



UNIVERSIDAD
DE JAÉN

*Facultad de Ciencias
Experimentales*

Bases Moleculares de la División Mitótica:

Respuesta a la Inhibición de Topoisomerasa II

José Antonio Armenteros Ocaña

Junio de 2023

ÍNDICE

Resumen:	2
Abstract:	2
Introducción:	3
1.- Actividad Biológica de Topoisomerasa II:	3
2.- Topoisomerasa II alfa y actividad del Decatenation Checkpoint:	5
3.- El gen MCPH1 y su papel en la actividad del Decatenation Checkpoint:.....	7
Objetivos:	9
Materiales y Métodos:	10
1.- Materiales:	10
2.- Metodologías:.....	10
2.1.- Técnicas Basadas en el Mantenimiento de Cultivos Celulares:	10
2.2.- Análisis de la dinámica del ciclo celular en respuesta a la incubación con inhibidores proteicos:	11
2.3.- Ensayos de Citometría de Flujo:	12
2.4.- Cuantificación de Datos con "Flowing Software":	13
Resultados:	16
Discusión:	33
Conclusiones:	35
Bibliografía:	36

Resumen:

Estudios previos han demostrado que el gen MCPH1, conocido por su papel en el desarrollo de microcefalia primaria, regula la respuesta del ciclo celular que se desencadena tras la inhibición de la actividad de Topoisomerasa II. En el presente trabajo hemos realizado un análisis detallado de cómo la progresión del ciclo celular está alterada en un nuevo modelo celular de falta de función para este gen, en respuesta a tratamientos con diferentes inhibidores de Topoisomerasa II. Los resultados obtenidos confirman estudios previos, y sugieren que este modelo celular (RPE-1) puede ser de gran utilidad en futuros análisis sobre el papel de Topoisomerasa II en la división cromosómica.

Palabras Clave: Inhibición Catalítica, Topoisomerasa II, MCPH1, RPE-1, Ciclo Celular, Inhibidores, Citometría de Flujo.

Abstract:

Previous studies have shown that the MCPH1 gene, known for its role in the development of primary microcephaly, regulates the cell cycle response that is triggered after the inhibition of Topoisomerase II activity. In the present work we have carried out a detailed analysis of how cell cycle progression is altered in a new cellular model of lack of function for this gene, in response to treatments with different Topoisomerase II inhibitors. The results confirm previous studies, and suggest that this cell model (RPE-1) may be very useful in future analyzes of the role of Topoisomerase II in chromosome division.

Keywords: Topoisomerase II, MCPH1, RPE-1, Cell Cycle, Inhibitors, Flow Cytometry.

Introducción:

1.- Actividad biológica de Topoisomerasa II

El estado fisiológico y metabólico, así como la funcionalidad de una célula varía según el ciclo celular. Dentro de éste la célula pasa por cuatro fases principales (existiendo una quinta fase llamada G₀ que, aunque está relacionada, es independiente), las cuales son: fase G₁ (Gap₁) en la que suelen estar la mayoría de las células (siendo la fase más larga y en la que la célula busca principalmente crecer), fase S (Synthesis), en la que el ADN se replica, fase G₂ (Gap₂), en la que se prepara para la posterior división, y fase M (Mitosis), llamada así porque ocurre la división celular (**Imagen 1**) (*Israels & Israels, 2000*). No solo dependiendo de en qué fase del ciclo celular se encuentre la célula se producen diferencias en su estado fisiológico o metabólico. Además, otro aspecto muy importante es que para avanzar entre fases las células tienen que superar los diferentes puntos de control (“checkpoints”) del ciclo celular (**Imagen 1**) (*Israels & Israels, 2000*). Estos puntos de control están compuestos por vías de señalización y reparación que evitan el avance por el ciclo celular si existen defectos principalmente en la molécula de ADN. En este trabajo nos enfocamos en aquellos relacionados con la actividad de las Topoisomerasas.

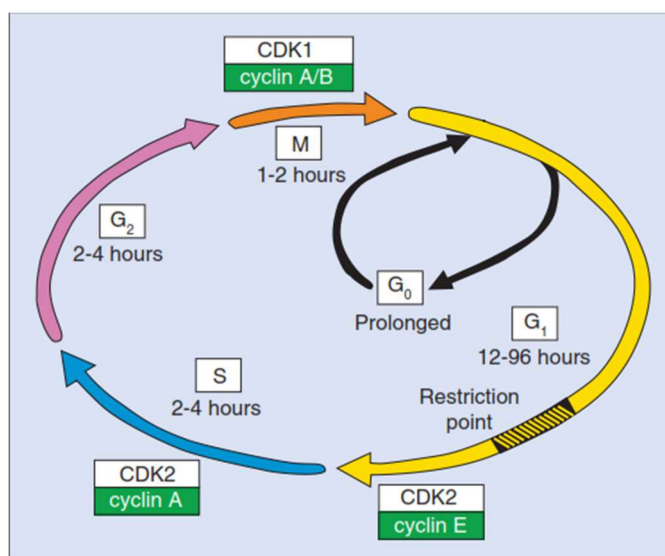


Imagen 1: Diferentes fases del Ciclo Celular, con un tiempo relativo de su duración y los diferentes Controles del Ciclo. (*Israels & Israels, 2000*).

Una célula suele realizar muchos procesos diferentes a lo largo de su vida, siendo en la mayoría de ellos participe el ADN, como es en los procesos de transcripción y replicación; el ADN, al ser de cadena doble, necesita desenrollarse con frecuencia, pero esto tiene un problema y es que se genera un flujo descendente a partir del punto donde se desenrolla, provocando un superenrollamiento sobre el propio ADN en los puntos posteriores a este. Este problema topológico puede ser resuelto gracias a la actividad de las Topoisomerasas, gracias a que originan rupturas transitorias en el ADN, las cuales ayudan a disminuir este superenrollamiento (*Bollimpelli et al., 2017*). Existen dos tipos de Topoisomerasas: las Tipo I, son monómeros de 100 kDa que inducen rupturas de una sola hebra de ADN (SSBs, “single strand breaks”) a través de una

reacción que implica transesterificación y que no depende de ATP. Las Tipo II son dímeros que tienen dos centros activos y que inducen rupturas de ambas hebras de ADN (DSBs, “double strand breaks”), siendo esta vez totalmente dependientes de ATP. Topoisomerasa II están codificadas por un gen parálogo Alfa, que expresa una proteína con un peso molecular de 170kDA, y otro parálogo Beta que determina una proteína con un peso de 180kDA. En humanos estos parálogos se encuentran en los cromosomas 17q21 y 3p24 (Hande, 2008).

Centrándonos en las Topoisomerasas de tipo 2 o Topoisomerasas II, podemos decir que estos dímeros cumplen varios roles importantes en la vida de la célula, concretamente en lo que conlleva su proceso de división. Por mencionar algunas de sus funciones, podemos encontrar la acción de esta enzima durante el proceso de condensación cromosómica, siendo fundamental para eliminar las concatenaciones que se establecen entre las cromátidas hermanas y no hermanas de cara a la posterior segregación cromosómica (Berger et al., 1996).

Existen dos parálogos de Topoisomerasa II, los cuales poseen cualidades diferentes y dependiendo del que hablemos lo encontraremos haciendo una tarea u otra; los dos parálogos que hay son Topoisomerasa II- α y Topoisomerasa II- β (Imagen 2), los cuales proceden de genes distintos (Jenkins et al., 1992). La principal diferencia entre ambas es la estructura de la proteína, siendo el extremo C-terminal el que muestra un mayor grado de diferenciación. En relación con su expresión, la variante alfa se encuentra en células en proliferación mientras que la variante beta la encontramos en todas las células, independientemente de su estadio del ciclo celular, pero hay una mayor expresión de estas en células que han alcanzado el estado postmitótico (Tiwari et al., 2012; Watanabe et al., 1994). Así, TopoII- β actúa en procesos como la transcripción, reparación del ADN, desarrollo neuronal, envejecimiento, infección de VIH o cáncer. En este trabajo, en cambio, nos centraremos en la función de TopoII- α para la actividad de un punto de control del ciclo celular activo durante G2 denominado “Decatenation Checkpoint” (Bollimpelli et al., 2017).

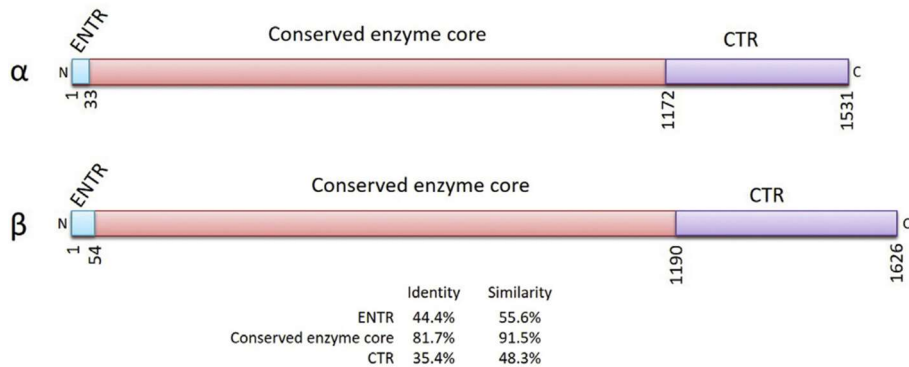


Imagen 2: Comparación de ambos parálogos; se puede observar gran similitud en la región central de ambas proteínas (Bollimpelli et al., 2017).

2.- Topoisomerasa II alfa y actividad del Decatenation Checkpoint

Como consecuencia de la replicación del ADN, surgen concatenaciones no replicativas durante la interfase (Giménez-Abián *et al.*, 2000); debido a estas concatenaciones persisten cromosomas entrelazados durante mitosis, ocurriendo una pérdida o ganancia de cromosomas (**Imagen 3A**), tanto fragmentos de ellos como cromosomas completos. Estas pérdidas o ganancias son fuente de inestabilidad genómica, pues la rotura cromosómica y la falta de disyunción en la anafase provocan translocaciones cromosómicas y otras aberraciones, lo que podría favorecer el desarrollo de procesos tumorales (**Imagen 3C**). Para proteger a la célula frente a esta problemática se activa el denominado “Decatenation Checkpoint” durante la fase G2 del ciclo celular. Su activación detiene de modo temporal a la célula en fase G2, evitando que entre en mitosis hasta que no termine de eliminar la mayor parte concatenaciones que entrelazan cromátidas hermanas y no hermanas a lo largo de los cromosomas (Downes *et al.*, 1994; Damelin & Bestor, 2007). La demostración de la existencia de este punto de control en células de mamífero se basó en el uso de inhibidores catalíticos de la actividad de TopoII, como ICRF-193 y otros derivados, los cuales inducían una parada temporal en G2 en ausencia de roturas de cadena doble en el ADN. Estos últimos activan otra vía de señalización diferente, mucho más estudiada, que es la que responde al daño por roturas en el ADN (DSBs) y que depende de la quinasa ATM (Downes *et al.*, 1994; Roca *et al.*, 1994; Damelin & Bestor, 2007).

