron a taxol (50 y 100 μ M) por 24 h. Después, se retiró el medio y se sustituyó por un volumen de solución hipotónica (KCl 75 mM) a 37 ° C. Las células se hincharon por 15 minutos en incubación a 37° C, después se separaron con una espátula para células y se pre-fijaron con un volumen de solución fijadora (metanol: ácido acético, 3:1). Se centrifugaron 5 minutos a 1200 rpm, se decantó el sobrenadante y el botón se re-suspendió en un mL de solución fijadora. Aproximadamente 100 μ L de suspensión celular se gotearon sobre una laminilla fría (mantenida en etanol al 70 % a -20° C) y se tiñó con Hemacolor (Merck, Cat. No. 111661). En breve, la laminilla secada al aire fue sumergida en un vaso tipo *coplin* que contenía solución 2 (eosina) por 2 minutos, se lavó con agua destilada y se sumergió en un *coplin* con solución 3 (azul de metileno) por 30 s. La laminilla se lavó con agua destilada y se secó al aire.

Las laminillas se observaron en el microscopio invertido AxioVert A.2 (Zeiss) con un objetivo de 63X en campo claro. Se contaron al menos 1000 células por laminilla, en un experimento por duplicado. El índice mitótico se calculó con la siguiente formula:

$$\% IM = \frac{\text{células mitóticas}}{\text{células totales}} \times 100$$

Donde el número de células totales es igual al número de células mitóticas más el número de células en Interfase.

6.8. Análisis de Inmunofluorescencia

Un trabajo previo llevado a cabo en nuestro grupo mostró que la localización de MAD2 γ durante la interfase es nuclear. Sin embargo, se desconoce cuál es su localización durante la mitosis. En este trabajo se decidió estudiar la localización de MAD2 γ -FLAG por inmunofluorescencia durante esta etapa del ciclo celular. Las células se sembraron en lamillas acopladas a cámaras de cultivo (*Chamberslides*) o se realizaron esparcidos metafásicos mediante cito centrifugación para mejorar la visualización de los cromosomas.

Laminilla acoplada a cámaras de cultivo: Se realizó una transfección transitoria como se describe en el apartado 6.6. 24 horas después las células se tripsinizaron, se sembraron en *Chamberslides* de dos pozos (7×10^4 células/pozo en 2 mL de medio; Nunc, Cat. No.154461) y se dejaron en incubación por 30 h para que se adhirieran y recuperaran su morfología normal.

Cito-centrifugación: Se realizó una transfección transitoria como se describe en el apartado 6.4. 24 h post transfección las células se bloquearon con 2 mM de Timidina (sigma Cat. No. T9250) por 18 h. Posteriormente, se lavaron 2 veces con PBS y se liberaron en Nocodazol (Sigma Cat. No. M1404) 100 ng/mL por 12-14h. Después, se retiró el medio y se sustituyó por solución hipotónica (KCl 75 mM) a 37 ° C. Se dejó que las células se hincharan por 15 minutos en incubación a 37 °C. Las células se tripsinizaron, se re suspendieron en 2 mL de solución hipotónica. Se colocó 1 mL de PBS y 100 μ L de suspensión celular en el adaptador de una cito centrifuga (Rotofix 32A, Hettich), las células se adhirieron a una laminilla cargada (Superfrost plus, Fisher scientific Cat. No. 12-550-15) centrifugando a 800 RPM por 1 minuto.

Inmunofluorescencia: Las células se pre-extrajeran con Triton X-100 al 0.5 % en PBS por 5 minutos e inmediatamente después se fijaron con formaldehído al 3.7 % en PBS por 15 minutos. Se hicieron 2 lavados de 5 minutos con PBS. Se bloqueó con TritonBlock (5 % BSA, 200 mM de glicina, 0.2 % Triton X-100), se cubrió

con *parafilm* y se incubó 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se retiró el exceso y sin lavar se colocó 50 μ L el anticuerpo primario diluido en TritonBlock, se cubrió con *parafilm* y se incubó toda la noche en una cámara húmeda a 4 °C. Se lavó 3 veces con PBS por 5 minutos. Se colocó 50 μ L de anticuerpo secundario, se cubrió con *parafilm* y se incubó 1 h en una cámara húmeda a temperatura ambiente y protegido de la luz. La laminilla se lavó 4 veces con PBS por 5 minutos. Para montar se usó VectaShield con DAPI (1:8) y cubre-objetos de 22 mm. Los bordes se sellaron con barniz de uñas transparente. Se describe a continuación los anticuerpos utilizados.

Tabla 4. Lista de anticuerpos

Anticuerpo	Origen	Marca	catalogo	Dilución
MAD2	conejo	Abcam	ab70383	1:200
Anti DKKKK tag (FLAG)	cabra	Novus	NB600-344	1:2500
Alexa 568	conejo anti cabra	Invitrogen	A-11079	1:200
Cy3	cabra anti conejo	Invitrogen	A10520	1:200
BUBR1	cabra	Santa Cruz	Sc-16195	1:75
SGO1	cabra	Santa Cruz	Sc-54329	1:100

Microscopía. Las imágenes se obtuvieron con el microscopio de epifluorescencia AxioImager A2 (Zeiss) con un objetivo de 40X o bien con un objetivo de inmersión de 100X. Se obtuvieron imágenes de alta resolución mediante la técnica SIM (*Structured Illumination Microscopy*) con el microscopio Elyra (Zeiss) con un objetivo de inmersión de 100X.

6.9. Ensayo de ligación por proximidad

Para corroborar la cercanía y la probable interacción entre MAD2 α y MAD2 γ se utilizó el ensayo de ligación por proximidad o PLA (*Proximity Ligation Assay*). Se usó el kit de DuoLink *in situ* PLA (Sigma Cat. No. DUO92105) siguiendo las instrucciones del fabricante. En breve, las células se transfectaron con el plásmido MAD2 γ -FLAG como se describe en la sección 6.6 y 24 horas después se tripsinizaron y se sembraron en laminillas acopladas a cámaras de cultivo de 16 pozos (7x10³ células/ pozo en 100 μ L de medio; *Chamberslides* Nunc Cat. No. 178699). Se dejó que las células se adhirieran por 24 h y posteriormente las células

se fijaron con formaldehído al 3.7 % por 20 minutos, se permeabilizaron con tritón X-100 al 0.2 % por 5 minutos y se bloquearon con la solución de bloqueo del kit (*blocking solution*) por 30 minutos a 37 °C. Los anticuerpos anti-MAD2 y anti-FLAG se diluyeron en diluyente de anticuerpo del kit (*antibody diluent*) y se incubaron con las células por 1 h a 37 °C en cámara húmeda. El volumen de reacción siempre fue de 40 µL por reacción por pozo. Las sondas PLA se diluyeron en diluyente de anticuerpo y se incubaron con las células por 1 h a 37 °C. Se preparó la solución de ligación (buffer de ligasa 5X + agua + ligasa) y se adicionó a las células. Se incubó por 30 minutos a 37 °C. Se preparó la solución de amplificación (buffer de amplificación 5X + agua + polimerasa) y se adicionó a las células. Se incubó por 100 minutos a 37 °C. Finalmente, la laminilla fue lavada y montada con solución de montaje con DAPI (Sigma Cat. No. DUO93085). Las señales PLA se detectaron con un microscopio de epi- fluorescencia (Axiolmager 2.0, Zeiss).

6.10. Generación de líneas celulares estables

Con el objetivo de contar con un modelo donde estudiar el efecto de la sobre-expresión de MAD2γ sobre la sensibilidad a quimioterapéuticos se generó una línea celular que expresara establemente esta isoforma. Para lo cual, la línea HCT116 fue transfectada con los plásmidos MAD2γ/pcDNA3.0 o con el vector vacío pcDNA3.0 siguiendo el apartado 6.6. 24 h post transfección el medio fue sustituido por medio con G418 (Geneticin, Gibco Cat. No. 10131035) a una concentración de 500 µg/ mL. En adelante el medio siempre fue suplementado con antibiótico. El medio fue sustituido por medio fresco cada 24 h los primeros 5 días. Posteriormente, el medio fue cambiado cada 48 h hasta observar la formación de focos de crecimiento. Cuando se alcanzó una confluencia de 80 % las células se pasaron a una caja T25 y se mantuvieron en medio con antibiótico hasta que se alcanzó nuevamente una confluencia del 80 %.

Para las células transfectadas con el plásmido MAD2γ/pcDNA3.0, se sembró una placa de 96 pozos, tratando de colocar una célula por pozo. Se dejaron crecer las células una semana. Donde se observó el crecimiento de una sola colonia, las células se pasaron a una placa de 6 pozos y fueron mantenidas con medio con antibiótico. Se determinó el estatus de MAD2γ de cada clona individual por RT-PCR

y se formó una combinación de al menos 9 clonas que sobre-expresaran MAD2 γ . Con esto se generaron las sublíneas HCT116/MAD2 γ que sobre-expresa MAD2 γ y HCT116/pcDNA3.0 que contiene el vector vacío.

6.11. Determinación del IC₅₀

Para evaluar si la sobre-expresión de MAD2 γ modifica la sensibilidad a agentes que alteran la dinámica de microtúbulos se determinó la concentración inhibitoria al 50 % (IC₅₀) en la línea parental HCT116 y en las sublíneas HCT116/MAD2 γ y HCT116/pcDNA3.0. Primero, se determinó la viabilidad celular por el método del MTT, el cual se basa en la medida de la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales que pueden reducir la sal soluble de tetrazolio (de color amarillo) en un producto de formazán insoluble al agua de color púrpura. El formazán se solubiliza y se cuantifica por espectrofotometría, la absorbancia es proporcional a la viabilidad celular. Se siguió el siguiente protocolo: Se sembraron 5x10³ células por pozo en una placa de 96 pozos en 100 μ L de medio. 24 h después el medio fue sustituido por medio con colcemida o paclitaxel (0-100 nM para ambos fármacos). Las células se expusieron al fármaco por 24, 48 o 72 h. Después, sin retirar el medio se colocó 20 μ L de solución de MTT (5 mg/mL, Sigma Cat. No. M5655). Dos horas después se retiró el medio y se adicionó 100 μ L de solución de solubilización (10 % DMSO en isopropanol pH 4). Las placas se agitaron a 10000 rpm por 15 minutos. La absorbancia se determinó a 570 nm con un lector de placas (iMark, BioRad) y la viabilidad fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{A_{\text{problema}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

Donde A_{control} es la media de absorbancia del control sin fármaco y A_{problema} es la absorbancia de las células tratadas. Cada concentración fue determinada por triplicado en una misma placa y se hicieron 3 réplicas biológicas.

Posteriormente, con los datos de viabilidad se generaron gráficas de dosis-respuesta (inhibición) con el programa GraphPad Prism 5.0. El IC₅₀ se calculó automáticamente. Para determinar si existían diferencias entre las líneas celulares se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con el mismo programa. Las

diferencias entre grupos se consideraron significativas cuando el valor de p fue menor o igual a 0.05 ($p \leq 0.05$).

7. RESULTADOS

7.1. La sobreexpresión de MAD2 γ -FLAG disminuye el índice mitótico.

El empalme alternativo de MAD2 α genera dos isoformas pequeñas llamadas MAD2 β y MAD2 γ . Se ha observado que la sobre expresión estable de estas isoformas disminuye el número de células que se detienen en mitosis (índice mitótico) en presencia de paclitaxel (Yin *et al.*, 2006; López-Saavedra *et al.*, 2016). Nosotros observamos que el índice mitótico en la línea celular HCT116 que sobre-expresaba de manera transitoria MAD2 γ marcado con la etiqueta FLAG (MAD2 γ -FLAG) era menor a la línea sin transfectar, lo que sugiere una alteración en el SAC (figura 4).

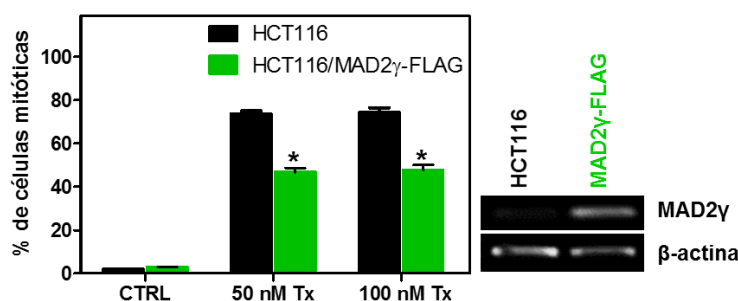


Figura 4. La sobre-expresión de MAD2 γ -FLAG disminuye el índice mitótico. Se transfectó MAD2 γ fusionada con la etiqueta N-terminal FLAG de manera transitoria en la línea celular HCT116, la sobre-expresión de MAD2 γ se determinó por PCR en punto final. Las células se expusieron a paclitaxel (Tx) por 24 h y se determinó el índice mitótico. La sobre-expresión de MAD2 γ disminuye el porcentaje de células que se detienen en mitosis (* $p < 0.5$).