La vía de señalización del “Decatenation Checkpoint” depende de diferentes moléculas (**Imagen 3B**), una de ellas es la quinasa ATR, pues se encarga de mediar el retraso de la fase G2 mediante la inhibición de Plk1 (Polo-like kinase 1) (Deming *et al.*, 2001; Downes *et al.*, 1994). Así se ha demostrado que la sobreexpresión de Plk1 se encarga de atenuar la respuesta del control (Deming *et al.*, 2001). Plk1 puede fosforilar la ciclina B1 con el fin de provocar la localización nuclear de los complejos B1/Cdk1 y de tal forma promover la mitosis (Deming *et al.*, 2002). Otras moléculas necesarias para la activación de este punto de control son BRCA1 y WRN, siendo esta última necesaria para la fosforilación de BRCA1 en respuesta a las cromátidas concatenadas (Damelin & Bestor, 2007; Deming *et al.*, 2001; Franchitto *et al.*, 2003).

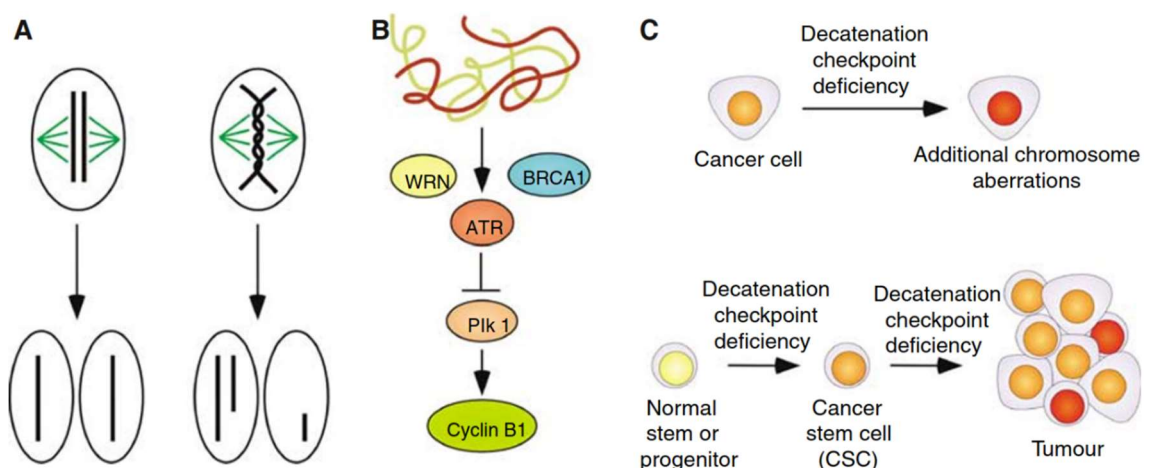


Imagen 3: **A)** Mitosis en presencia de cromosomas enredados; **B)** Modelo funcional de la señal del “Decatenation Checkpoint”; **C)** Ejemplo de deficiencia en el “Decatenation Checkpoint” 10 (Damelin & Bestor, 2007).

La actividad catalítica de Topoisomerasa II- α ocurre a través de un conjunto de reacciones consecutivas, que se conoce como ciclo catalítico de la Topoisomerasa 2 o SPR ("Strand Passage Reaction") (**Imagen 4**) (Burden & Osheroff, 1998; Berger, 1998b; Berger, 1998a; Fortune & Osheroff, 2000; Wilstermann & Osheroff, 2003). El ciclo ocurre cuando: **1)** la enzima Topoisomerasa II- α se une a dos segmentos de ADN para iniciar dicha ronda de catálisis (Zechiedrich & Osheroff, 1990; Roca et al., 1993). **2)** En presencia de un catión divalente, ambas subunidades de la enzima dividen una de las dos hebras de la doble hélice (Osheroff, 1987; Liu et al., 1983; Sander & Tt, 1983; Zechiedrich et al., 1989); los dos enlaces cortados se encontrarán separados por cuatro pares de bases, de modo que dicha escisión genera moléculas de ADN monocatenarias de 4 bases con extremos cohesivos en sus terminales 5', siendo una reacción reversible (Liu et al., 1983; Sander & Tt, 1983). **3)** La Topoisomerasa II se une a dos moléculas de ATP, sufriendo un cambio conformacional que provoca el paso del segmento aún intacto del ADN a través de la doble hélice escindida previamente, pudiendo parecer más rápido si una de ambas moléculas de ATP se encuentra hidrolizada (Osheroff et al., 1983; Lindsley & Wang, 1991; Baird et al., 1999); posteriormente el ADN transportado pasa a una cavidad central en la misma Topoisomerasa II a través de un puente N-terminal, el cual se cierra de forma que la enzima forme una especie de abrazadera de proteína en el ADN (Osheroff, 1986; Roca & Wang, 1992). **4)** La Topoisomerasa II cierra el ácido nucleico inicial roto, estableciendo una vez más un llamado equilibrio de Escisión-Religación (Osheroff, 1986). **5)** La Topoisomerasa II hidroliza una segunda molécula de ATP, la cual abre la puerta C-terminal de la proteína y permite que se transporte el segmento de ADN para ser liberado (Osheroff et al., 1983; Osheroff, 1986; Roca & Wang, 1992). **6)** Para concluir, la enzima vuelve a su conformación inicial, obteniendo así de vuelta la capacidad de iniciar un nuevo ciclo de catálisis (Osheroff et al., 1983; Osheroff, 1986; Baldwin & Osheroff, 2005).

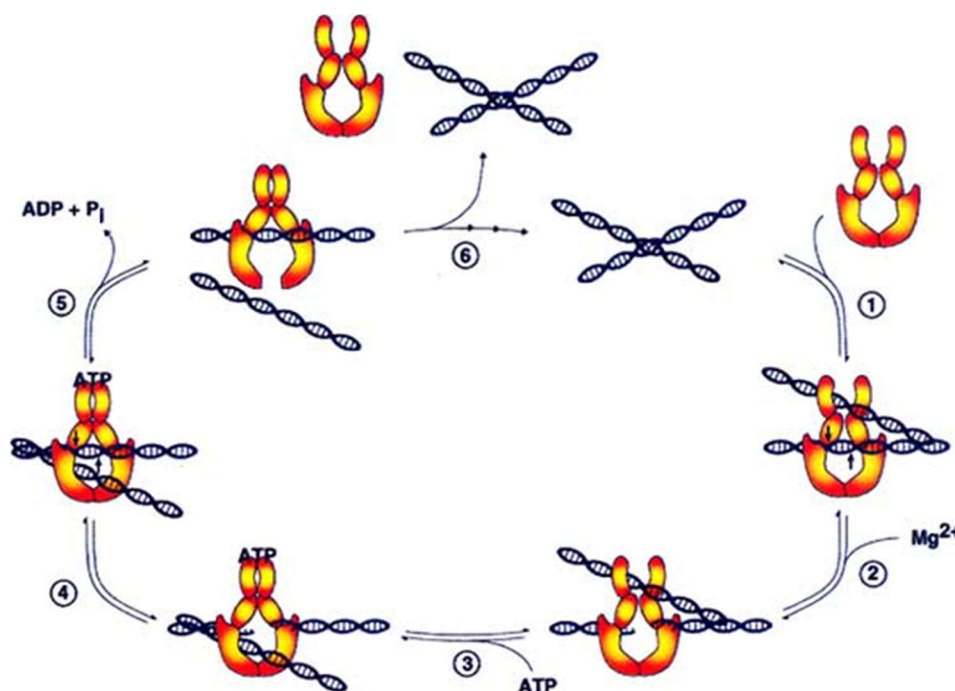


Imagen 4: Ciclo catalítico de la Topoisomerasa II, siendo una ronda completa aquella formada por seis pasos diferentes (Baldwin & Osheroff, 2005).

Con el fin del estudio del mecanismo de acción de las Topoisomerasas y su función en el ciclo celular, se han ido buscando y desarrollando diferentes inhibidores de su actividad. Dependiendo de lo que se buscara estudiar, estos inhibidores podían llegar a provocar fallos o detenciones en diferentes momentos del ciclo catalítico comentado anteriormente. Algunos de estos inhibidores a día de hoy se conocen que tienen propiedades y usos favorables contra enfermedades como el cáncer, siendo por ello un mayor motivo de interés y estudio. La FDA (Food and Drug Administration) aprobó como inhibidores para la Topoisomerasa II el Etopósido, y Tenipósido, la Doxorrubicina, la Idarrubicina, la Epirubicina y la Mitoxantrona; por otro lado, existen nuevos inhibidores que se están estudiando también por su uso como agentes antineoplásicos. Por mencionar alguno de estos nuevos inhibidores están las Bisdioxopiperazinas, a las cuales pertenecen inhibidores como ICRF-193, ICRF-187, el Merbarone y la Aclarubicina. En su conjunto, todas estas moléculas se dividen en 2 grandes grupos dependiendo del punto dónde bloqueen el ciclo catalítico de Topoisomerasa II, de manera que en algunos casos se induce la aparición de roturas de cadena doble en el ADN (p.ej. Etopósido, que bloquea el paso 4), mientras que en otros casos no (p. ej. ICRF-193, que bloquea el paso 5) (*Hande, 2008; Damelin & Bestor, 2007; Luo et al., 2009*).

3.- El gen MCPH1 y su papel en la actividad del “Decatenation Checkpoint”

Hay estudios que relacionan campos como la neurociencia, la biología celular, la biología del desarrollo, la genética y la biología evolutiva, siendo algunos de estos el estudio de la neurogénesis y el desarrollo cortical del cerebro (*Molnár et al., 2014; Paridaen & Huttner, 2014; Sun & Hevner, 2014*). Dentro de este ámbito se pueden enmarcar los estudios de síndrome genéticos que causan alteraciones en el desarrollo cerebral, como es el caso del síndrome de microcefalia primaria autosómica recesiva (MCPH) (*Woods et al., 2005; Kaindl et al., 2010; Gilmore & Walsh, 2013*). De entre los genes que se han identificado mutados en este síndrome, MCPH1 resulta de especial interés por su rol en otros procesos además del desarrollo del cerebro (*Jackson et al., 1998; Jackson et al., 2002*), como son la reparación del ADN (*Xu et al., 2004; Lin et al., 2005; Peng et al., 2009*), en la condensación cromosómica (*Neitzel et al., 2002; Trimborn et al., 2004; Yamashita et al., 2011*), su potencial contribución en procesos tumorales (*Chaplet et al., 2006; Rai et al., 2006; Richardson et al., 2011*), la función de la línea germinal (*Liang et al., 2010*), y también ha proporcionado información importante sobre la evolución del cerebro per se (*P. D. Evans, 2004; P. J. Evans et al., 2005; Wang & Su, 2004; Ponting & Jackson, 2005*). Aun con todos estos estudios previos, todavía quedan preguntas sin responder con respecto a la relación de este gen con el desarrollo de la microcefalia, su mecanismo molecular en neurogénesis y su rol clave en el desarrollo del tamaño del cerebro (*Pulvers et al., 2015*).