7.2. Análisis *in silico* de las isoformas de MAD2

En un estudio realizado por Miao y cols. observaron una alteración en el SAC en células que sobre-sobre-expresan SNCG (sinucleína gamma) y determinaron que era debido a que esta proteína interacciona con BUBR1. Esta interacción disminuye la capacidad de BUBR1 de unirse a otras proteínas y genera un SAC defectuoso (Miao *et al.*, 2014). Hipotetizamos que la alteración en el SAC en células que sobre-expresan MAD2 γ pudiera ser debida a la interacción de esta isoforma con otras proteínas que participan en el SAC. Pensamos que MAD2 γ , a pesar de que es una isoforma pequeña, aún conserva regiones de MAD2 α importantes para la interacción con otras proteínas del SAC. Para probar nuestra hipótesis se revisaron artículos que describieran la estructura cristalográfica (u obtenidas por resonancia

magnética nuclear, RMN) de la interacción de MAD2 α con otras proteínas del SAC. Se determinó que regiones dentro de MAD2 α participan en estas interacciones, así como si estas regiones estaban presentes en las isoformas de MAD2 α . Como se observa en la tabla 2, existen dos regiones en MAD2 que son importantes para la interacción con otras proteínas: la hélice alfa C (α C) y la lámina beta 6 (β 6). Ya que no se cuenta con la información cristalográfica de las MAD2 β y MAD2 γ se procedió a realizar un análisis bioinformático.

Tabla 5. Estructuras de MAD2 en complejo con otras proteínas del SAC resueltas por cristalografía de rayos X o RMN

Estructura resuelta	Importancia en el SAC	Región en MAD2 que participa en la interacción	Referencia
MAD2/CDC20	MAD2 se une a CDC20 e inhibe el APC/C	β 6	(Luo <i>et al.</i> , 2000)
MAD1/C-MAD2	MAD1 es el receptor en los cinetocoros de MAD2	β 6	(Sironi <i>et al.</i> , 2002)
p31 ^{comet} /C-MAD2	p31 ^{comet} por medio de su estructura similar a MAD2 bloquea la formación de C-MAD2	β 6	(Yang <i>et al.</i> , 2007)
O-MAD2/C-MAD2	MAD2 existe en dos conformaciones nativas	α C/ α C	(Luo <i>et al.</i> , 2004; Mapelli <i>et al.</i> , 2007; Yang <i>et al.</i> , 2008)
I-MAD2/C-MAD2	Existe un intermediario entre la conformación abierta y cerrada de MAD2	α C/ α C	(Hara, Özkan, Sun, Yu, & Luo, 2015)

7.2.1. Análisis de la estructura de MAD2 β

La isoforma beta de MAD2 fue descrita originalmente por Yin y cols. Esta isoforma se genera por empalme alternativo y carece del exón 3. El empalme del exón 2 con el exón 4 ocasiona un corrimiento en el marco de lectura y genera un codón de término prematuro a 49 nucleótidos del sitio del empalme. Este mRNA se traduce a

una proteína de 90 aminoácidos (Yin *et al.*, 2006). Por medio del servidor <http://swissmodel.expasy.org/> se generó un modelo por homología de MAD2 β . Se usó como molde la estructura con PDB 1GO4. La estructura secundaria predicha comprende el alfa hélice A (α A), la horquilla beta y el α B de MAD2 α . El extremo C-terminal comprende 16 aminoácidos que no están presentes en MAD2 α y se generan por el corrimiento del marco de lectura. En la figura 5C se observa que esta isoforma perdió el α C y las láminas beta 4-8.

7.2.2. Análisis de la estructura de MAD2 γ

La isoforma gamma de MAD2 fue descrita por López-Saavedra y col. en nuestro grupo de investigación. Esta isoforma se genera por empalme alternativo y carece de los exones 2 y 3. El empalme del exón 1 con el 4 ocasiona un corrimiento en el marco de lectura y genera un codón de término prematuro a 52 nucleótidos del sitio de empalme. Se predice que este mRNA se traduce a una producto proteico de 41 aminoácidos (López-Saavedra *et al.*, 2016). De la misma manera se generó un modelo por homología de MAD2 γ . Se usó como molde la estructura con PDB IS2H. La estructura secundaria predicha comprende solo el α A de MAD2 α . El carboxilo terminal comprende una región de 17 aminoácidos que no están presentes en MAD2 α y se generan por el corrimiento del marco de lectura (figura 5C).

Con base en lo anterior concluimos que MAD2 β y MAD2 γ no podrían interaccionar con otras proteínas del SAC de la misma manera que lo hace MAD2 α , ya que carecen de las regiones α C y β 6. El análisis previo reveló que estas estructuras son determinantes para la interacción con O-MAD2, CDC20, MAD1 y p31^{comet}. Lo anterior sugiere que las isoformas podrían tener un papel diferente de MAD2 α .

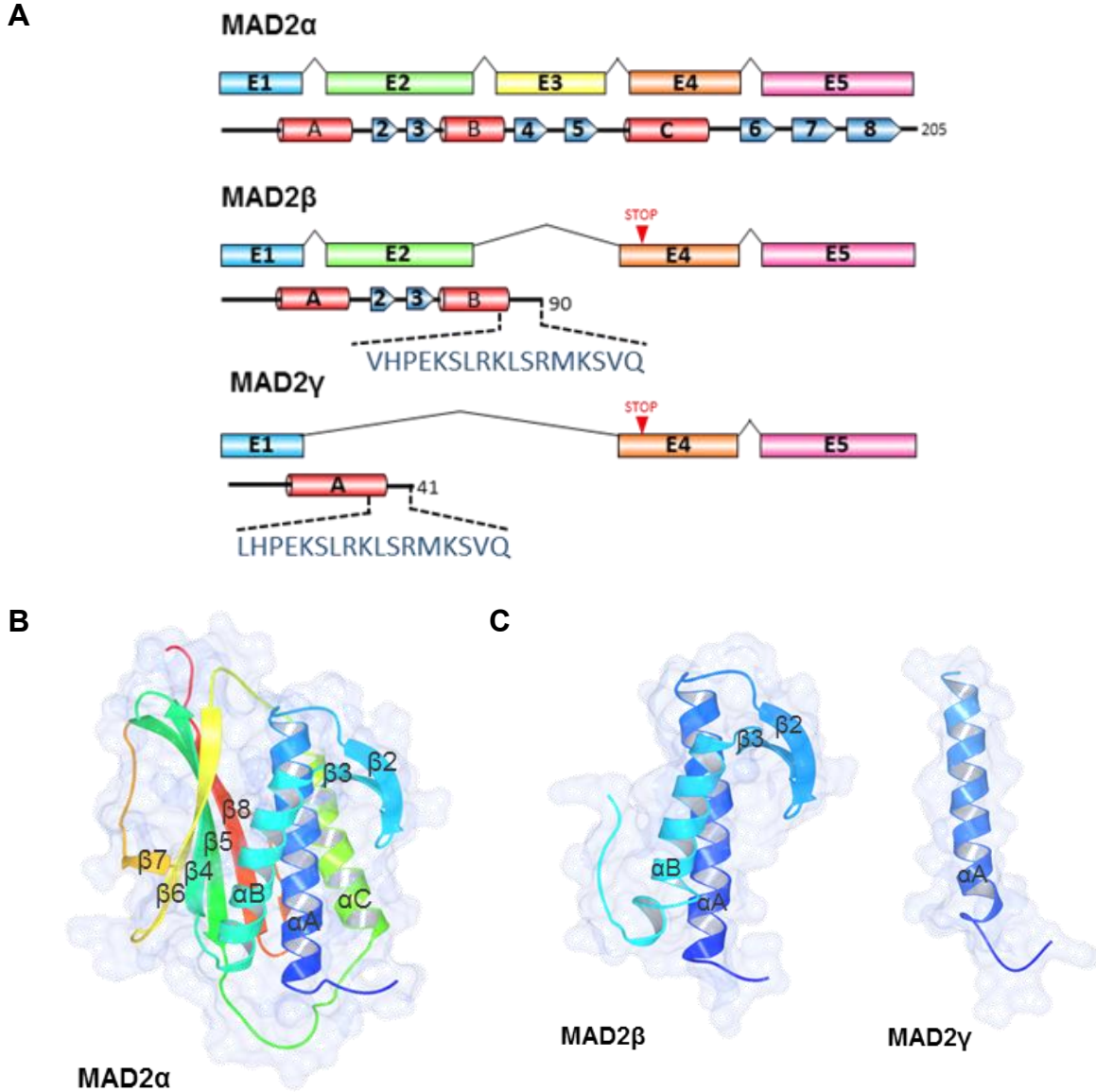


Figura 5. Las isoformas de MAD2 se generan por el empalme alternativo de exones. (A) Arreglo de los exones (E1-E5) y estructura secundaria de MAD2 y sus isoformas. El empalme alternativo de MAD2 produce dos isoformas: MAD2 β y MAD2 γ , que carecen del exón 3 y dos y tres, respectivamente. Un corrimiento en el marco de lectura en el exón cuatro de las isoformas genera un codón de termino prematuro y un extremo C-terminal distinto a la proteína canónica (secuencia en azul). (B) diagrama de listón de la conformación cerrada de MAD2 (C-MAD2, PDB 1GO4) y (C) modelos por homología de sus isoforma. MAD2 β y MAD2 γ .

7.2.3. Identificación de dos motivos conservado en el extremo C-terminal de las isoformas de MAD2

El análisis de MAD2 β y MAD2 γ sugiere que estas isoformas no podrían interaccionar con otras proteínas del SAC, de la misma forma que lo hace MAD2 α . Sin embargo, nuestros resultados, así como, los obtenidos por López-Saavedra y cols. y Yin y cols. sugieren que ambas isoformas tienen un papel dentro del SAC. Por lo que, lo siguiente que se realizó fue buscar otras alternativas por las que las isoformas pudieran estar participando en el SAC. Una primera aproximación fue identificar secuencias de aminoácidos que son importantes para la función de proteínas del SAC y buscar si estas secuencias están presentes en las isoformas de MAD2 α .

7.2.3.1. Identificación del motivo R(L/M)K

En ambas isoformas el empalme alternativo genera un corrimiento en el marco de lectura y en el extremo carboxilo terminal una secuencia nueva de 17 aminoácidos. Decidimos centrar nuestro análisis en esta secuencia ya que no está presente en MAD2 α . De manera interesante, identificamos que existe cierta similitud entre esta secuencia y el motivo RLK (Arg-Leu-Lys) de MAD1. Un alineamiento local del extremo C-terminal de las isoformas de MAD2 α con el motivo RLK de MAD1 de diferentes especies reveló una identidad del 40.0 % y similitud del 53.3 % entre ambos motivos (figura 6A). Algunas mutaciones en el motivo RLK (RLK \rightarrow AAA) de MAD1 previenen su localización en los cinetocoros (Heinrich *et al.*, 2014). La presencia de este motivo en las isoformas sugiere que podrían estar localizándose en los cinetocoros en respuesta a la activación del SAC, como lo haría MAD1.

7.2.3.2. Identificación de un motivo de interacción con MAD2 (MIM)

Las proteínas del SAC MAD1 y CDC20, así como otras proteínas tales como MKLp2, FAT10, SGO2 y el receptor de insulina (INSR) interaccionan con la forma activa de MAD2 α (C-MAD2) a través de un motivo de interacción con MAD2 (Choi, Zhang, Xing, & Yu, 2016; Izawa & Pines, 2012; Lee, McCormick, & Saya, 2010; Orth *et al.*, 2011; Sironi *et al.*, 2002; Theng *et al.*, 2014). MAD2 α tras su unión con MAD1

o CDC20 (y probablemente con las proteínas mencionadas anteriormente) sufre un cambio conformacional, en el cual, la lámina β -6 y 7 abrazan el MIM formando un cinturón de seguridad. Los residuos F151-D158 y W167-S170 de MAD2 α forman puentes de hidrogeno con el MIM estabilizando de esta manera su unión (figura 6B). De manera interesante, en la secuencia del extremo C-terminal de MAD2 β y MAD2 γ encontramos un motivo similar al MIM, como lo muestra el alineamiento con otras proteínas que poseen este motivo (figura 6C). De las proteínas analizadas encontramos que existe mayor similitud con el MIM de CDC20 (figura 6D), por lo que pensamos que MAD2 β y MAD2 γ pueden interactuar con MAD2 α y estabilizarse en el cinturón de seguridad como la haría CDC20. Si se da esta interacción, resultaría mutuamente excluyente. Esto podría tener consecuencias importantes, ya que la unión de CDC20 con C-MAD2 es el paso limitante de la puesta en marcha del SAC, por lo tanto, bloquear esta interacción podría inhibir el SAC.