La microcefalia primaria autosómica recesiva (MCPH) es una condición genéticamente heterogénea (*Mochida & Walsh, 2001*), en la que están involucrados cerca de 30 genes identificados a día de hoy. Los locus involucrados conocidos están numerados desde MCPH1 hasta MCPH28 (*D. Xu et al., 2022*); se ha observado que estos genes están relacionados con el centrosoma o el huso mitótico (*Bond & Woods, 2006; Bettencourt-Dias et al., 2011*). En el caso de MCPH1, este atraviesa múltiples funciones relacionadas con la activación de la transcripción, el huso mitótico y el centrosoma, y la reparación de daños en el ADN (*Yang et al., 2008; Gruber et al., 2011; Pulvers et al., 2015; Zhou et al., 2013*).

El gen MCPH1 posee una característica exclusiva dado que el origen de mutaciones en el mismo, condicionan la aparición de una condensación cromosómica prematura (síndrome Premature Chromosome Condensation) (**Imagen 5**) (*Pulvers et al., 2015*). Esta condensación cromosómica prematura ocurre durante una etapa temprana de la fase G2, además de una descondensación retardada postmitótica (*Trimborn et al., 2006*), observable en todas las células. Muchas de las mutaciones del gen MCPH1 identificadas que causan microcefalia primaria son homocigotas (*Pulvers et al., 2015*): deleción de exones (*Garshasbi et al., 2006; Darvish et al., 2010; Pfau et al., 2013*), inserción o deleción de un par de bases (*Trimborn et al., 2004; Darvish et al., 2010; Hussain et al., 2013*), mutaciones sin sentido (*Jackson et al., 2002; Farooq et al., 2010; Hosseini et al., 2012*), mutaciones con cambio de sentido (*Darvish et al., 2010; Trimborn et al., 2005; Leung et al., 2011; Ghani-Kakhki et al., 2012*), y mutaciones que afectan al splicing (*Darvish et al., 2010*).

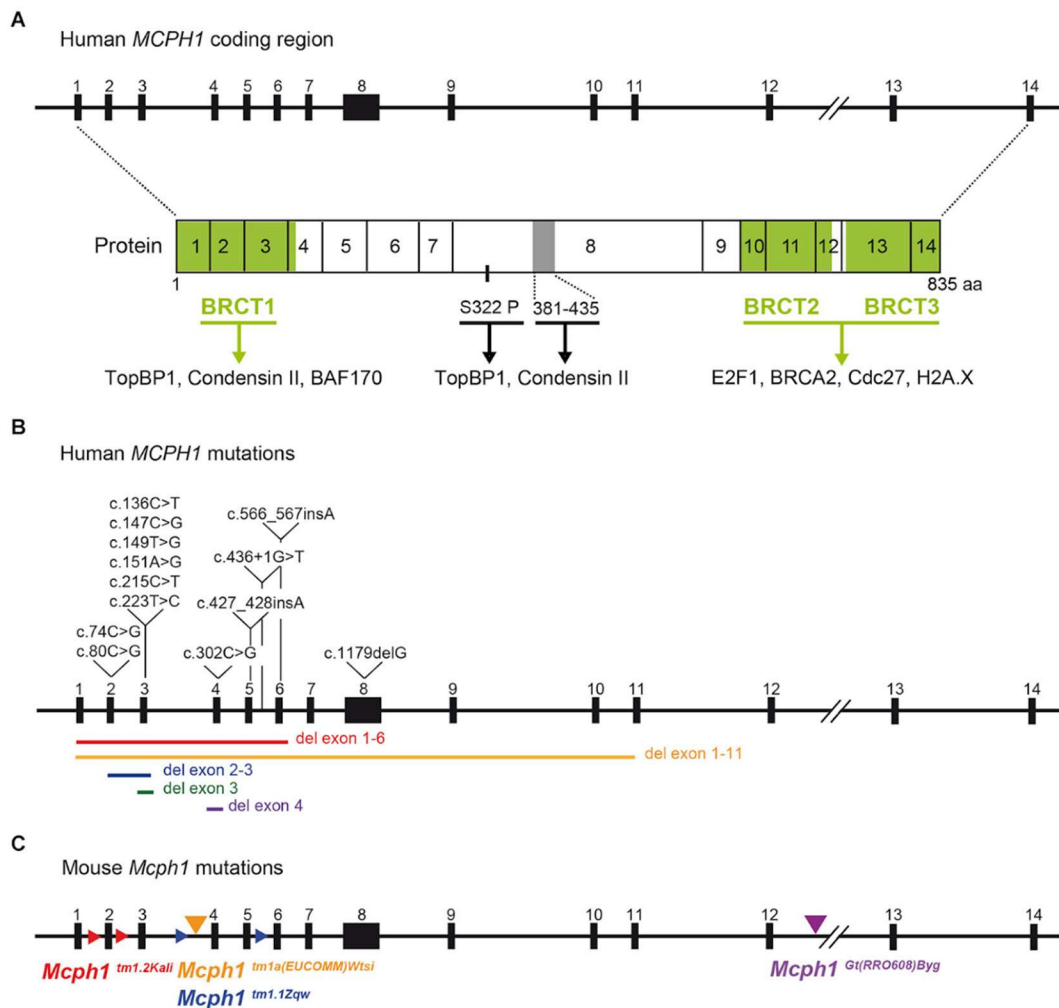


Imagen 5: A) Esquema de la estructura intrón-exón del gen MCPH1 (superior) y estructura de la proteína de dominio (inferior), las cuales están altamente conservadas entre ratón y humano; **B)** Mutaciones detectadas en MCPH1 que causan microcefalia primaria (*Pulvers et al., 2015*).

La secuencia del gen MCPH1 contiene 14 exones, distribuidos todos ellos en 200kb de ADN genómico; la proteína a su vez, de 110 KDa tiene tres dominios BRCT (BRCA1 C-Terminal) (*N. Wang et al., 2014; Pulvers et al., 2015*). Uno de estos dominios está situado en el extremo N-Terminal de la proteína MCPH1 (BRCT1), mientras que los otros dos abarcan la secuencia C-Terminal (BRCT2/3); estos dominios tienen gran importancia para el funcionamiento y están involucrados en diferentes funciones de MCPH1 mediando su interacción con otras proteínas (*Jeffers et al., 2008*). Por otro lado, para regular la condensación cromosómica existen dos regiones de importancia dentro del gen MCPH1 en humanos: un fragmento en N-Terminal que contiene el dominio BRCT1 (aminoácidos del 1 al 195) y un fragmento central (aminoácidos del 381 al 435) (*Yamashita et al., 2011*). La secuencia N-Terminal se vio que era necesaria para reclutar BAF170, un componente del complejo de remodelación SWI/SNF de la cromatina, el cual se encarga de relajar el ADN para el proceso de reparación (*Peng et al., 2009*); Los dominios BRCT2/3 se unen a E2F1 para formar un complejo capaz de transactivar BRCA1 y CHK1 (*Yang et al., 2008*); Además, existe la interacción entre los dominios BRCT2/3 y la subunidad del complejo promotor de la anafase Cdc27, y un dominio fosforilado de H2A.X (*Pulvers et al., 2015; Singh, Basnet, et al., 2012*).

Estudios previos han demostrado también que la función del gen MCPH1 es importante para la respuesta celular a la inhibición catalítica de Topoisomerasa II- α , esto es, el funcionamiento del “Decatenation Checkpoint”. Así, en células humanas sin función para este gen se observó que la inhibición prolongada de Topoisomerasa II- α por incubación con ICRF-193 originaba una parada en G2 permanente. Esta respuesta era diferente de la observada en células control, las cuales tras una parada temporal en la misma fase terminaban entrando en división debido a que experimentaban un proceso de adaptación a este punto de control (definido como la capacidad de saltarse un punto de control del ciclo a pesar de que el defecto señalizador no ha sido reparado) (*Arroyo et al., 2019*). Por tanto, la función de este gen se entiende fundamental para contribuir a dicho proceso de adaptación al decatenation checkpoint. Además, se observó que dicha respuesta celular depende de una vía de señalización en la que participan otros reguladores como Chk1 y Plk1, que presentan funciones contrapuestas (*Arroyo et al., 2020*). Estos resultados se obtuvieron en células de pacientes MCPH1, y también sobre un modelo tumoral de falta de función temporal de este gen por RNAi.

Objetivos:

Este TFG tiene como objetivo analizar la dinámica del ciclo celular en respuesta a la inhibición catalítica de Topoisomerasa II- α en un nuevo modelo celular humano diferente de los estudiados previamente. En concreto, se tratan de células RPE-1 editadas genéticamente mediante tecnología CRISPR-Cas9 para inducir mutaciones de falta de función en MCPH1. De este modo, se pretende determinar si son un modelo celular válido donde se reproducen los resultados previos relativos a la implicación funcional de MCPH1 en el proceso de adaptación al Decatenation Checkpoint.

Materiales y Métodos:

1.- Materiales

Para este TFG hemos utilizado líneas celulares humanas RPE- 1 (epitelio pigmentario de la retina humana-1), utilizadas como modelo para estudiar la mitosis porque representan una alternativa no transformada a las líneas celulares cancerosas. Estas líneas han sido originadas en el Laboratorio Felipe Cortés en el CNIO (Madrid), y presentan una mutación de falta de función obtenida por edición genética con la técnica CrisprCAS9 en los genes p53 y MCPH1. De este modo, contamos con células RPE-1 WT (wild type) y RPE-1 MCPH1 -/- (ambos con p53 no funcional). El trabajo con estas líneas celulares se ha llevado a cabo en el laboratorio de cultivos celulares del Centro de Instrumentación Científico-Técnico (CICT) de la Universidad de Jaén. La obtención y manejo de estas líneas celulares humanas cuenta con la aprobación del comité ético de los centros de origen (Laboratorio Felipe Cortés, Madrid) y de destino (Universidad de Jaén).

2.- Metodologías:

2.1.- Técnicas Básicas en el Mantenimiento de Cultivos Celulares:

Las líneas celulares previamente se encontraban congeladas en Nitrógeno Líquido, por lo que para trabajar con ellas se debían primeramente descongelar. Primero, en campana extractora, se preparaba un tubo con 10mL del medio de cultivo correspondiente, en este caso DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, INVITROGEN) suplementado con una mezcla de antibióticos (estreptomicina y penicilina) y suero bovino fetal al 10%. La alícuota obtenida del Nitrógeno Líquido se pasa a dicho tubo en cuanto se descongela y se centrifuga a RT, 10 minutos a 1100rpm. El pellet se resuspende en 4mL de medio de cultivo precalentado, y se pasa a un frasco de cultivo T25. Éste se pasa a un incubador a 37°C y 5% de CO₂ para que las células comiencen a adherirse y crecer. El control de la viabilidad y estado del cultivo celular se hace mediante seguimiento diario en el microscopio invertido de contraste para: mantenerlas creciendo, o por el contrario darles un pase (dividir el total de células a una fracción) o pasar a un frasco de mayor volumen (T75).

Cuando un frasco ya ha alcanzado un valor elevado de células este necesita ser tripsinizado para darle un pase. Este proceso consiste en usar Tripsina para levantar las células adheridas al frasco; para ello previamente se elimina el medio de cultivo en el que se encuentran las células y a su vez se retiran las células mitóticas. El proceso de levantamiento de las células necesita a su vez una incubación de las células con la tripsina durante un tiempo mínimo de 5 minutos (realizado en uno de los incubadores mencionados anteriormente), pues este tiempo puede variar dependiendo de lo que tardan todas las células en desprenderse. Una vez que todas las células se han levantado, se neutraliza la tripsina con el medio de cultivo correspondiente (F12) y se divide el total del volumen dependiendo del tipo de pase que se quiera realizar: pasarlo a un frasco diferente (de mayor o menor tamaño) o reducir la fracción total de células (este se hará en un tubo de 30mL).

En el caso de que se necesite conocer el número de células es necesario hacer un conteo de ellas. Para poder hacerlo el tubo mencionado para la fracción en lugar de dividirlo se centrifuga a RT, 1100rpm durante 10 minutos, de forma que todas las células formarán un Pellet; tras descartar el sobrenadante se resuspende el Pellet en 2mL del medio de cultivo (F12) y tomamos parte del volumen para hacer diluciones para hacer dicho conteo en una Cámara de Neubauer. En el laboratorio nosotros solemos hacer diluciones 1/20 tras dejar crecer las células durante un período de 72 horas aproximadamente; tras hacer el conteo celular mediante Cámara de Neubauer siempre solíamos obtener valores elevados. Un ejemplo serían los valores que obtuvimos para células RPE-1 WT de 5600 células/uL y para células RPE-1 MCPH1 de 4250 células/uL.

2.2.- Análisis de la dinámica del ciclo celular en respuesta a la incubación con inhibidores proteicos

Para realizar estos análisis, se sembraron 450000 células en 5 ml de medio de cultivo en placas de 60mm. Se hicieron tantas réplicas como fueran necesarias en función de la combinación de inhibidores ensayados. El listado concreto de los mismos, así como las concentraciones ensayadas se recoge en la siguiente tabla:

Inhibidor	Concentración stock	Concentración trabajo	Casa comercial	Target
ICRF-193	10 uM 20 uM	3.54 mM	Sigma-Aldrich	TOP2A
ICRF-187	20 uM	10 mM	Sigma-Aldrich	TOP2A
Etoposido	10 uM	10 mM	Sigma-Aldrich	TOP2A
Nocodazole	3 mM	250 nM	Sigma-Aldrich	Impide ensamblaje correcto huso mitótico

Las células se sembraron (día 1) según lo comentado anteriormente en medio DMEM F12. Al día siguiente (día 2), por la tarde/noche se añadieron los inhibidores correspondientes a la concentración requerida, y se mantuvieron durante las siguientes 12 horas. Por último, en la mañana del día 3, se procesaron las células para realizar ensayos de citometría de flujo. En todos los experimentos realizados, se mantienen una serie de placas a las que no se añaden inhibidores, que serán los controles “no tratados”. En este caso se añade el mismo volumen de solvente que el adicionado a las muestras tratadas.

2.3.- Ensayos de Citometría de Flujo:

Los análisis desarrollados implican cuantificación de cantidad de ADN por Ioduro de Propidio (IP) y fracción de células positivas para el anticuerpo Histona H3PS10, que es un marcador típico de mitosis, y que se detectan con una combinación concreta de anticuerpo primario y secundario. Al realizar este tipo de experimento de Citometría de Flujo, es necesario una muestra control para el IP y una muestra control para el anticuerpo secundario, pues son necesarios para asegurarse de que no se produzcan enlaces no específicos. La muestra control para el IP necesitaría la incubación con IP y ninguna con anticuerpo, y la muestra control para anticuerpo debería incubarse solo con AbII (la incubación que no reciba se sustituirá por PBS).

Para iniciar el procesamiento de las muestras para el citómetro, en primer lugar, se tripsinizaron las células, guardando el medio en el que estaban junto con la tripsina, con el fin de no perder ninguna célula mitótica (siendo cada muestra transferida a falcons de 15mL de tapa azul no esterilizados en autoclave). Se centrifugaron todos los falcons a temperatura ambiente, durante 5-10 minutos (hasta que se formase el mayor pellet posible) y a 500g; tras ello se descartó todo el líquido sobrenadante usando una pipeta p1000 (llegados a este punto no hace falta cambiar de pipeta entre muestras, sino que se puede usar la misma para todas) hasta dejar unos 70uL-100uL de medio que se resuspendieron con unos ligeros golpes al falcon y luego una p200. Para continuar se añadió 1mL de EtOH 70% (en frío) a cada muestra (este se debía añadir suavemente por la pared del tubo de forma que se observa la formación de dos fases), siendo estas posteriormente resuspendidas una vez más y almacenadas durante toda la noche a -20°C.

Al día siguiente, se procesaron todas las muestras: **1)** Se centrifugan los falcons a RT, 500g y 5/10 minutos; **2)** Se elimina el sobrenadante y las células se lavan en 3mL del tampón de incubación (Tampón de incubación -0.5% BSA en PBS 1X, siendo en este caso 1.25g de BSA en 250mL de PBS 1X; **3)** Se centrifuga de nuevo a RT, 500g 5/10 min; **4)** El sobrenadante se elimina de nuevo y se resuspenden las células de nuevo en 100uL de tampón de incubación; **5)** Se incuban todos los falcon durante 20 minutos a temperatura ambiente; **6)** Se centrifuga a RT, 500g durante 5/10 minutos para posteriormente descartar todo el sobrenadante; **7)** Se añade 100uL de la mezcla o Mix de anticuerpo primario (explicada más abajo) y se resuspende; **8)** Se hace una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente; **9)** Se centrifuga de nuevo a RT, 500g durante 5/10 minutos, se descarta el sobrenadante hasta dejar solo el pellet; **10)** Se añaden 100uL de la mezcla o Mix AbII y se resuspende; **11)** Se incuban las células a temperatura ambiente en un hábitat a oscuras; **12)** Se elimina el sobrenadante y se lavan las células con 3mL de tampón de incubación; **13)** Se centrifuga a RT, 500g durante 5-10 minutos y se vuelve a eliminar el sobrenadante; **14)** Se añade 1mL de la mezcla o Mix IP (explicada más abajo) y se resuspenden las células; **15)** Una última incubación durante 30 minutos a 37°C; **16)** Se llevarían a analizar todas las muestras al Citómetro de flujo o se podrían almacenar en frigorífico durante un plazo máximo de un día.

Mix Abl 1:50 Phospho-Histone H3 (Ser10) Monoclonal Antibody (K.872.3).
Mouse: 48uL de Abl en 2352uL BSA 0.5%

Mix AbII (1.75 μ L for each sample), Anti-mouse-FITC SantaCruz sc-2010:
44uL de AbII en 2456uL BSA 0.5%

Mix IP (en este caso se hizo para 25.5 muestras para que hubiese mix suficiente): 23300uL PBS 1X + 735uL RNase (stock 10mg/uL para tener 300ug/mL) + 490uL IP

2.4.- Cuantificación de datos con “Flowing Software”

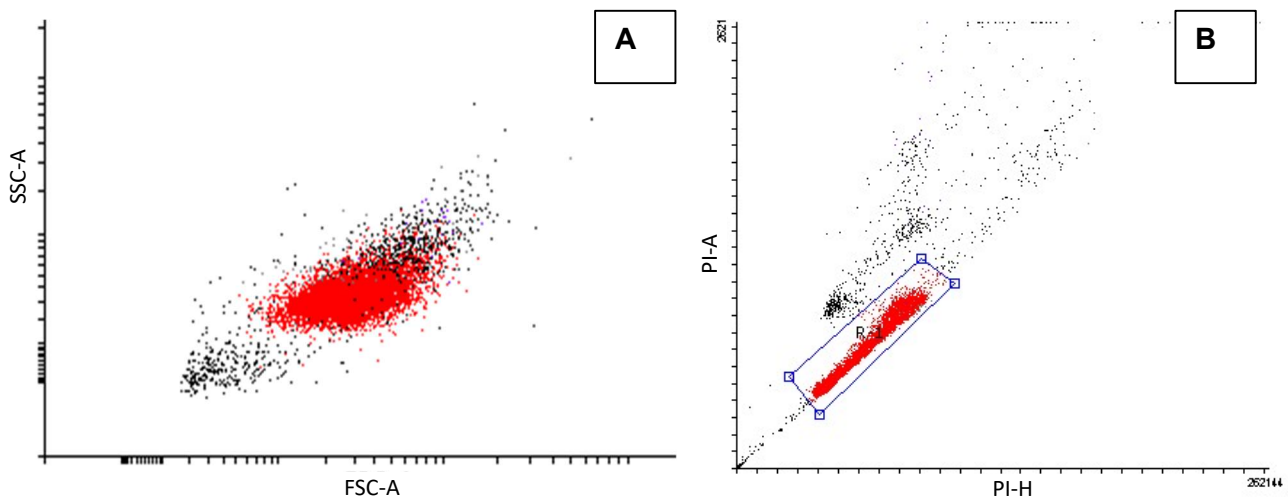
Los datos obtenidos del Citómetro de Flujo se analizaron a través del programa informático de acceso libre Flowing Software, creado por Perttu Terho en asociación con “Cell Imaging and Cytometry core and Biocenter of the Turku Centre for Biotechnology” en Finlandia. A continuación, se explica la estrategia de análisis, así como los “gatings” empleados.