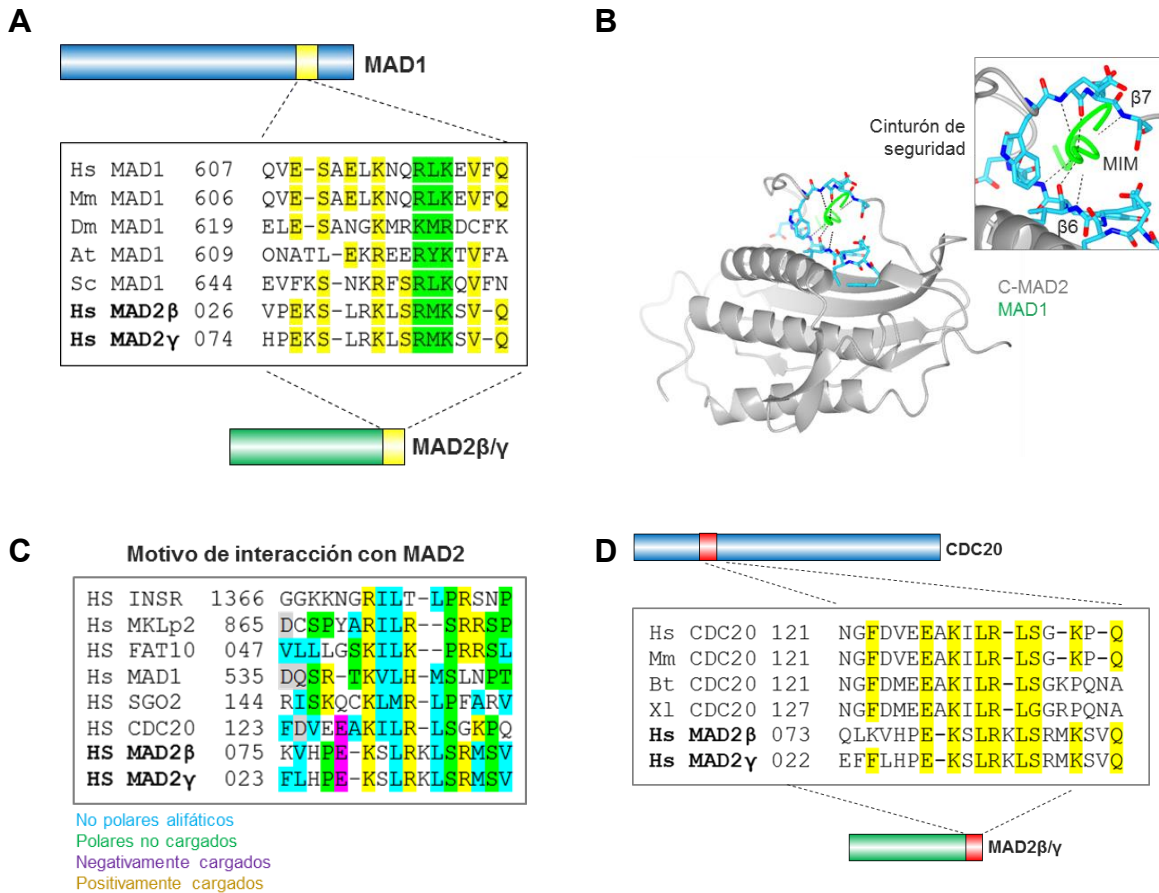


Figura 6. Identificación de dos motivos conservados en el extremo C-terminal de las isoformas de MAD2. A) Alineamiento de la secuencia de MAD1 que contiene el motivo R(L/M)K de varios organismos con el extremo C-terminal de las isoformas de MAD2. Se resaltan los aminoácidos conservados en amarillo. En verde se muestran los aminoácidos que conforman el motivo R(L/M)K. (B) Diagrama de listón de la estructura de C-MAD2 (PDB 1GO4, gris) unida al motivo de interacción con MAD2 (MIM) de MAD1 (verde, aa 539-547), se muestran con líneas punteadas la red de puentes de hidrogeno entre los aminoácidos F151-D158 y W167-S170 de MAD2 y el MIM de MAD1. Se muestra un acercamiento a la interacción MAD2-MIM(MAD1) conocido como cinturón de seguridad. (C) Alineamiento del MIM de proteínas reportadas que interaccionan con MAD2 con el extremo C-terminal de las isoformas de MAD2, los aminoácidos bioquímicamente similares se muestran del mismo color. (D) Alineamiento del MIM de CDC20 de varias especies con el extremo C-terminal de las isoformas de MAD2, los aminoácidos conservados se muestran en amarillo. D). Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; Bt, *Bos Taurus*; Xl, *Xenopus laevis*; Dm, *Drosophila melanogaster*; At *Arabidopsis thaliana* y Sc, *Saccharomyces cerevisiae*.

7.3. Localización de MAD2 γ

Estudios previos en el laboratorio encontraron que MAD2 γ se localiza en el núcleo durante la Interfase en la línea celular HCT116. Adicionalmente, el análisis bioinformático propone que MAD2 γ se localiza en los cinetocoros y que podría interactuar con C-MAD2, lo que sugiere una participación en la mitosis. Para examinar si la localización de MAD2 γ ocurre de esta manera, se sobre-expresó MAD2 γ fusionada con la etiqueta en el extremo N-terminal FLAG en las líneas celulares HCT116 y HeLa. Se encontró que MAD2 γ tiene una distribución subcelular similar a MAD2 α durante la mitosis (figuras 7, 8 y 9). Al comienzo de la profase MAD2 γ pasó de ser nuclear a ser citoplasmática y continuó así hasta después del anafase. Durante la prometafase MAD2 α se acumuló en los cinetocoros de los cromosomas que no están unidos a los microtúbulos. De manera interesante, observamos que MAD2 γ que tenía un patrón de localización similar, tanto en HCT116 y en HeLa. Para determinar si MAD2 γ se localiza en los cinetocoros analizamos su localización en esparcidos metafásicos con la técnica de microscopia de alta resolución SIM. Como se observa en la figura 10, MAD2 γ se localizó en la región centrómero-cinetocoro de los cromosomas.

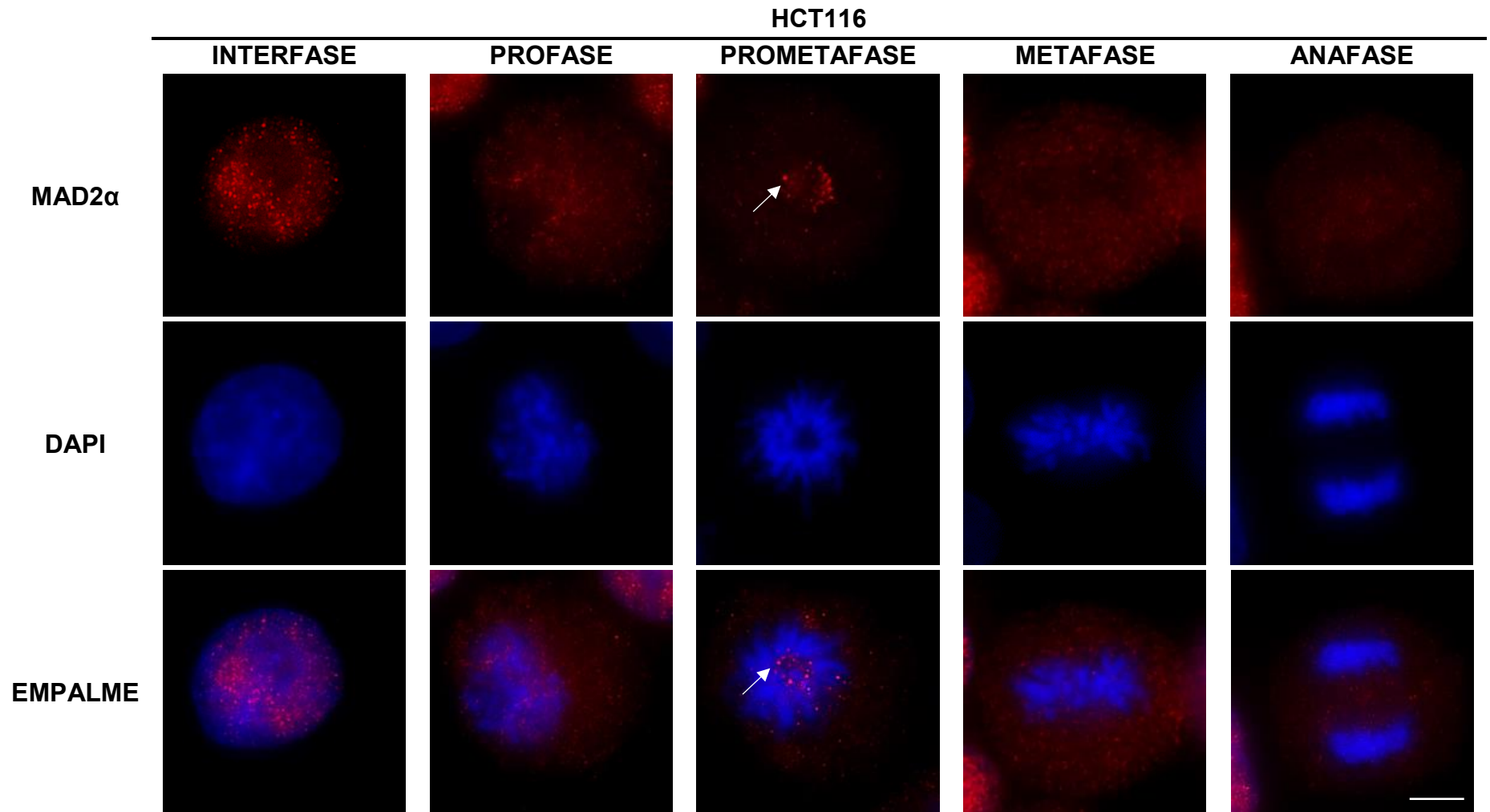


Figura 7. Localización de MAD2 α en la línea celular HCT116 durante la mitosis. Inmunofluorescencias representativas que indican la localización de MAD2 α durante diferentes etapas de la mitosis. MAD2 α muestra una localización característica en los cinetocoros de los cromosomas durante la prometafase (flecha, barra de escala 5 μ m)

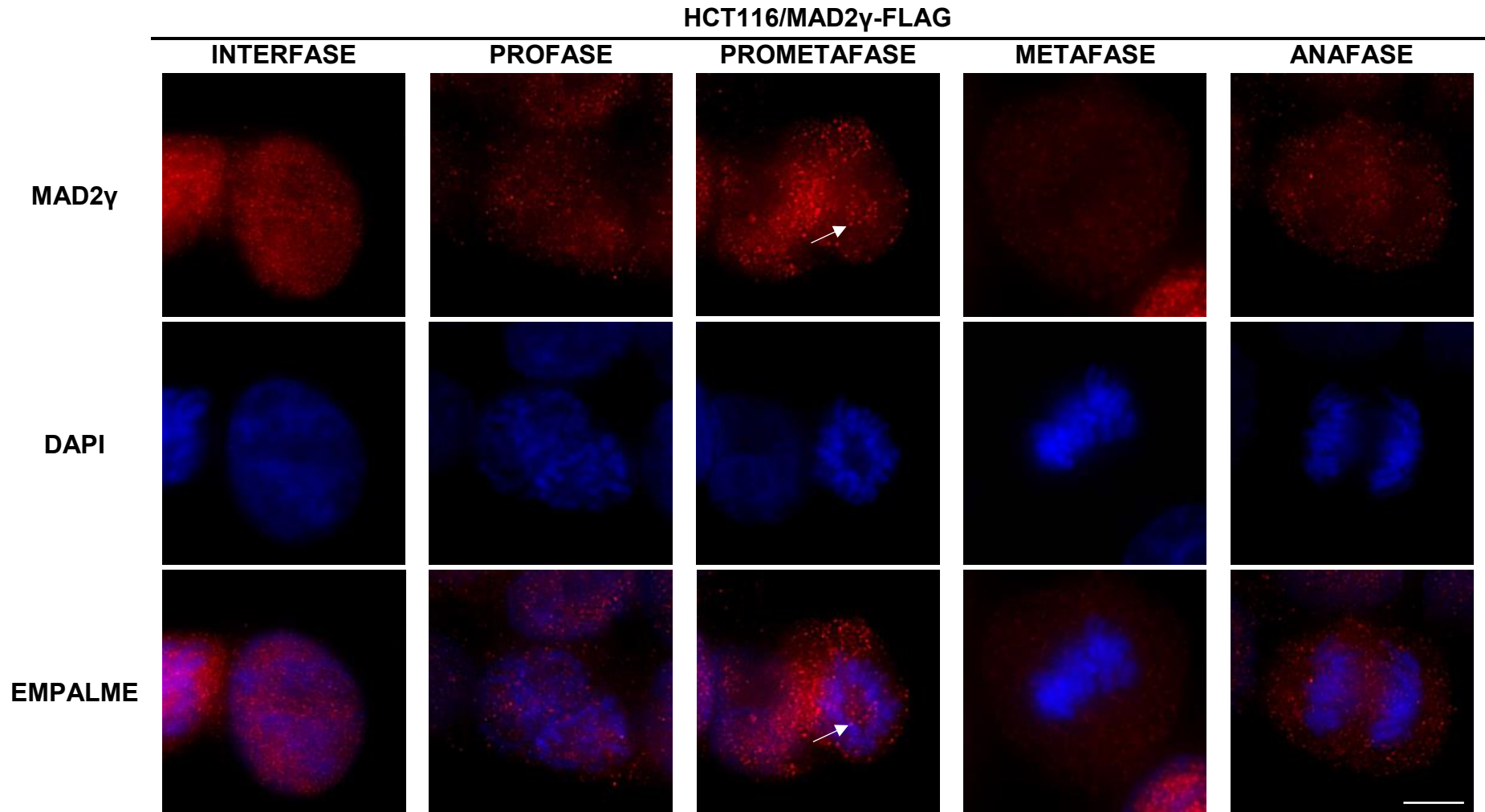


Figura 8. Localización de MAD2 γ -FLAG en la línea celular HCT116 durante la mitosis. Inmunofluorescencias representativas que indican la localización de MAD2 γ -FLAG en la línea celular HCT116 durante diferentes etapas de la mitosis. MAD2 γ muestra una localización en los cinetocoros de los cromosomas durante la prometafase (flecha, barra de escala 5 μ m).