Lo primero que nos da el programa es una imagen de los datos que obtiene el Citómetro de Flujo en relación con los datos de SSC (“Side Scattering”) y FSC (“Forward Scattering”), los cuales representan el tamaño y la granulosidad de las células (ejemplo de nuestros análisis en **Imagen 6A**). Debido a que estos son todos los valores en bruto que ha obtenido la máquina, no todos son realmente células, sino que algunos de estos valores (representados por puntos) pueden ser falsos positivos, suciedad, etc.

A continuación, hacemos un primer gathering de estos datos en bruto basado en los valores de IP de área (IP-A) y altura (IP-H), que nos permite quedarnos con células únicas y eliminar “doblets” o restos celulares dado que éstos no muestran una progresión lineal en el dot-plot (**Imagen 6B**). A continuación, hay que hacer un nuevo “gathing” para saber cuántas de estas células están en cada una de las diferentes fases del ciclo celular. Para ello creamos un histograma a partir de los datos seleccionados basado en el valor de IP-A, esto es, la intensidad de señal para IP, la cual varía entre 2 células individuales del mismo tipo celular concreto dependiendo de la cantidad de ADN que contienen. Este histograma comenzará desde un valor $X=0$ y seguirá hasta un valor muy superior, pero estos valores no nos interesan. A la hora de fijarnos en este histograma se puede ver momentos en los que hay un valor de Y próximo a 0 y empieza a haber un ascenso en el número de células y luego descender, tras ello una pequeña “meseta” y nuevamente un ascenso de la gráfica para un posterior descenso y ya una estabilidad cercana a $X=0$; gracias al software podemos “aislar” estos dos picos y esta meseta, de forma que el programa nos “elimine” lo que hay antes y después de estos y dejándonos solo con esta parte (**Imagen 6C**), la cual son representativas de las fases del ciclo: el primer pico representa células en fase G1, que son las que tienen un valor de ADN 2C, la meseta representa células en fase S, cuya cantidad de ADN es variable y mayor de 2C dependiendo de si estás más o menos avanzada la replicación. Por último, el segundo pico, menor que el primero, son células en las fases G2 o M, las cuales tienen una cantidad de ADN 4C. En este punto tenemos los datos del número de células (y fracción) en cada punto del ciclo celular, respecto del total analizado tras los gathings correspondientes.

Para finalizar, nos queda saber cuántas células hay en fase G2 y cuantas son mitóticas. En este caso creamos un nuevo gating a partir de los datos procesados según la **Imagen 6B**, que permite comparar los valores de IP (eje X) con la señal de fluorescencia FITC (eje Y). Ésta última sólo se observará en aquellas células que están en mitosis, y que por tanto son positivas para H3PS10. Lo que obtenemos es un nuevo tipo de dispersión de la nube de puntos original: gran parte de esta nube estará condensada y relativamente baja con respecto al eje de la Y; por otro lado, se encontrará otra nube de puntos mucho menos condensada, con un valor en el eje Y superior. Una vez más con ayuda del programa delimitamos un eje vertical y horizontal para aislar la segunda nube de puntos (**Imagen 6D**), y una vez que la seleccionemos podremos pedirle al programa que nos proporcione una tabla de datos con los eventos que hay en esta nube de puntos, siendo tales las células mitóticas y permitiéndonos a la vez el separar el valor de células mitóticas con respecto a aquellas que se encuentran en G2.

Los controles de IP y del anticuerpo secundario dieron los resultados esperados. Para el control del IP la principal diferencia se debe a que, aunque se obtienen los datos en bruto, no aparece esa segunda nube de puntos que se ve en la **Imagen 6D** debido a que es procedente del uso de los anticuerpos (**Imagen 6E**); En el caso del control del anticuerpo es algo más visual debido a que todas las gráficas, a excepción de la primera con los datos en bruto, poseen al menos un eje para un valor del IP, y al no haber añadido este tratamiento ninguna de estas gráficas contendrá algún dato (**Imagen 6F**). Gracias a estos controles podemos asegurarnos y decir que no se han producido enlaces no específicos.



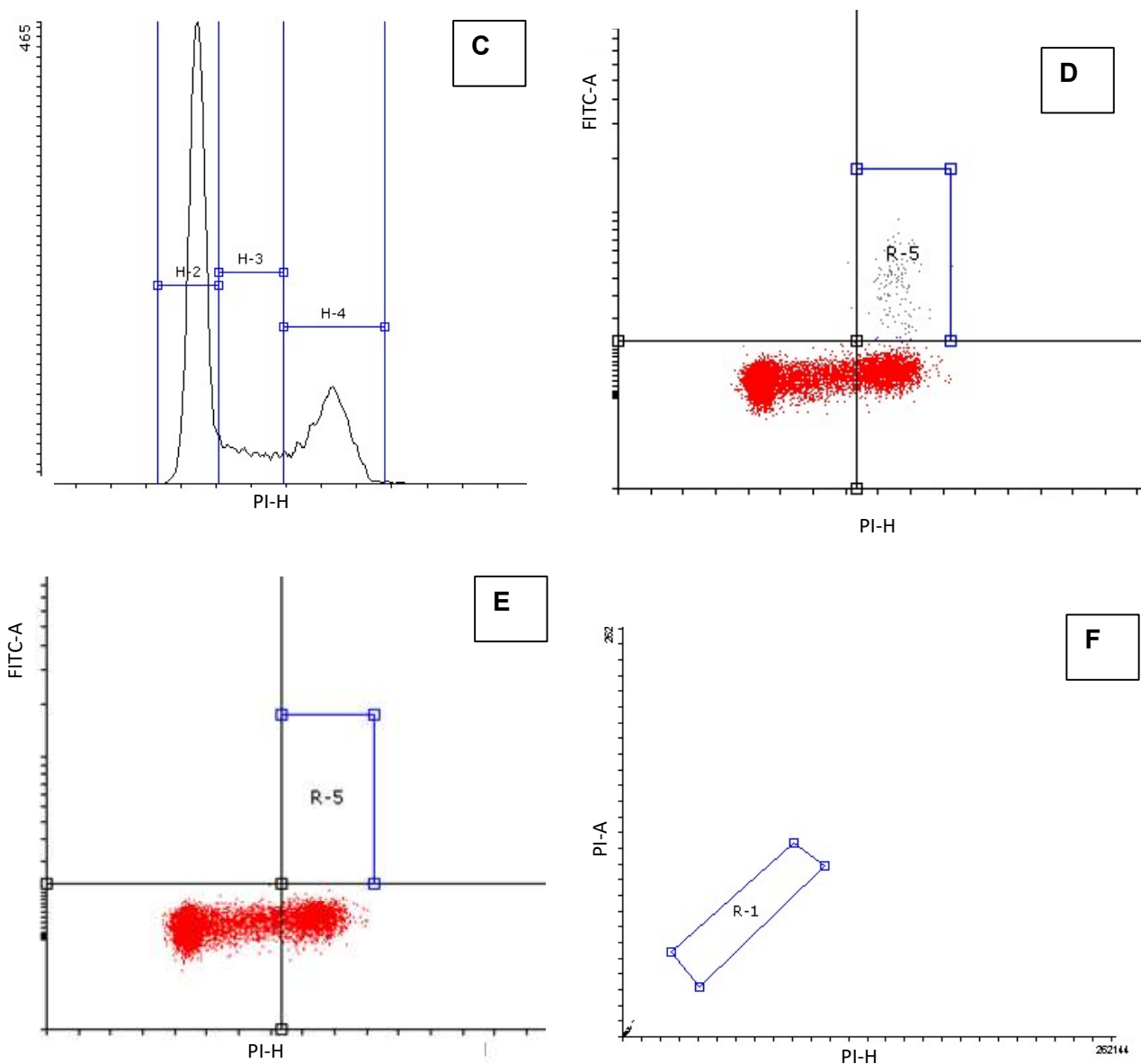


Imagen 6: **A)** Ejemplo de dot-plot que muestra los datos en bruto en función de los parámetros FSC y SSC. La población celular en rojo es la que se ha seleccionado en B tras aplicar el gathering correspondiente; **B)** Primer “gathering”: dot-plot que muestra la población celular en A en función de los valores de IP-A e IP-H. Las células incluidas en el recuadro R1 son las que se seleccionan para los análisis posteriores; **C)** Histograma a partir de la población seleccionada en B que muestra el número de eventos en función del valor de IP-H. Las fracciones H2, H3 y H4 engloban células en las fases G1, S y G2/M respectivamente. **D)** Dot-plot a partir de la población celular seleccionada en B que muestra la población celular en A en función de los valores FITC-A e IP-H. Las células incluidas en el recuadro R5 contienen las células en fase M. **E)** Dot-plot de una muestra control control de IP en la que se muestra su población seleccionada en función de los valores FITC-A e IP-H. Esta no muestra células incluidas en el recuadro R5 debido al no haber añadido anticuerpo no está la señal correspondiente. **F)** Primer “gathering”: dot plot que muestra la población celular en A en función de los valores IP-A e IP-H. En este caso no hay células debido a que al ser control del anticuerpo no hay señalización de IP.

Resultados:

Todos los datos de citometría obtenidos se procesaron con el sistema operativo “Flowing Software”, y se presentan a continuación en una serie de gráficas donde se muestran las fracciones de células en diferentes fases del ciclo celular, en respuesta a los tratamientos realizados. Para su presentación, he decidido mostrar los datos que se obtuvieron de manera independiente para cada uno de los 3 experimentos realizados:

1.- Análisis experimental 1

En este primer análisis experimental se estudió la alteración del ciclo celular en respuesta a una incubación de 12 horas con diferentes fármacos inhibidores de Topoisomerasa II: ICRF-193 concentraciones de 10uM y 20uM, ICRF-187 a 20uM y Etopósido a 10uM. Además, y en paralelo, se obtuvieron muestras tratadas simultáneamente con Nocodazol. El poder comparar estas muestras es de suma importancia pues nos permite entender mejor la dinámica del ciclo celular, dado que en condiciones normales y sin que haya ninguna alteración las células comenzarán a acumularse de manera gradual en mitosis conforme aumenta el tiempo de incubación. Esto se debe a que este compuesto activa el “Spindle Checkpoint” y las células se quedan retenidas en prometafase, sin que se inicie la segregación cromosómica (*Damelin & Bestor, 2007*).