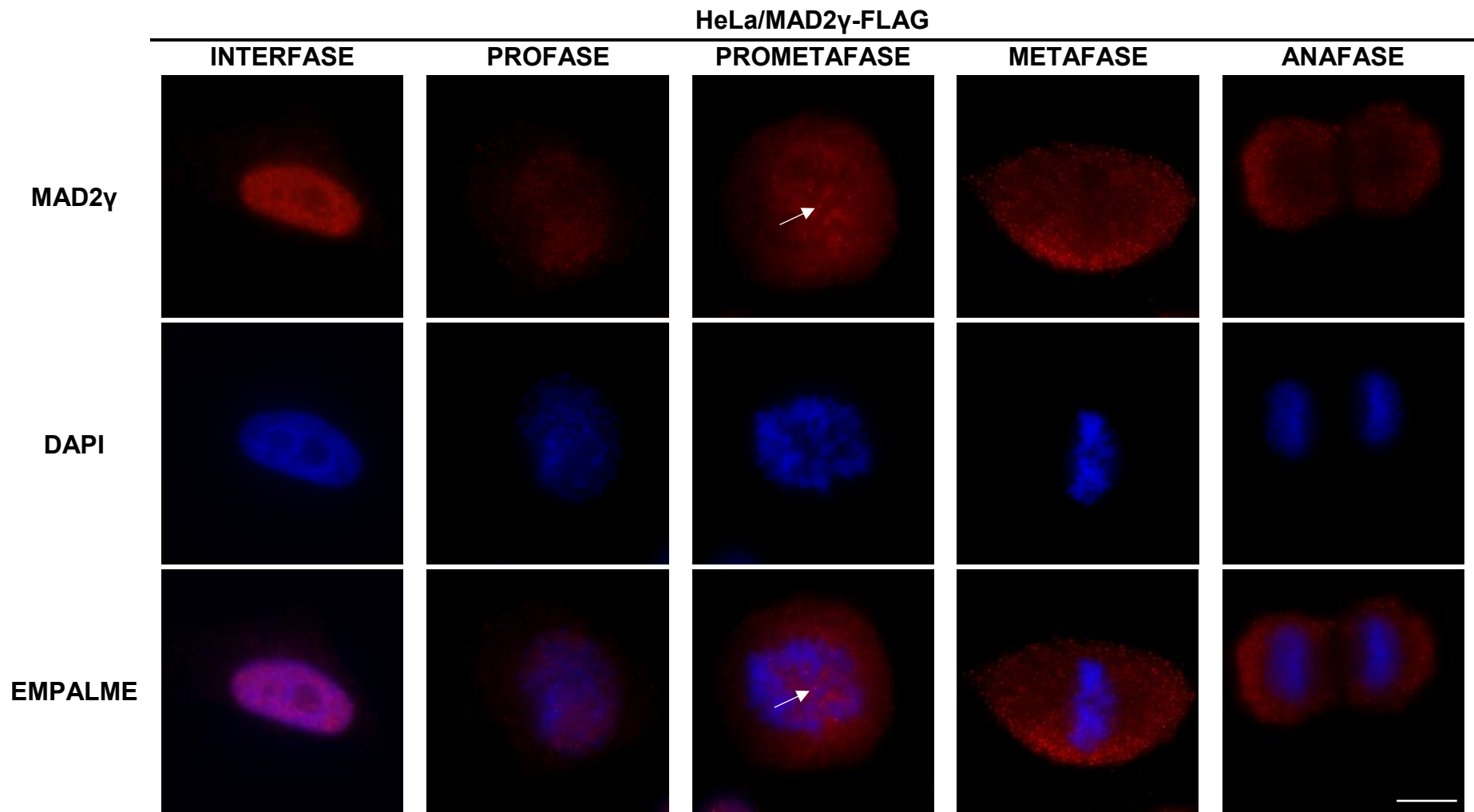


Figura 9. Localización de MAD2 γ -FLAG en la línea celular HeLa durante la mitosis. Inmunofluorescencias representativas que indican la localización de MAD2 γ -FLAG en la línea celular HeLa durante diferentes etapas de la mitosis. MAD2 γ muestra una localización en los cinetocoros de los cromosomas durante la prometafase (flecha, barra de escala 5 μ m).

HeLa MAD2 γ -FLAG

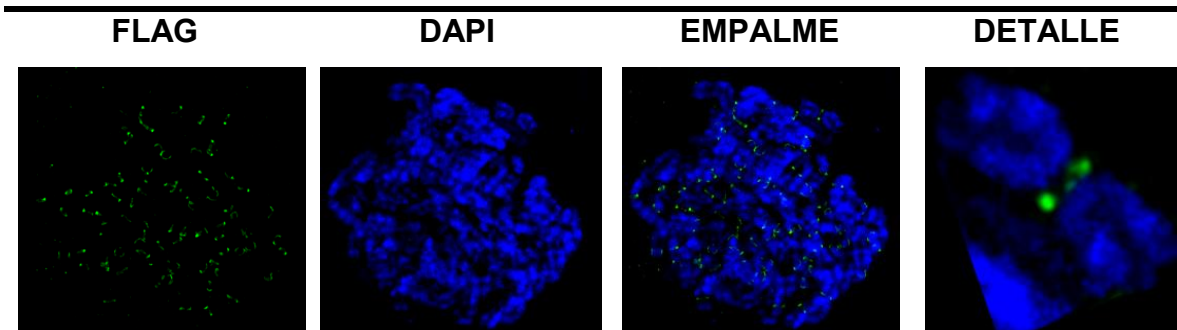


Figura 10. MAD2 γ se localiza en lo cinetocoros durante la mitosis. Inmunofluorescencia representativas de HeLa transfectadas con MAD2 γ -FLAG. Las células se bloquearon con timidina y se liberaron en nocodazol para enriquecer en mitosis. Imagen obtenida por microscopia de alta resolución donde se observa que MAD2 γ se localiza en la región centrómero-cinetocoro de los cromosomas.

7.4. Co-localización de MAD2 γ con MAD2 α

El análisis de la secuencia de MAD2 β y MAD2 β arrojó que en el extremo C-terminal se encuentra un motivo putativo de interacción con MAD2 (MIM). MAD2 γ solo podría interaccionar con la forma activa de MAD2 α (C-MAD2) ya que en esta conformación se forma la estructura denominada “cinturón de seguridad” que es la que interacciona con el MIM. Esta conformación solo se genera en mitosis cuando se activa el SAC. Para comprobar si existe una interacción de MAD2 α con MAD2 γ durante la mitosis se sobre-expreso MAD2 γ fusionada con GFP en la línea celular HeLa. Se encontró que MAD2 γ -GFP co-localiza con MAD2 α en el cinetocoro de cromosomas (figura 11).

HCT116/MAD2 γ -GFP

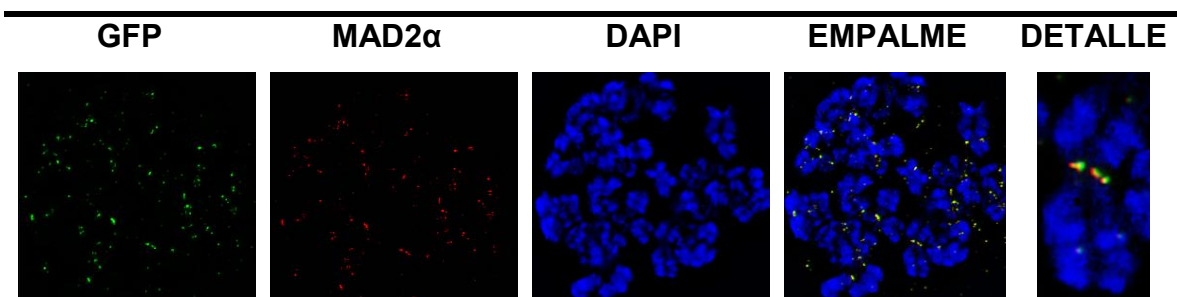


Figura 11. MAD2 γ -GFP co localiza con MAD2 α . inmunofluorescencia representativas de HCT116 transfectadas con MAD2 γ -GFP. Las células se bloquearon con timidina y liberadas en nocodazol para enriquecer en mitosis. Se observa que MAD2 α co-localización con MAD2 γ -GFP.

Posteriormente, para confirmar la proximidad y posible interacción entre MAD2 γ y MAD2 α , se sobre-expresó MAD2 γ fusionada con la etiqueta N-terminal FLAG en las

líneas celulares HCT116 y HeLa y se realizó el ensayo de ligación por proximidad. En este ensayo se usan dos anticuerpos de diferentes especies contra las proteínas que se cree que interactúan, después los anticuerpos secundarios unidos a una sonda de DNA reconocen los anticuerpos primarios, si las proteínas se encuentran en cercanía (30-40 nm), las sondas pueden unirse y amplificarse por PCR. Finalmente, un fluoróforo unido a una sonda de oligonucleótidos complementarios puede hibridar el amplificado y puede ser visualizado como señales por microscopía de fluorescencia. Para determinar la especificidad de la interacción, se usó la proteína BUBR1 que se sabe que interacciona con MAD2 α (Tipton *et al.*, 2011) como control positivo y la proteína SGO1 que no interacciona con MAD2 α (Orth *et al.*, 2011) como control negativo. Primero, los anticuerpos se validaron por inmunofluorescencia siguiendo la metodología del apartado 6.8 (figura 12).

Como se observa en las figuras 13 y 14 existe señal PLA entre MAD2 γ -FLAG y MAD2 α en ambas líneas celulares lo que sugiere que se encuentran próximas y posiblemente interaccionado. Tomando en conjunto, nuestros resultados sugieren que el motivo MIM presente en MAD2 γ puede mediar la interacción con MAD2 α .

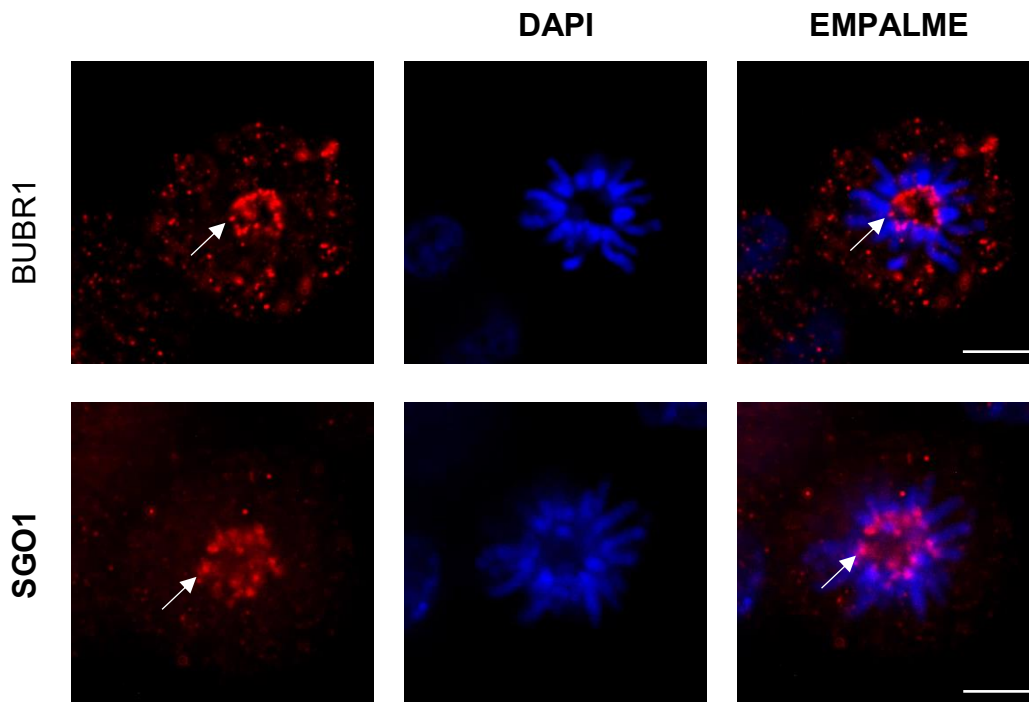


Figura 12. BUBR1 y SGO1 se localizan en la región centrómero-cinetocoro durante la prometafase. Se validó la localización de BUBR1 y SGO1 en mitosis en la línea celular HCT116 mediante inmunofluorescencia (barra de escala 5 μ m)

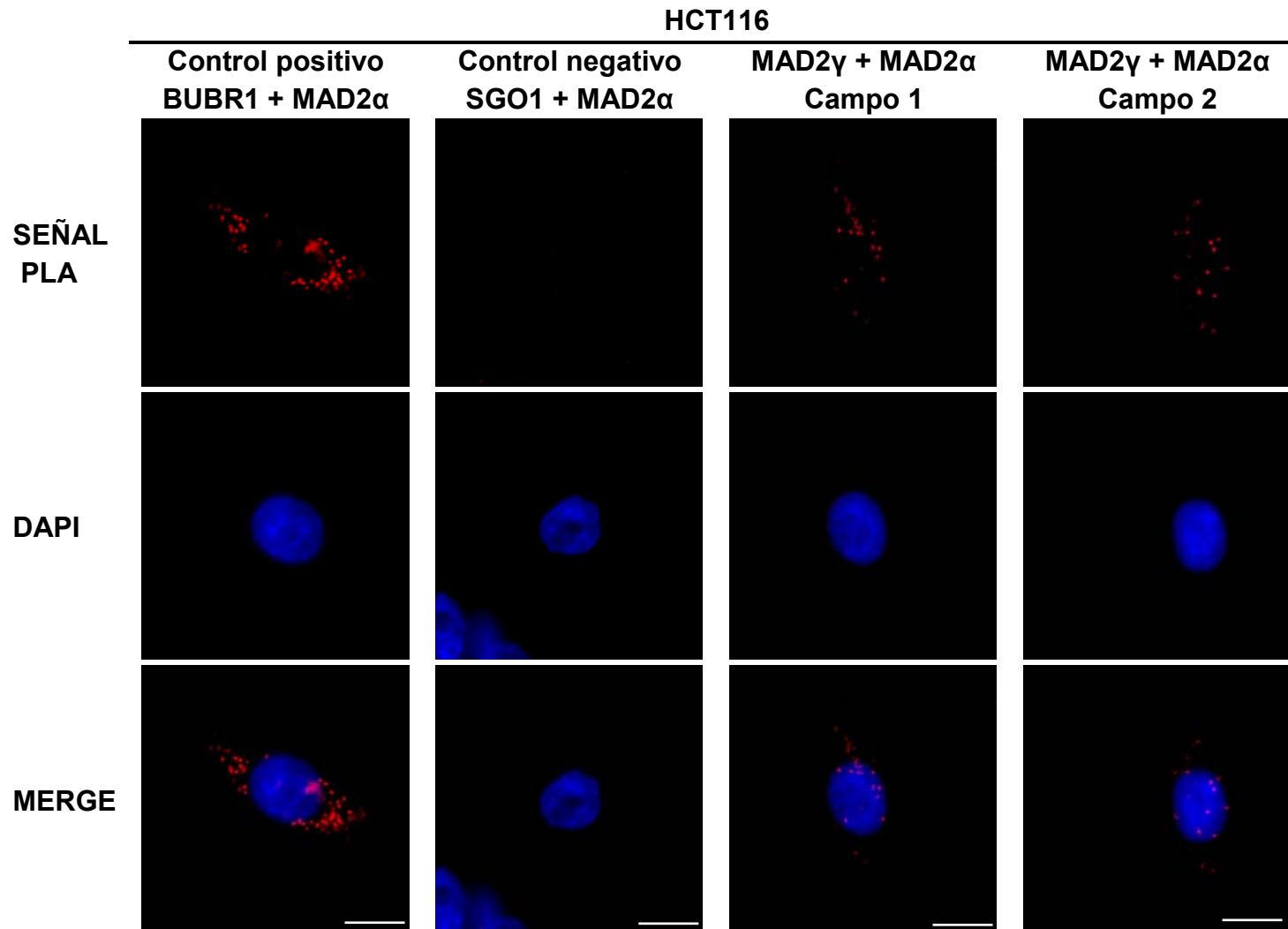


Figura 13. MAD2 γ interacciona con MAD2 α en el ensayo de ligación por proximidad (*Proximity Ligation Assay, PLA*). Las células HCT116 se transfectaron con el vector MAD2 γ -FLAG y se sembraron en laminillas acopladas a cámaras de cultivo. Las células se incubaron con el anticuerpo anti-MAD2 α y anti-FLAG seguido del ensayo de ligación por proximidad (PLA). Se usó como control positivo la interacción de MAD2 α con la proteína del SAC BUBR1 y como negativo con SGO1 (barra de escala 10 μ m) .

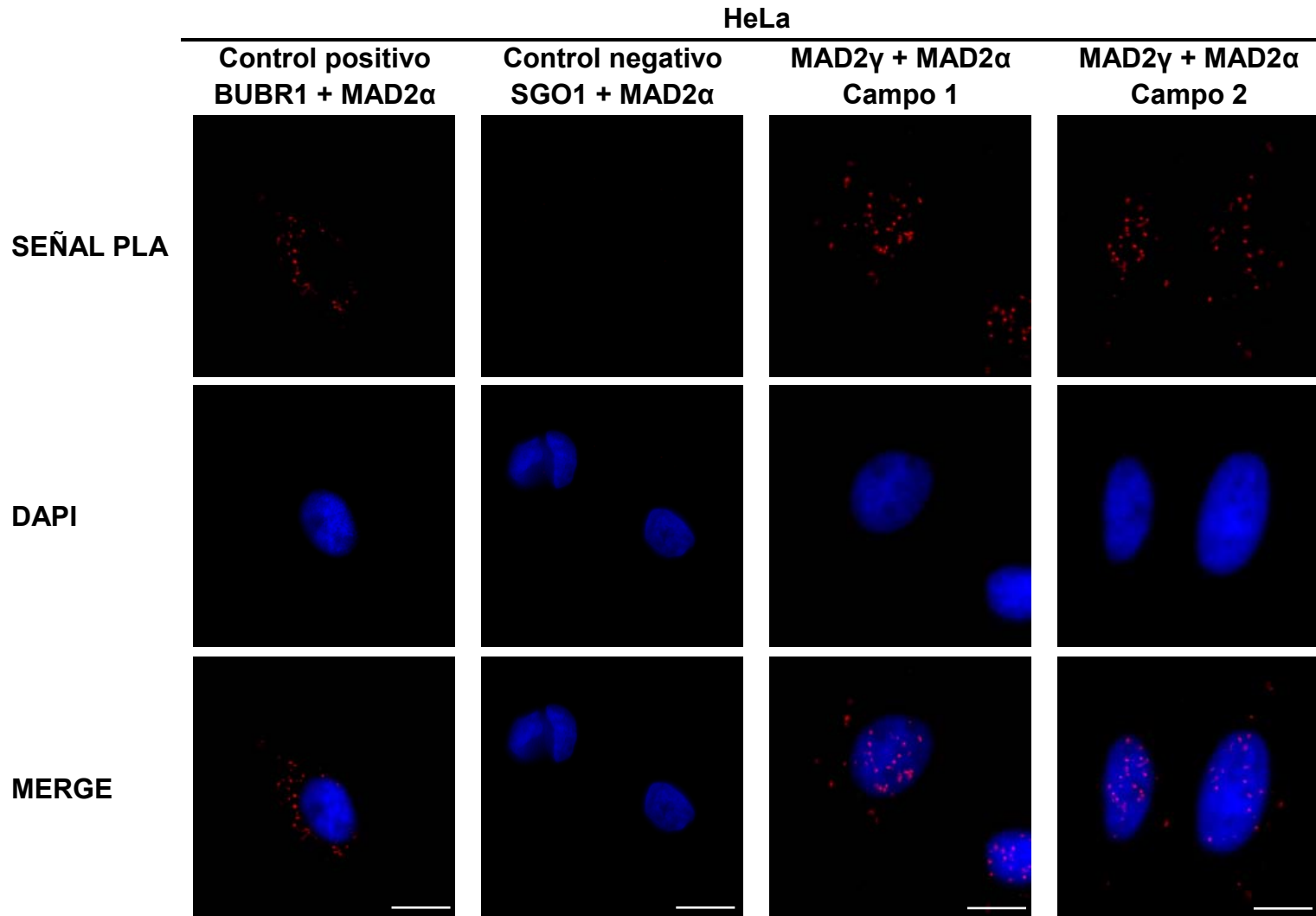


Figura 14. MAD2 γ interacciona con MAD2 α en el ensayo de ligación por proximidad (*Proximity Ligation Assay*). Las células HeLa se transfectaron con el vector MAD2 γ -FLAG y se sembraron en laminillas acopladas a cámaras de cultivo. Las células se incubaron con el anticuerpo anti-MAD2 α y anti-FLAG seguido del ensayo de ligación por proximidad (PLA). Se usó como control positivo la interacción de MAD2 α con la proteína del SAC BUBR1 y como negativo con SGO1 (barra de escala 10 μ m).

7.5. Modelo de la participación de MAD2 γ en el SAC

Con base en los resultados anteriores proponemos que MAD2 γ participa en el SAC. Cuando se activa este punto de monitoreo, en respuesta a una falta de unión de los cinetocoros con los microtúbulos, tanto MAD2 α como sus isoformas se reclutan a estos cinetocoros. En el contexto de una sobre expresión de MAD2 γ , esta proteína interacciona con la conformación activa de MAD2 α (C-MAD2 α). De esta manera disminuye la concentración de C-MAD2 α disponible para interactuar con CDC20 y formar el MCC. CDC20 libre puede interactuar con APC/C, lo que da lugar a la progresión de la metafase a la anafase y la salida de la mitosis (figura 15). Lo anterior tiene implicaciones importantes tanto en la segregación cromosómica, como en la resistencia a quimioterapéuticos.

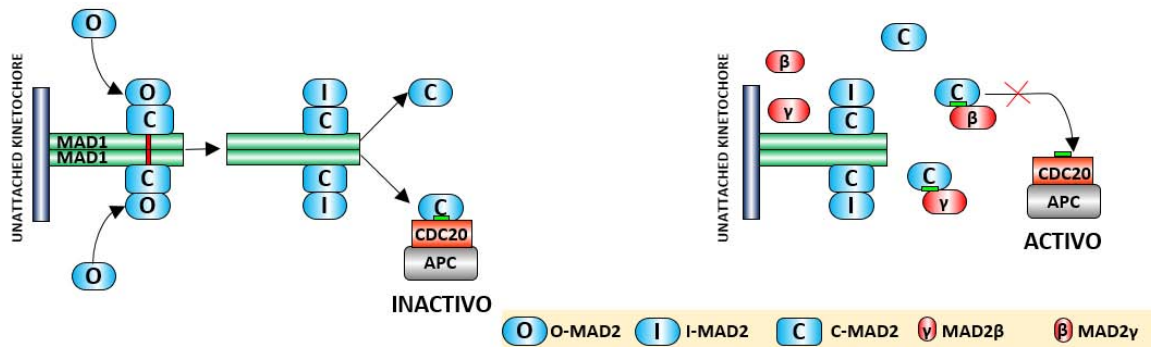


Figura 15. Rol propuesto de la isoformas de MAD2 en el punto de monitoreo del huso mitótico. Tras la activación del SAC, la forma inactiva de MAD2 (O-Mad2) se une al complejo Mad1-Mad2 que induce un cambio conformacional de O -Mad2 a un estado intermedio (I-Mad2). I-Mad2 se disocia del complejo de Mad1-Mad2 para convertirse en la forma activa C-MAD2. C-MAD2 se une a CDC20 través de un MIM (mostrada en verde) y abate la función APC / C. Esta es la manifestación bioquímica de "señal de espera". Proponemos que las isoformas MAD2 son reclutados a cinetocoros y pueden competir con CDC20 por la unión con C-MAD2. Ya que el complejo MAD2 (β / γ) /C-MAD2 no se puede unir a CDC20, el SAC es inhibido y CDC20 libre puede activar APC / C dando comienzo a la anafase.