Los resultados en porcentaje obtenidos se muestran en las siguientes gráficas (Figuras 1 y 2): Datos Totales WT 12h (células RPE-1 WT) y Datos Totales MCPH1 12h (células RPE-1 MCPH1 -/-). Además, para entender mejor y comparar entre muestras y tratamientos, en las gráficas posteriores (Figuras 3-10) con los nombres de Fold Increase G1, Fold Increase S, Fold Increase G2 y Fold Increase M, se muestran estos datos como aumento proporcional para cada las fases correspondientes del ciclo respecto a un valor referencia 1 seleccionado para la muestra no tratada.

En condiciones sin tratar, el perfil del ciclo celular obtenido es el esperado, tanto para WT como MCPH1. En ambos casos, la mayoría de células se encuentra en fase G1 con un 58% para WT y 67% en el caso de MCPH1, y la fracción de células en fase S es de 13% y 10% respectivamente, G2 de 27% WT y 21% MCPH1 y M cerca del 2% para ambos tipos celulares. En comparación con este perfil, los tratamientos indicados producen alteraciones ciertamente particulares, las cuales vamos a mencionar a continuación.

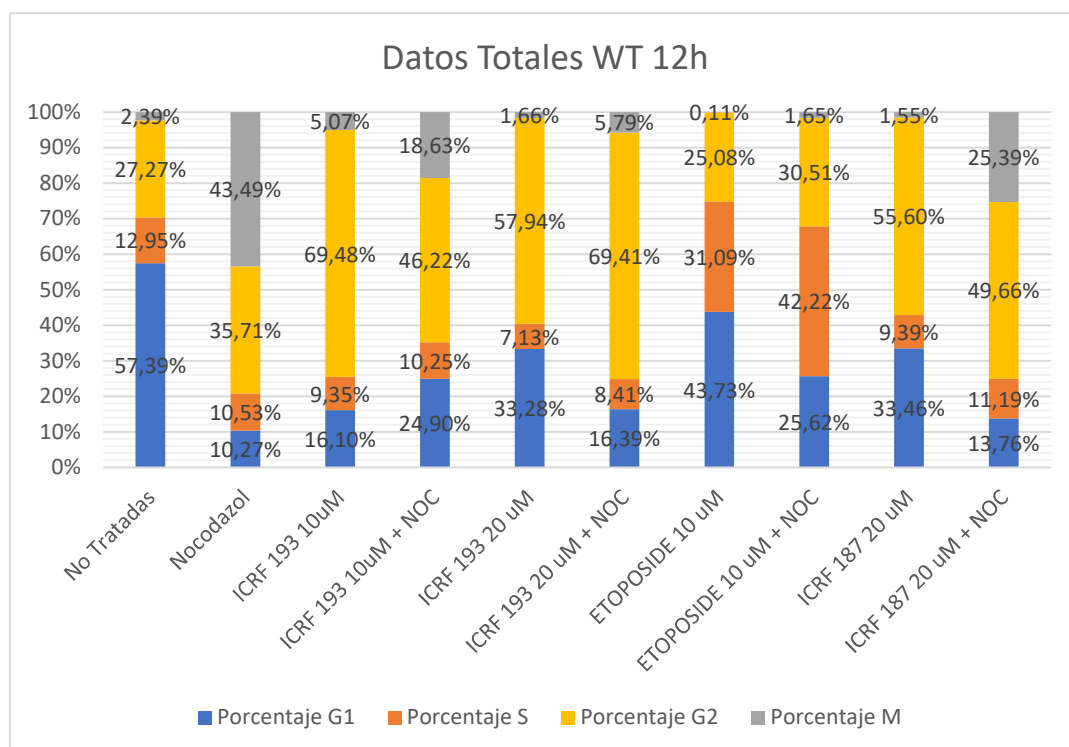


Figura 1: Gráfica con los datos de todas las células en cada una de las fases del ciclo celular para RPE-1 Wild Type durante la ventana temporal de 12 horas.

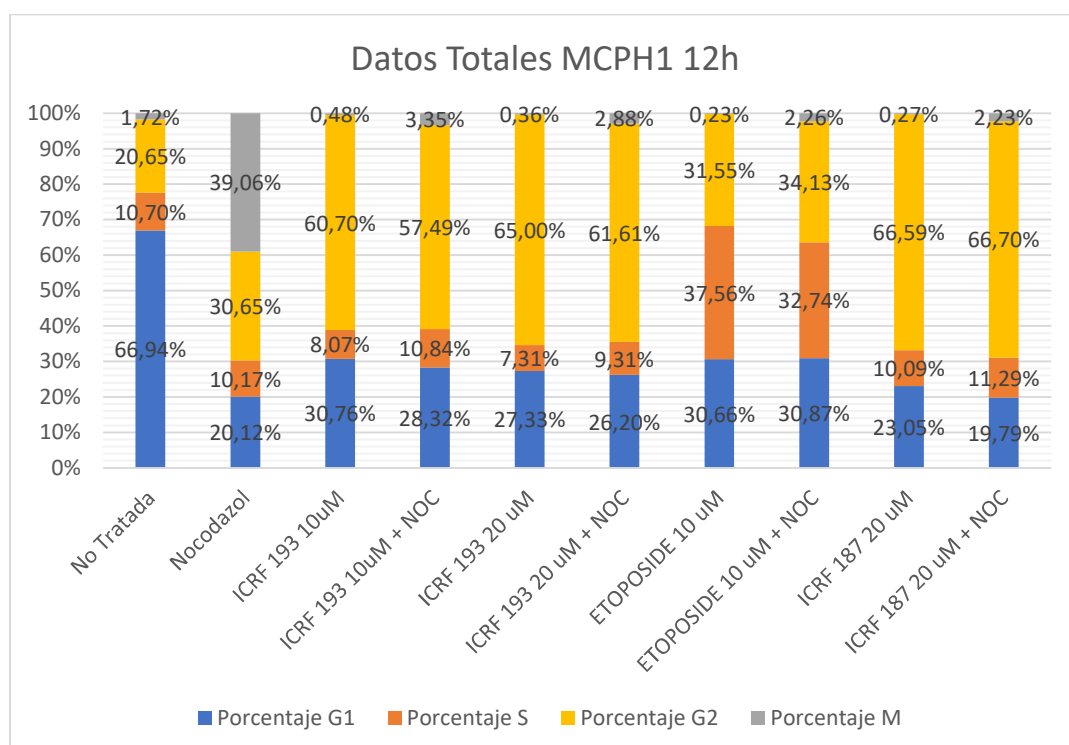


Figura 2: Gráfica con los datos de todas las células en cada una de las fases del ciclo celular para RPE-1 MCPH1 -/- durante la ventana temporal de 12 horas.

Primero vamos a hablar del caso de las muestras de WT, partiendo con el tratamiento de 12 horas con Nocodazol, pues este produce un aumento significativo de células en mitosis, llegando a tener un 43% de células en esta fase, lo que es un aumento 18 veces superior respecto a las células sin tratar. Consecuentemente una reducción considerable de la fracción de células en G1, aproximadamente una quinta parte, siendo éstas un 10,27% respecto a las células sin tratar, en las que se cuantifican un 57,4%. Con esta muestra podemos estimar la fracción de células que entran en división mitótica durante esta ventana temporal (la cual podemos decir que es una aproximación a la mitad de su totalidad). Por otro lado, si comparamos el tratamiento de Nocodazol sólo con Nocodazol+ICRF-193 a 10uM, vemos que sigue existiendo ese aumento significativo de células en mitosis, pero esta vez el valor de células mitóticas se reduce a un 18%, indicando que, con un lapso de tiempo de doce horas, las células tratadas con ICRF-193 son capaces de detener temporalmente el ciclo celular en G2.

Estos resultados, diferentes de los observados sólo para Nocodazol, sugieren que, a esta concentración, el inhibidor está induciendo una reducción en la tasa de entrada en mitosis debido a que se quedan retenidas, de forma temporal y no de forma completa, en la fase G2. Los valores obtenidos en este caso son totalmente esperables debido a la activación del Decatenation Checkpoint en respuesta a la inhibición de Topoisomerasa II, aun siendo la capacidad de detención del ciclo celular en fase G2 limitada.

En el caso de las muestras sin función para el gen MCPH1, si partimos de la misma forma con el tratamiento de 12 horas con Nocodazol, se observa que en este caso también existe un aumento significativo de células que entran en mitosis, pues este valor sube hasta un 39%, siendo aun así un valor casi 23 veces superior respecto a las células sin tratar. Consecuentemente, esto supone una reducción considerable de la fracción de células en G1, un 20% respecto a las células no tratadas, las cuales cuantifican un 67%. Al comparar el tratamiento de Nocodazol sólo con Nocodazol+ICRF-193 a 10uM, se observa que existe un aumento en el número de células en mitosis, pero este valor es del 3,35%. Estos resultados nos indican que, aunque las células deberían ser capaces de saltarse la parada en G2, al inhibir la Topoisomerasa II y tener falta en la función del gen MCPH1, no pueden entrar correctamente en división, explicando de tal forma el por qué su número de células mitóticas es tan reducido.

Retomando las células WT, el siguiente tratamiento que se planteó fue duplicar la concentración usada con ICRF-193, pasando a ser esta vez a 20uM. Al visualizar la inhibición doble de este tratamiento (Nocodazol+ICRF-193 a 20uM) observamos que hay una parada considerable de células en G2, siendo estas un 69,41%, y un aumento de células en mitosis, siendo un 5,79% de la fracción total de células; si comparamos ahora este tratamiento sólo con Nocodazol, denotamos en consideración una reducción considerable de células en mitosis, reduciéndose este valor a casi una décima parte. El aumento de la concentración de este inhibidor en células WT nos indica que las células, aunque son capaces de entrar en división, su capacidad de hacerlo se reduce a un tercio. Para las células que no tienen la función para el gen MCPH1 no se aprecia ninguna diferencia entre el tratamiento de Nocodazol+ICRF-193 a 10uM con respecto a Nocodazol+ICRF-193 a 20uM, repitiéndose prácticamente los mismos resultados mencionados antes.

A continuación, pasamos al tratamiento con Etopósido, el cual sabemos que provoca una acumulación grande en fase S, debido a que se inducen DSBs en el ADN (*Hande, 2008; Damelin & Bestor, 2007*), interfiriendo negativamente en el avance de la replicación. En nuestros resultados, al observar la línea RPE-1 WT vemos que efectivamente sí ocurre dicha parada en fase S, obteniendo un 31% del total de células en esta fase. Con el fin de conocer más sobre el efecto del tratamiento comparamos este con solo Nocodazol, del cual podemos interpretar que al haber los mismos valores

en fases G2 y M, no hay un avance significativo de las células a estado de mitosis; además, encontramos cuatro veces más células en fase S en este tratamiento doble que solo en Nocodazol. Estos resultados nos indican que la parada en S por parte de las células, aunque no termina de ser permanente, conlleva que las células que se adaptan y entren en fase G2 no consigan entrar en mitosis debido a los problemas que hay en su ADN. En el caso de las células sin la función para el gen MCPH1, aunque los valores obtenidos son algo diferentes, nos muestran los mismos resultados, una gran parada del ciclo celular en fase S y la imposibilidad de entrar en mitosis.