7.6. Efecto de la expresión de MAD2 γ sobre la sensibilidad a agentes que alteran la dinámica de microtúbulos

Los fármacos que tienen como blanco los microtúbulos, activan el SAC y detienen a las células en mitosis. Se ha descrito que una detención prolongada conlleva a apoptosis y se ha sugerido que éste es uno de mecanismos citotóxicos de fármacos como la colcemida y el paclitaxel (Mcgrogan, Gilmartin, Carney, & Mccann, 2008). Si la sobre-expresión de MAD2 γ causa una salida de mitosis aun en presencia de un paclitaxel, pensamos que esto conllevaría a una menor sensibilidad a este fármaco.

Para probar nuestra hipótesis, se generó la línea celular HCT116/MAD2 γ que expresa establemente MAD2 γ , así como, la línea HCT116/pcDNA3.0 que expresa el vector vacío. Tanto la línea parental HCT116, como las sublíneas se expusieron a diferentes concentraciones de colcemida (estabiliza los microtúbulos) y paclitaxel (desestabiliza los microtúbulos) y se determinó su viabilidad a las 24, 48 y 72 h por el método del MTT. Finalmente, con los datos de viabilidad se calculó el IC₅₀. Como se observa en la figura 16, no se encontró diferencia entre las líneas a las 24 y 48 h para ambos fármacos, pero a las 72 horas se observó que el IC₅₀ del paclitaxel y la colcemida en la línea celular HCT116/MAD2 γ fue 4.6 y 2.0 veces mayor, respectivamente, que la línea parental. Esto indica que la sobre-expresión de MAD2 γ disminuye la sensibilidad a fármacos que alteran la dinámica de los microtúbulos en la línea HCT116.

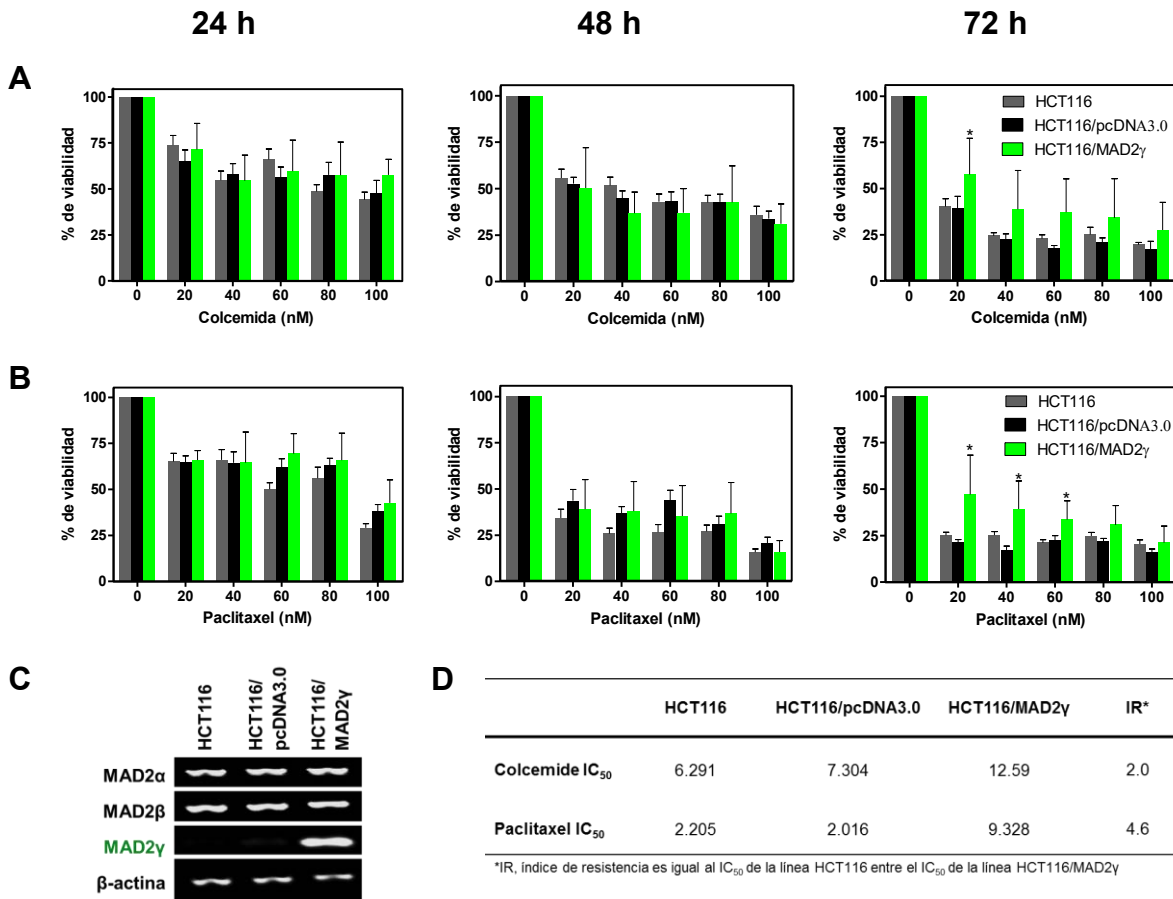


Figura 16. La sobre-expresión de MAD2 γ disminuye la sensibilidad a agentes que alteran la dinámica de microtúbulos. La línea parental HCT116, así como las sublíneas que expresa de manera estable MAD2 γ (HCT116/MAD2 γ) y el vector vacío (HCT116/pcDNA3.0) se expusieron a diferentes concentraciones de colcemida (A) o paclitaxel (B) por 24, 48 y 72h, posteriormente se determinó la viabilidad por el método de MTT. (C) RT-PCR para MAD2 y sus isoformas, se observa que la línea HCT116/MAD2 γ sobre-expresa MAD2 γ . (D) Con los datos de viabilidad se calculó el IC₅₀ para cada fármaco, en la tabla se muestra los resultados para las 72 h. La línea que expresa MAD2 γ es menos sensible a colcemida y a paclitaxel que aquellas que no lo expresan (*p<0.05).

7.7. Expresión de MAD2 y su isoformas en líneas celulares de cáncer

Ya que la sobre-expresión estable de MAD2 γ disminuye la sensibilidad a agentes que alteran la dinámica de microtúbulos en la línea de adenocarcinoma de colon HCT116, pensamos que podría estar relacionada con la quimiorresistencia en otros tipos de cáncer. Por lo que, primero determinamos la expresión endógena de MAD2 α y sus isoformas en diferentes líneas de cáncer por RT-PCR. Se usaron juegos de oligos diseñados para amplificar cada isoforma de manera específica (figura 17A).

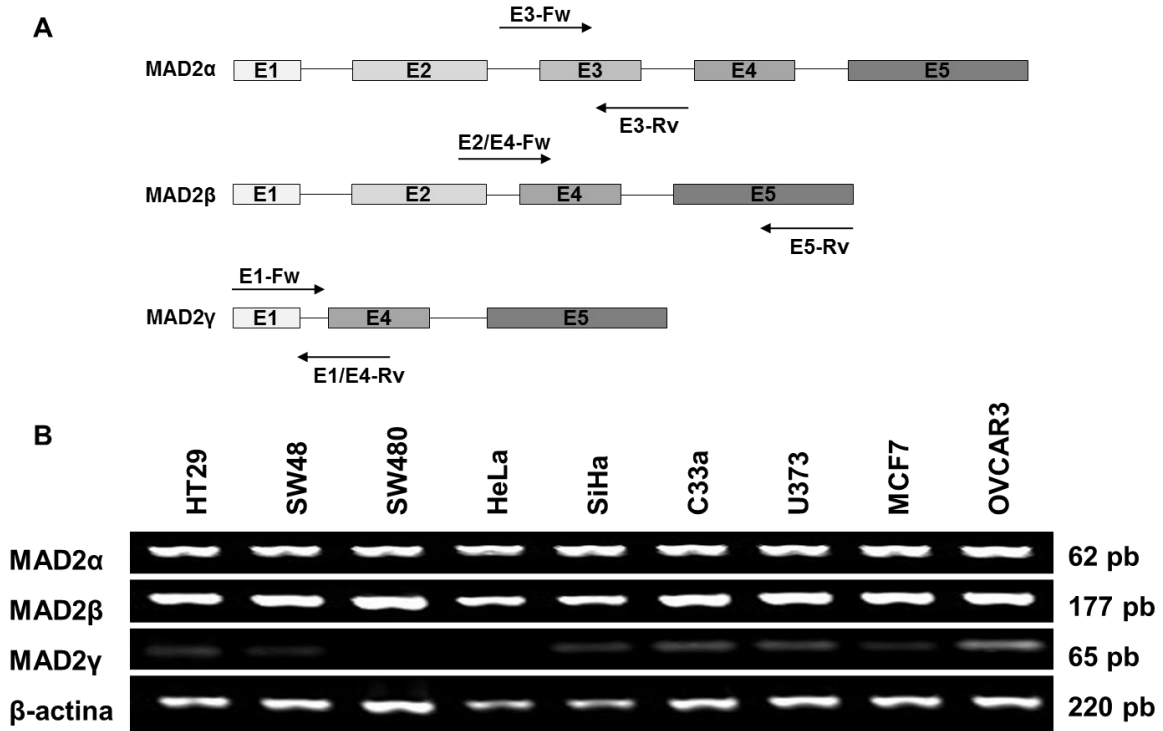


Figura 17. Expresión de MAD2 y sus isoformas en líneas celulares de cáncer. (A) Representación esquemática que muestra la localización de los oligos utilizados para amplificar MAD2α y sus isoformas por RT-PCR. Para MAD2α se usaron *primers* que cubren el Exón 3, ya que es solo en esta isoforma está presente (Fw-E3, Rv-E3); para MAD2β se amplificó el empalme del exón 2 con el 4 junto y el exón 5 (Fw-E2/E4, Rv-E5); para MAD2γ se amplificó parte del exón 1 junto con el empalme del exón 1 con el 4 (Fw-E1, Rv-E1/E4). (B) se observa que MAD2α y sus isoformas se encuentran diferencialmente expresadas en líneas celulares de cáncer.

Se observó que, mientras que la expresión de MAD2α es constante en todas las líneas analizadas, los niveles de sus isoformas variaban en las diferentes líneas celulares. De manera general, la expresión de MAD2β fue mayor que la de MAD2γ, la expresión de esta última es baja en todas las líneas celulares analizadas, excepto en la línea OVCAR3 de cáncer de ovario. Lo anterior resulta interesante porque esta línea es resistente al cisplatino y al paclitaxel.

8. DISCUSIÓN

Resultados mostrados en este trabajo proponen la participación de MAD2 γ en el punto de monitoreo del huso mitótico. Resultados previos de nuestro grupo mostraron que la sobre-expresión exógena de MAD2 γ en la línea celular HCT116 tratada con paclitaxel resultaba en un SAC defectuoso (López-Saavedra *et al.*, 2016). Aquí, proponemos que esta alteración del SAC puede ser causada por una interacción entre MAD2 γ y la forma activa de MAD2 α (C-MAD2 α).

El hecho de que la sobre-expresión de MAD2 γ -FLAG disminuyera el índice mitótico sugirió un papel de esta isoforma en el SAC. La cascada de señalización del SAC se compone de una serie de interacciones proteína-proteína (Musacchio, 2015), por lo que pensamos que MAD2 γ pudiera participar en este nivel. Sin embargo, nuestro primer análisis mostró que tanto MAD2 γ como MAD2 β carecen de las regiones que determinan la interacción de MAD2 α con otras proteínas del SAC. Los que sugiere que ambas isoformas tienen un papel independiente al de MAD2 α .

De manera interesante, identificamos un motivo de interacción con MAD2 α (MIM) en el extremo C-terminal de ambas isoformas. Este motivo está presente tanto en MAD1, como en CDC20 (así como en otras proteínas que no son del SAC) y median la interacción con la forma activa de MAD2 α (C-MAD2 α) (Luo *et al.*, 2002; Sironi *et al.*, 2002). Mediante análisis de inmunofluorescencia observamos que MAD2 γ co-localiza con MAD2 α en la región centrómero-cinetocoro de cromosomas mitóticos. Debido a dificultades para visualizar a MAD2 γ -FLAG por un análisis de Western blot, por su bajo peso molecular, no se pudieron realizar ensayos de co-inmunoprecipitación. Sin embargo, se comprobó que MAD2 γ se encuentra muy próximo a MAD2 α mediante el ensayo de ligación por proximidad, lo que sugiere una interacción entre ambas proteínas.

La activación del SAC conduce al reclutamiento del complejo MAD1/C-MAD2 α a los cinetocoros que no están unidos a los microtúbulos del huso mitótico, donde cataliza la conversión de la forma latente de MAD2 α (O-MAD2 α) a su forma activa (C-MAD2 α). Esta conversión genera una señal difusible que inhibe al

APC/C y con ello una detención del ciclo en mitosis (Musacchio, 2015). Ya que MAD2 γ podría interaccionar con C-MAD2 α a través de su MIM, proponemos que la sobre-expresión de MAD2 γ puede saturar el pool existente de C-MAD2 α . Si C-MAD2 α no está disponible para unirse a CDC20, entonces CDC20 puede activar a APC/C y puede conducir a una salida prematura de mitosis. A pesar de que hacen falta pruebas bioquímicas que comprueben lo anterior, este modelo contribuye a explicar la disminución del índice mitótico en líneas celulares que sobre-expresan tanto MAD2 β (Yin *et al.*, 2006), como MAD2 γ (López-Saavedra *et al.*, 2016). Este modelo es consistente con un estudio que encontró que la sobre-expresión de MAD1, una proteína que contiene un MIM, reduce la cantidad de C-MAD2 disponible para inhibir el APC/C, lo que conduce a un SAC defectuoso y a errores en la segregación cromosómica (Ryan *et al.*, 2012). Sería interesante en un futuro determinar el efecto de la sobre-expresión de MAD2 γ en la generación de aneuploidías y en la inestabilidad cromosómica. Tomados en conjunto, proponemos que MAD2 γ , a través de su interacción con MAD2 α , pudiera actuar como un regulador negativo del SAC.

La localización de MAD2 γ en los cinetocoros se puede explicar por la interacción con MAD2 α . Adicionalmente, las isoformas de MAD2 α podrían localizarse en esta estructura debido a la presencia de un motivo R(L/M)K similar al de MAD1. Este motivo se ubica en el extremo C-terminal y se traslapa con el MIM en ambas isoformas. En MAD1, se ha demostrado que la mutación de este motivo (RLK \rightarrow AAA) disminuye su localización en los cinetocoros (Heinrich *et al.*, 2014), lo que indica su importancia en la localización de esta proteína y probablemente también de las isoformas de MAD2 en mitosis.

Alteraciones en el SAC conducen a la quimiorresistencia tanto a agentes que causan daño al DNA como a agentes que alteran la dinámica de los microtúbulos (revisados en la tabla 1). En este trabajo mostramos que la sobre expresión estable de MAD2 γ conduce a una menor sensibilidad a la colcemida y al paclitaxel en la línea celular HCT116. Los fármacos que alteran la dinámica de los microtúbulos generan una detención prolongada en mitosis, mecanismo que depende ampliamente de un SAC funcional y la activación de la apoptosis en células

cancerosas. Pensamos que en el contexto de la sobre-expresión de MAD2 γ se genera un SAC defectuoso, debido a la interacción con MAD2 α , lo que conlleva a una salida prematura de mitosis antes de que las células pongan en marcha la apoptosis. Esto podría explicar por qué las células que sobre-expresan MAD2 γ son menos sensibles a paclitaxel y a colcemida. En este sentido, se ha observado que cuando se sobre-expresa MAD1, éste genera errores en el SAC y resistencia a paclitaxel debido a la interacción con C-MAD2 α (Ryan *et al.*, 2012). En otro estudio se observó que cuando se sobre expresa SNCG, la cual interacciona directamente con BUBR1 en células de cáncer de mama. La generación de esta interacción reduce la capacidad de BUBR1 de interactuar con CDC20, lo que da lugar a un SAC defectuoso y a la generación de resistencia a docetaxel, análogo del paclitaxel (Miao *et al.*, 2014). En conjunto, las alteraciones en la vía SAC debidas a la disrupción de las interacciones entre MAD2 α y otros componentes del SAC conducen a la resistencia a fármacos que alteran la dinámica de los microtúbulos.

Por otro lado, inhibir la formación de C-MAD2 α una vez que todos los cromosomas alcanzaron una bi-orientación es una estrategia que utiliza la célula para finalizar la señalización del SAC. Cuando todos los cinetocoros están unidos a microtúbulos, la proteína p31^{comet} se une a C-MAD2 e impide que genere más C-MAD2 α (Yang *et al.*, 2007). Además, junto con la AAA+ATPasa TRIP13 promueve el desensamble del complejo del punto de monitoreo de mitosis (Ye *et al.*, 2015). Sin más forma activa, la señal del SAC se disipa y el ciclo celular puede avanzar hacia la anafase (Yang *et al.*, 2007). De manera interesante, debido a que MAD2 β y MAD2 γ se expresan de manera ubicua en diferentes líneas celulares de cáncer, así como, en fibroblastos normales, estas proteínas podrían actuar de una manera similar a p31^{comet}. Por tanto, en un contexto fisiológico es posible que MAD2 β y MAD2 γ regulen el silenciamiento del SAC.

9. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo proponen a MAD2 γ como un regulador negativo del SAC a través de la interacción con MAD2 α . Además, la sobre-expresión de esta isoforma en la línea celular HCT116 está asociadas a una menor sensibilidad a agentes que alteran la dinámica de microtúbulos. Nuestros resultados remarcan la importancia de la identificación de variantes generadas por empalme alternativo de exones que contribuyan a la regulación del SAC y a la respuesta a quimioterapéuticos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Avram, S., Mernea, M., Mihailescu, D. F., Seiman, C. D., Seiman, D. D., & Putz, M. V. (2014). Mitotic checkpoint proteins Mad1 and Mad2 - structural and functional relationship with implication in genetic diseases. *Current Computer-Aided Drug Design*, *10*(2), 168–81.
- Bargiela-Iparraguirre, J., Prado-Marchal, L., Pajuelo-Lozano, N., Jiménez, B., Perona, R., & Sánchez-Pérez, I. (2014). Mad2 and BubR1 modulates tumorigenesis and paclitaxel response in MKN45 gastric cancer cells. *Cell Cycle*, *13*(22), 3590–601. <http://doi.org/10.4161/15384101.2014.962952>
- Cheung, H. W., Jin, D. Y., Ling, M. T., Yong, C. W., Wang, Q., Sai, W. T., & Wang, X. (2005). Mitotic arrest deficient 2 expression induces chemosensitization to a DNA-damaging agent, cisplatin, in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Research*, *65*(4), 1450–1458. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0567>
- Choi, E., Zhang, X., Xing, C., & Yu, H. (2016). Mitotic Checkpoint Regulators Control Insulin Article Mitotic Checkpoint Regulators Control Insulin Signaling and Metabolic Homeostasis. *Cell*, *166*(3), 567–581. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.074>
- Foley, E. a, & Kapoor, T. M. (2013). Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *14*(1), 25–37. <http://doi.org/10.1038/nrm3494>
- Foley, E. a, Kapoor, T. M., Schuyler, S. C., Wu, Y.-F., Kuan, V. J.-W., Hauf, S., ... Burke, D. J. (2014). Joined at the hip: kinetochores, microtubules, and spindle assembly checkpoint signaling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *5*(1), 773–785. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.006>
- Fung, M. K. L., Cheung, H.-W., Ling, M.-T., Cheung, A. L. M., Wong, Y.-C., & Wang, X. (2006). Role of MEK/ERK pathway in the MAD2-mediated cisplatin sensitivity in testicular germ cell tumour cells. *British Journal of Cancer*, *95*(4), 475–84. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603284>
- Habu, T., & Kim, S. H. (2002). Identification of a MAD2-binding protein, CMT2, and

- its role in mitosis. *The EMBO Journal*, 21(23), 6419–6428.
- Hara, M., Özkan, E., Sun, H., Yu, H., & Luo, X. (2015). Structure of an intermediate conformer of the spindle checkpoint protein Mad2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11252–11257.
<http://doi.org/10.1073/pnas.1512197112>
- Heinrich, S., Sewart, K., Windecker, H., Langegger, M., Schmidt, N., Hustedt, N., & Hauf, S. (2014). Mad1 contribution to spindle assembly checkpoint signalling goes beyond presenting Mad2 at kinetochores. *EMBO Reports*, 15(3), 291–298. <http://doi.org/10.1002/embr.201338114>
- Izawa, D., & Pines, J. (2012). Mad2 and the APC/C compete for the same site on Cdc20 to ensure proper chromosome segregation. *The Journal of Cell Biology*, 199(1), 27–37. <http://doi.org/10.1083/jcb.201205170>
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F., & Taylor, S. (2012). The Spindle Assembly Checkpoint. *Current Biology : CB*, 22(22), R966–R980.
<http://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.006>
- Lee, S. H., McCormick, F., & Saya, H. (2010). Mad2 inhibits the mitotic kinesin MKlp2. *Journal of Cell Biology*, 191(6), 1069–1077.
<http://doi.org/10.1083/jcb.201003095>
- Li, C., Zhu, Y., Wang, Y., & Chen, G. (2014). Molecular Dynamics Simulation on the Conformational Transition of the Mad2 Protein from the Open to the Closed State. *International Journal of Molecular Sciences*, 5553–5569.
<http://doi.org/10.3390/ijms15045553>
- Lischetti, T., & Nilsson, J. (2015). Regulation of mitotic progression by the spindle assembly checkpoint. *Molecular & Cellular Oncology*, 2(1), e970484-1-e970484-11. <http://doi.org/10.4161/23723548.2014.970484>
- London, N., & Biggins, S. (2014). Signalling dynamics in the spindle checkpoint response. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(11), 736–47.
<http://doi.org/10.1038/nrm3888>
- López-Saavedra, A., Ramírez-otero, M., Díaz-chávez, J., Justo-garrido, M.,

- Andonegui, M. A., Downie-ruíz, Á., ... Herrera, L. A. (2016). MAD2 γ , a novel MAD2 isoform, reduces mitotic arrest and is associated with resistance in testicular germ cell tumours. *Cell Cycle*, 15(15), 2066–2077.
<http://doi.org/10.1080/15384101.2016.1198863>
- Luo, X., Fang, G., Coldiron, M., Lin, Y., Yu, H., Kirschner, M. W., & Wagner, G. (2000). Structure of the Mad2 spindle assembly check- point protein and its interaction with Cdc20. *Nature Structural Biology*, 7(3), 224–229.
<http://doi.org/doi:10.1038/73338>
- Luo, X., Tang, Z., Rizo, J., & Yu, H. (2002). The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20. *Molecular Cell*, 9(1), 59–71. [http://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00435-X](http://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00435-X)
- Luo, X., Tang, Z., Xia, G., Wassmann, K., Matsumoto, T., Rizo, J., & Yu, H. (2004). The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(4), 338–345.
<http://doi.org/10.1038/nsmb748>
- Mapelli, M., Massimiliano, L., Santaguida, S., & Musacchio, A. (2007). The Mad2 Conformational Dimer: Structure and Implications for the Spindle Assembly Checkpoint. *Cell*, 131(4), 730–743. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.049>
- McGrogan, B. T., Gilmarin, B., Carney, D. N., & Mccann, A. (2008). Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1785, 96–132. <http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.10.004>
- Miao, S., Wu, K., Zhang, B., Weng, Z., Zhu, M., Lu, Y., ... Shi, Y. E. (2014). Synuclein γ compromises spindle assembly checkpoint and renders resistance to antimicrotubule drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(3), 699–713.
<http://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0671>
- Musacchio, A. (2015). Review The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Current Biology*, 25(20), 1002–1018.
- Orth, M., Mayer, B., Rehm, K., Rothweiler, U., Heidmann, D., Holak, T. a, &

- Stemmann, O. (2011). Shugoshin is a Mad1/Cdc20-like interactor of Mad2. *The EMBO Journal*, 30(14), 2868–2880.
<http://doi.org/10.1038/emboj.2011.187>
- Prencipe, M., Fitzpatrick, P., Gorman, S., Tosetto, M., Masetto, M., Klinger, R., ... McCann, A. (2009). Cellular senescence induced by aberrant MAD2 levels impacts on paclitaxel responsiveness in vitro. *British Journal of Cancer*, 101(11), 1900–8. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605419>
- Ryan, S. D., Britigan, E. M. C., Zasadil, L. M., Witte, K., Audhya, a., Roopra, a., & Weaver, B. a. (2012). PNAS Plus: Up-regulation of the mitotic checkpoint component Mad1 causes chromosomal instability and resistance to microtubule poisons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(33), E2205–E2214. <http://doi.org/10.1073/pnas.1201911109>
- Sacristan, C., & Kops, G. J. P. L. (2015). Joined at the hip: kinetochores, microtubules, and spindle assembly checkpoint signaling. *Trends in Cell Biology*, 25(1), 21–28. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.08.006>
- Sironi, L., Mapelli, M., & Knapp, S. (2002). Crystal structure of the tetrameric Mad1–Mad2 core complex: implications of a “safety belt” binding mechanism for the spindle checkpoint. *The EMBO Journal*, 21(10), 2496–506.
<http://doi.org/10.1093/emboj/21.10.2496>
- Skinner, J. J., Wood, S., Shorter, J., Englander, S. W., & Black, B. E. (2008). The Mad2 partial unfolding model: regulating mitosis through Mad2 conformational switching. *The Journal of Cell Biology*, 183(5), 761–8.
<http://doi.org/10.1083/jcb.200808122>
- Sotillo, R., Hernando, E., Díaz-Rodríguez, E., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., & Benezra, R. (2007). Mad2 Overexpression Promotes Aneuploidy and Tumorigenesis in Mice. *Cancer Cell*, 11(1), 9–23.
<http://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.019>
- Stukenberg, P. T., & Burke, D. J. (2015). Connecting the microtubule attachment status of each kinetochore to cell cycle arrest through the spindle assembly

checkpoint. *Chromosoma*, 124(4), 463–480. <http://doi.org/10.1007/s00412-015-0515-z>

Sudo, T., Nitta, M., Saya, H., & Ueno, N. T. (2004). Dependence of Paclitaxel Sensitivity on a Functional Spindle Assembly Checkpoint. *Cancer Research*, 64(7), 2502–2508.