Para concluir se analizó la muestra tratada con ICRF-187 a 20uM. En las células WT vemos hay una gran parada del ciclo celular en fase G2, siendo este un 55,60% del total de células; cuando añadimos el Nocodazol y comparamos este tratamiento doble (Nocodazol+ICRF-187) con sólo Nocodazol observamos que las células, paradas en G2, son capaces de adaptarse a esa parada temporal, y entrar en mitosis, pasando a obtener en este caso un 25% de células mitóticas. Si ahora vemos las células sin la función para el gen MCPH1 vemos que los resultados obtenidos son diferentes, pues en este caso ambos tratamientos (simple y doble) dieron los mismos valores, indicándonos que, a diferencia de las células que sí tienen el gen MCPH1, la parada que ocurre en G2 es permanente e impide a las células entrar en estado de división.

Una vez obtenidos y comparados los resultados sólo con Nocodazol, estos nos sugieren que, los inhibidores de ICRF provocan una parada temporal en fase G2 en las células WT (durante la ventana temporal de 12 horas); en el caso de Etopósido (con parada temporal en S) y de las células sin función para MCPH1, las paradas que encontramos impiden que las células entren en división mitótica, pues la inhibición de la Topoisomerasa II y los daños provocados en el ADN inducen la activación total del Decatenation Checkpoint e impide el avance de las células a su estado de división.

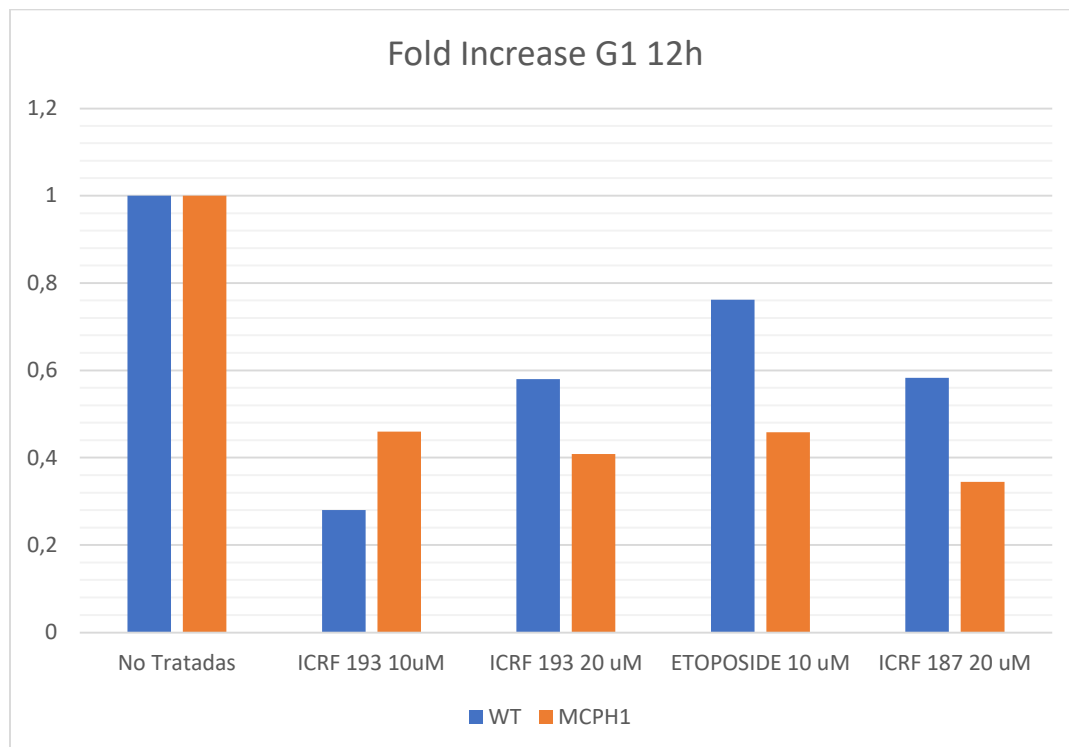


Figura 3: Gráfica con los valores de células sin Nocodazol en fase G1, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) durante la ventana temporal de 12 horas.

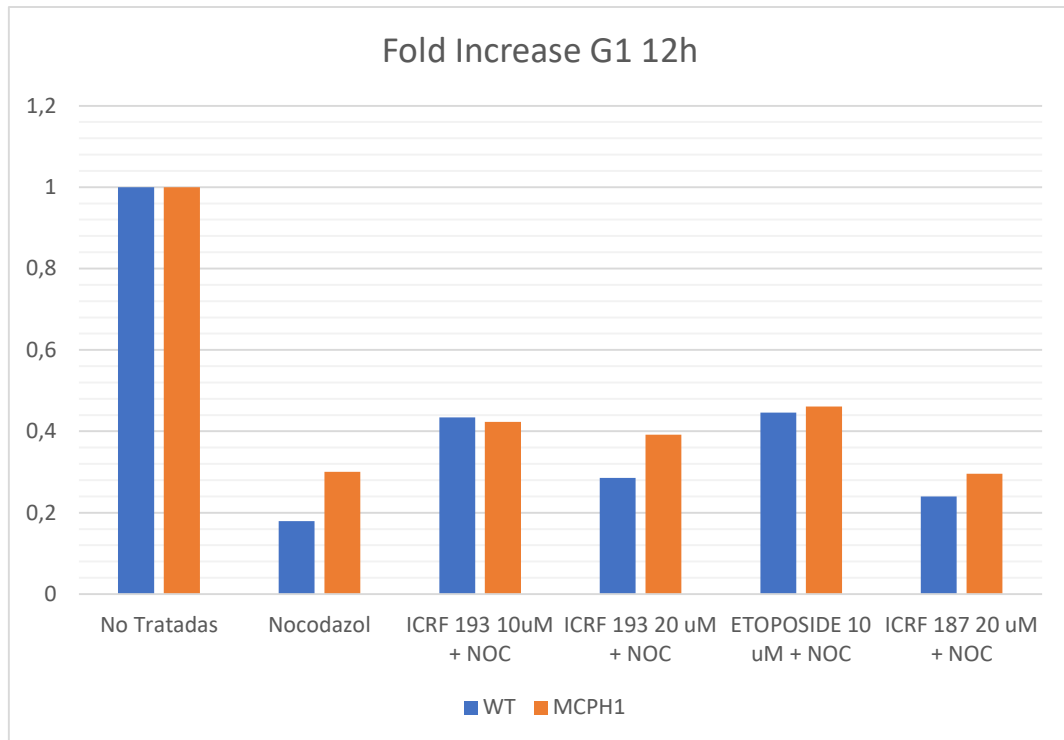


Figura 4: Gráfica con los valores de células con Nocodazol en fase G1, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) durante la ventana temporal de 12 horas.

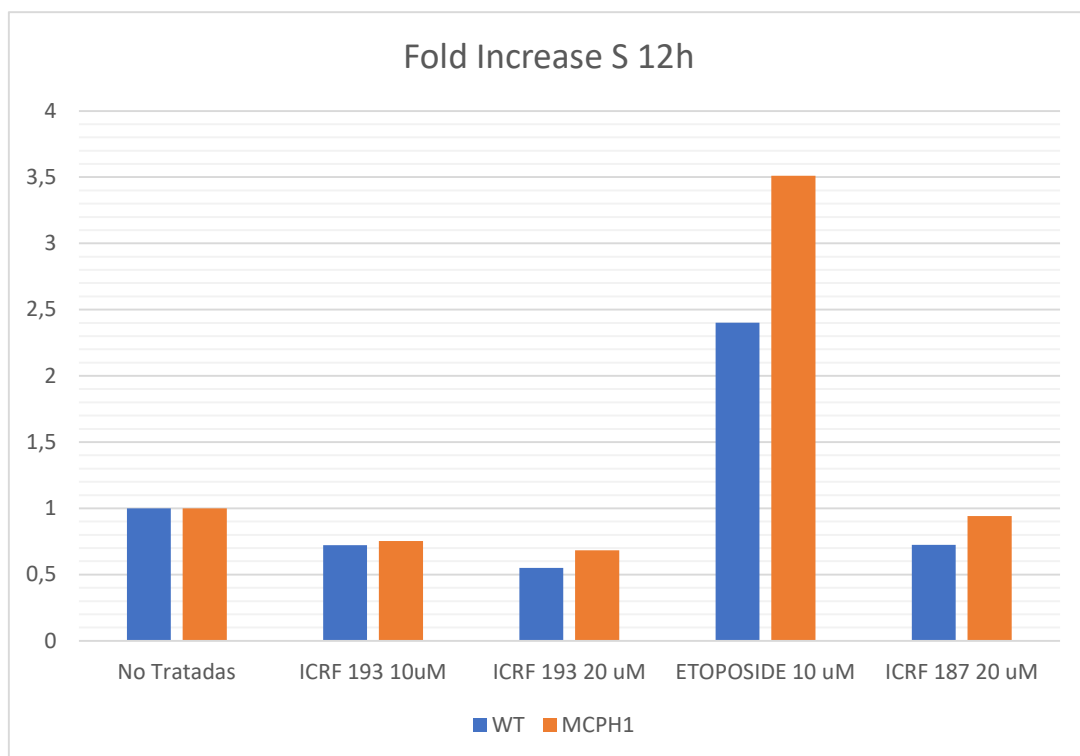


Figura 5: Gráfica con los valores de células sin Nocodazol en fase S, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) durante la ventana temporal de 12 horas.