Tambe, M., Pruikkonen, S., Mäki-jouppila, J., & Chen, P. (2016). Novel Mad2-targeting miR-493-3p controls mitotic fidelity and cancer cells' sensitivity to paclitaxel. *Oncotarget*, 7(11), 12267–12285.

Tanaka, K., Mohri, Y., Ohi, M., Yokoe, T., Koike, Y., Morimoto, Y., ... Kusunoki, M. (2008). Mitotic Checkpoint Genes, hsMAD2 and BubR1, in Oesophageal Squamous Cancer Cells and their Association with 5-fluorouracil and Cisplatin-based Radiochemotherapy. *Clinical Oncology*, 20(8), 639–646. <http://doi.org/10.1016/j.clon.2008.06.010>

Tao, W., Wang, P., Wang, Y., Yan, H., Xie, Q., Zhao, L., ... Tao, W. (2014). Upregulation of Mad2 facilitates in vivo and in vitro osteosarcoma progression. *Oncogene*, 11(3), 81–87. <http://doi.org/10.4161/cc.4.11.2130>

Theng, S. S., Wang, W., Mah, W.-C., Chan, C., Zhuo, J., Gao, Y., ... Lee, C. G. (2014). Disruption of FAT10-MAD2 binding inhibits tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(49), E5282-91. <http://doi.org/10.1073/pnas.1403383111>

Tipton, A. R., Wang, K., Link, L., Bellizzi, J. J., Huang, H., Yen, T., & Liu, S.-T. (2011). BUBR1 and Closed MAD2 (C-MAD2) Interact Directly to Assemble a Functional Mitotic Checkpoint Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21173–21179. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.238543>

Wang, Y., Jin, F., Higgins, R., & McKnight, K. (2014). The current view for the silencing of the spindle assembly checkpoint. *Cell Cycle*, 13(11), 1694–1701. <http://doi.org/10.4161/cc.29027>

Yan, X. D., Li, M., Yuan, Y., Mao, N., & Pan, L. Y. (2007). Biological comparison of ovarian cancer resistant cell lines to cisplatin and Taxol by two different

administrations. *Oncology Reports*, 17(5), 1163–1169.

- Yang, M., Li, B., Liu, C.-J., Tomchick, D. R., Machius, M., Rizo, J., ... Luo, X. (2008). Insights into mad2 regulation in the spindle checkpoint revealed by the crystal structure of the symmetric mad2 dimer. *PLoS Biology*, 6(3), e50. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060050>
- Yang, M., Li, B., Tomchick, D. R., Machius, M., Rizo, J., Yu, H., & Luo, X. (2007). p31comet blocks Mad2 activation through structural mimicry. *Cell*, 131(4), 744–55. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.048>
- Ye, Q., Rosenberg, S. C., Moeller, A., Speir, J. A., Su, T. Y., & Corbett, K. D. (2015). TRIP13 is a protein-remodeling AAA+ ATPase that catalyzes MAD2 conformation switching. *eLife*, 4, 1–25. <http://doi.org/10.7554/eLife.07367>
- Yin, F., Du, Y., Hu, W., Qiao, T., Ding, J., Wu, K., ... Fan, D. (2006). Mad2 β , an alternative variant of Mad2 reducing mitotic arrest and apoptosis induced by adriamycin in gastric cancer cells. *Life Sciences*, 78(12), 1277–1286. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.06.034>

11. ANEXOS

11.1. Métodos en extenso

11.1.1. Líneas celulares

Se determinó la expresión de MAD2 α y sus isoforma en las líneas celulares descritas en la siguiente tabla.

Línea Celular	Origen	Catalogo ATCC	Medio	Suplemento
SW48	Adenocarcinoma colorrectal	CCL-231	DMEM	SFB 10 %
SW480	Adenocarcinoma colorrectal	CCL-228	DMEM	SFB 10 %
SiHa	Carcinoma de células escamosas, cérvix	HTB-35	DMEM	SFB 10 %
C-33 A	Carcinoma epitelial de cérvix	HTB-31	DMEM	SFB 10 %
MCF7	Adenocarcinoma mamario	HTB-22	DMEM	SFB 10 %
HT29	Adenocarcinoma colorrectal	HTB-38	McCoy's 5a	SFB 10 %
U373	glioblastoma	-	DMEM	SFB 10 %
OVCAR3	adenocarcinoma de ovario	HTB-161	RPMI 1640	SFB 20 % 0.1 u de insulina

11.1.2. Determinación de la expresión de MAD2 sus isoformas

Los oligos utilizados, así como las condiciones de PCR para la amplificación de MAD2 α y sus isoformas se describen en las siguientes tablas.

Secuencia de *oligos*

Gen	oligos	Exón	Secuencia (5' a 3')	Producto esperado (pb)
MAD2	Forward	E3	CCT GGA AAG ATG GCA GTT TGA	63
	Reverse	E3	TGG GTG CAC TGT CAT CTT TTG	
MAD2β	Forward	E2/E4	CAA CTG AAA GTG CAC CCA GAG	177
	Reverse	E5	ACT CTT CCC ATT TTT CAG GTA CAA C	
MAD2γ	Forward	E1	GGG AGC AGG GAA TCA CC	65
	Reverse	E1/E4	CTC TGG GTG CAA GAA GAA CTC	
β-actina	Forward	N/A	TCA CCA ACT GGG ACG ACA TG	220
	Reverse	N/A	GTA CAG GGA TAG CAC AGC CT	

Componentes de reacción de PCR

	MAD2 α	MAD2 β	MAD2 γ	β -ACTINA
Buffer 10X	2.5	2.5	2.5	2.5
MgCl₂ 50 mM	1 (2 mM)	1 (2 mM)	1.3 (2.5 mM)	1 (2 mM)
dNTPs 10 mM	0.5 (200 μ M)	0.5 (200 μ M)	0.5 (200 μ M)	0.5 (200 μ M)
Oligo For	1 (0.2 μ M)	1 (0.2 μ M)	1 (0.2 μ M)	1 (0.2 μ M)
Oligo Rev	1 (0.2 μ M)	1 (0.2 μ M)	1 (0.2 μ M)	1 (0.2 μ M)
Taq (5 U/μl)	0.2	0.2	0.2	0.2
H₂O	17.8	17.8	17.5	17.8
cDNA	1	1	1	1

Condiciones de PCR

MAD2 α					
94 °C 2'	94° C 30"	60 ° C 30"	72 °C 30"	72 °C 5'	4 °C ∞
25 ciclos					
MAD2 β					
94 °C 2'	94° C 30"	62 ° C 30"	72 °C 30"	72 °C 5'	4 °C ∞
25 ciclos					
MAD2 γ					
94 °C 2'	94° C 30"	62 ° C 30"	72 °C 30"	72 °C 5'	4 °C ∞
30 ciclos					
β -ACTINA					
94 °C 2'	94° C 30"	60 ° C 30"	72 °C 30"	72 °C 5'	4 °C ∞
20 ciclos					

11.1.3. Preparación de bacterias competentes con cloruro de rubidio

1. Sembrar una asada de la cepa de *E. coli* dh5 α en 5 mL de medio SOB complementado con 10 nM de MgSO₄ y crecer a 37 °C toda la noche
2. Inocular 500 μ L del cultivo anterior en 50 mL de medio SOB complementado.
3. Crecer a D. O. de 600 nm, esta densidad se alcanza aproximadamente a las tres horas.
4. Transferir el cultivo a tubos falcon estériles y pre enfriados. Dejar 10 minutos en hielo y centrifugar a 2500 rpm a 4 ° C durante 12 minutos.
5. Decantar el sobrenadante con cuidado y re suspender el pellet en 16 mL de TB1.
6. Incubar en hielo por 15 minutos. Centrifugar 1 minuto a 2500 rpm a 4 ° C.
7. eliminar el sobrenadante y re suspender en 4 mL de TBII.
8. Incubar 15 minutos en hielo y distribuir en alícuotas de 200 μ L en tubos de 0.6 mL estériles.
9. Congelar directamente en nitrógeno líquido y almacenar a -80° C

11.1.4. Soluciones para la preparación de bacterias competentes

TBI

Acetato de potasio	30 nM
RbCl ₂	100 nM
CaCl ₂	10 nM
MnCl ₂	50 nM
glicerol	15 %

Ajustar pH a 5.8 con 0.2 M de ácido acético, esterilizar por filtración

TBI

MOPS o PIPES	10 nM
CaCl ₂	75 nM
RbCl ₂	10 nM
glicerol	15 %

Ajustar pH a 5.0 con KOH, esterilizar por filtración

SOB

Bactotripton	20 g/ L
Extracto de levadura	5 g/ L
NaCl	0.5 g/ L

Ajustar pH a 7.5

esterilizar con autoclave

11.1.5. Transformación de bacterias por choque térmico

1. Antes de comenzar atemperar medio y cajas con LB agar.
2. Se transforma una alícuota de 50 µL de bacterias competentes.
3. Las bacterias deben de permanecer en hielo, se mezclan con 10-50 µg de plásmido, se agita suavemente con el dedo.
4. Se incuba en hielo por 30 minutos, agitar cada 10 minutos.
5. Las bacterias se colocan 45 s a 42° C y después se transfieren a hielo por 2 min.
6. Adicionar 800 µL de medio LB y agitar suavemente.
7. Las bacterias se dejan en agitación a 100 rpm a 37° C en tubos de 2 mL acostados.
8. Centrifugar a 1200 rpm por 3 minutos, retirar el sobrenadante y re suspender en el medio residual.
9. Plaquear ~100 µL en cajas con LB agar y antibiótico.

Medio LB

Triptona	10 g / L
Extracto de levadura	5 g / L
NaCl	10 g / L

Agar LB

Triptona	10 g / L
Extracto de levadura	5 g / L
NaCl	10 g / L
Agar	15 g / L

11.2. Producción científica

- López-Saavedra, A., Ramírez-Otero, M., Díaz-Chávez, J., Justo-Garrido, M., Andonegui, M. A., Downie-ruíz, Á., ... Herrera, L. A. (2016). **MAD2 γ , a novel MAD2 isoform, reduces mitotic arrest and is associated with resistance in testicular germ cell tumors.** Cell Cycle, 15(15), 2066–2077. (IF: 3.95)
- Miguel Ramírez-Otero, Alejandro López-Saavedra, Marco Andonegui, José Diaz-Chavez, Luis Alonso Herrera. **In silico identification of a MAD2-interacting motif in MAD2 spliced isoforms suggest a functional interaction with the spindle assemble checkpoint in cancer.** [abstract]. In: Proceedings of the 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2016 Apr 16-20; New Orleans, LA. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2016;76(14 Suppl): Abstract nr 2728.
- Ramírez-Otero Miguel Angel, López-Saavedra Alejandro, Herrera Montalvo Luis A. **MAD2 γ in the mitotic checkpoint and its association with taxol resistance in the colorectal cancer cell line HCT116.** XXI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica; 2016 nov 6-11; Aguascalientes, Ags, México.

- Diddier Prada, Omar Peña Curiel, José Díaz Chávez, Cynthia Villarreal Garza, Nancy Reynoso, Paula Cabrera Galeana, Enrique Bargalló Rocha, Yolanda Villaseñor Navarro, Claudia Caro Sánchez, Luis A Herrera, Ramírez-Otero Miguel and Justo Montserrat. **Association between levels of 5-hydroxymethylcytosine and clinical/histopathologic features in locally advanced breast cancer: Results from the biomarkers breast cancer cohort of Mexican women (2012-2015)**. 15th World Congress on Cancer Therapy, Biomarkers & Clinical Research December 05-07, 2016 Philadelphia, USA. Oncol Cancer Case Rep 2016,2:3 (Suppl).
- Omar Peña-Curiel, Diddiera Prada, Miguel Ramírez-Otero, José Díaz-Chávez, Cynthia Villarreal-Garza, Montserrat Justo, Nancy Reynoso, Clementina Castro Hernandez, Paula Cabrera-Galeana, Enrique Bargallo-Rocha, Yolanda Villaseñor-Navarro, Claudia Caro-Sánchez, Jaime G. De La Garza, Luis Alonso Herrera Montalvo. **5-hydroxymethylcytosine levels are differentially associated with clinical and histopathological characteristics in breast cancer tumors**. ASCO Annual Meeting (June 2-6, 2017, enviado).