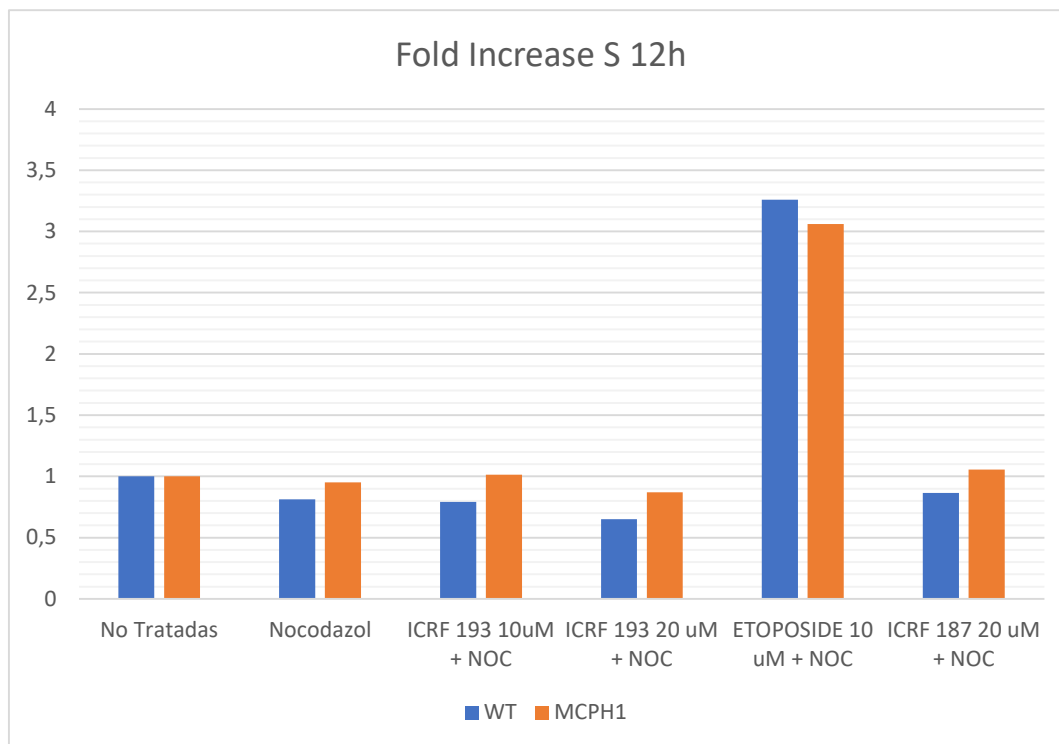


Figura 6: Gráfica con los valores de células con Nocodazol en fase S, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) durante la ventana temporal de 12 horas.

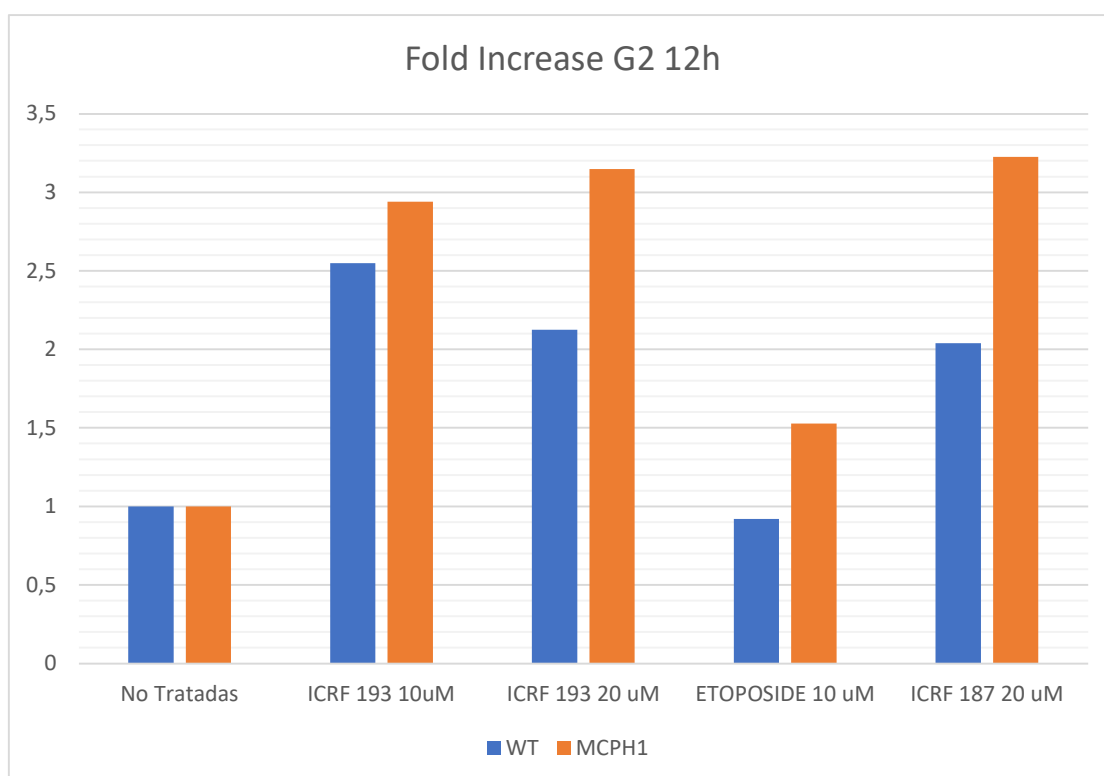


Figura 7: Gráfica con los valores de células sin Nocodazol en fase G2, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) durante la ventana temporal de 12 horas.

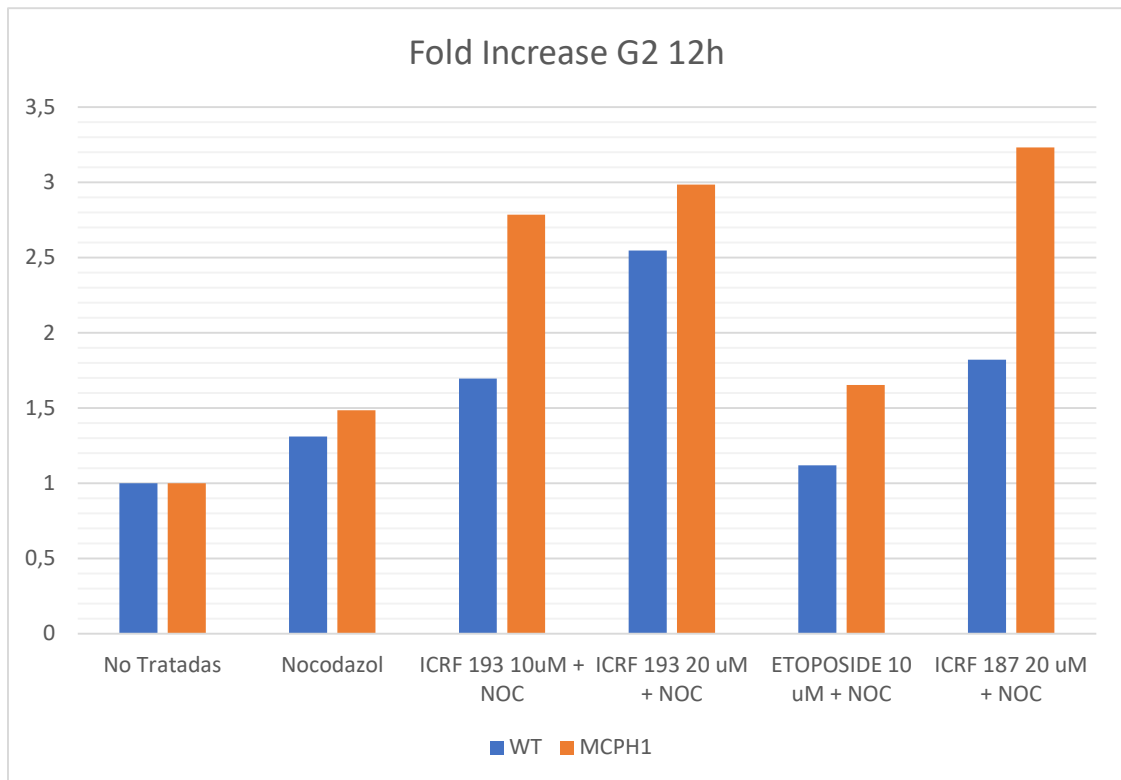


Figura 8: Gráfica con los valores de células con Nocodazol en fase G2, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) durante la ventana temporal de 12 horas.

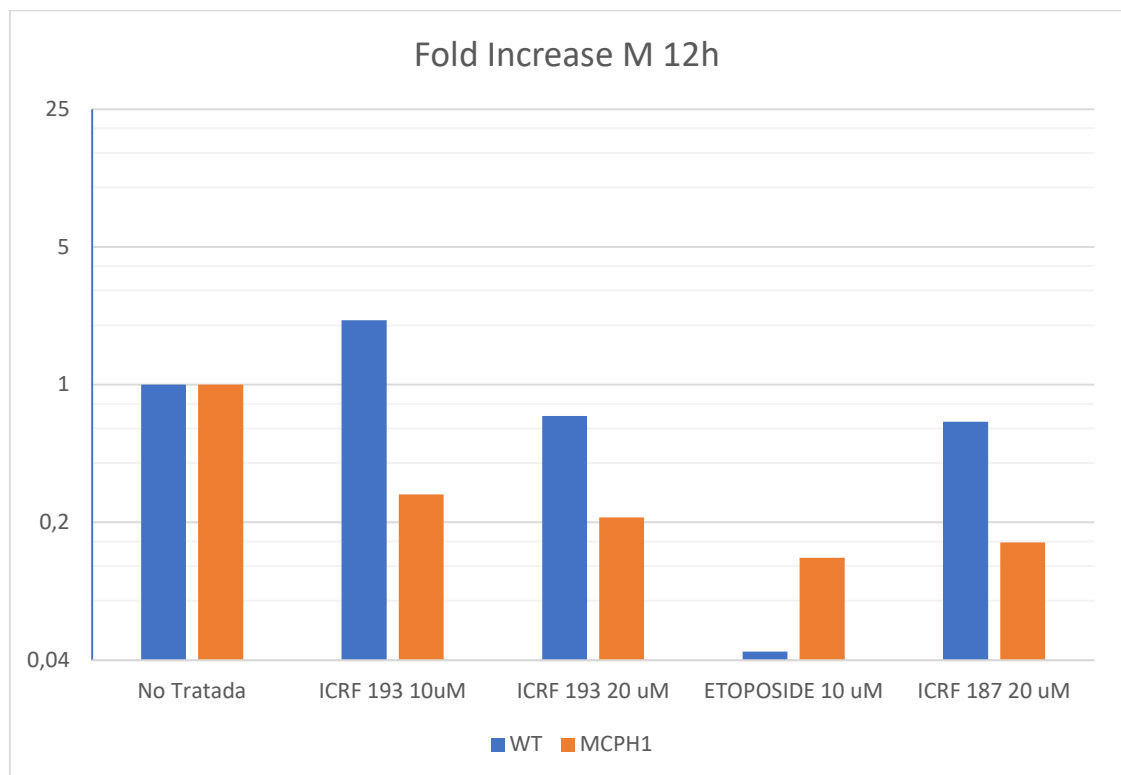


Figura 9: Gráfica con los valores de células sin Nocodazol en fase M, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) durante la ventana temporal de 12 horas.

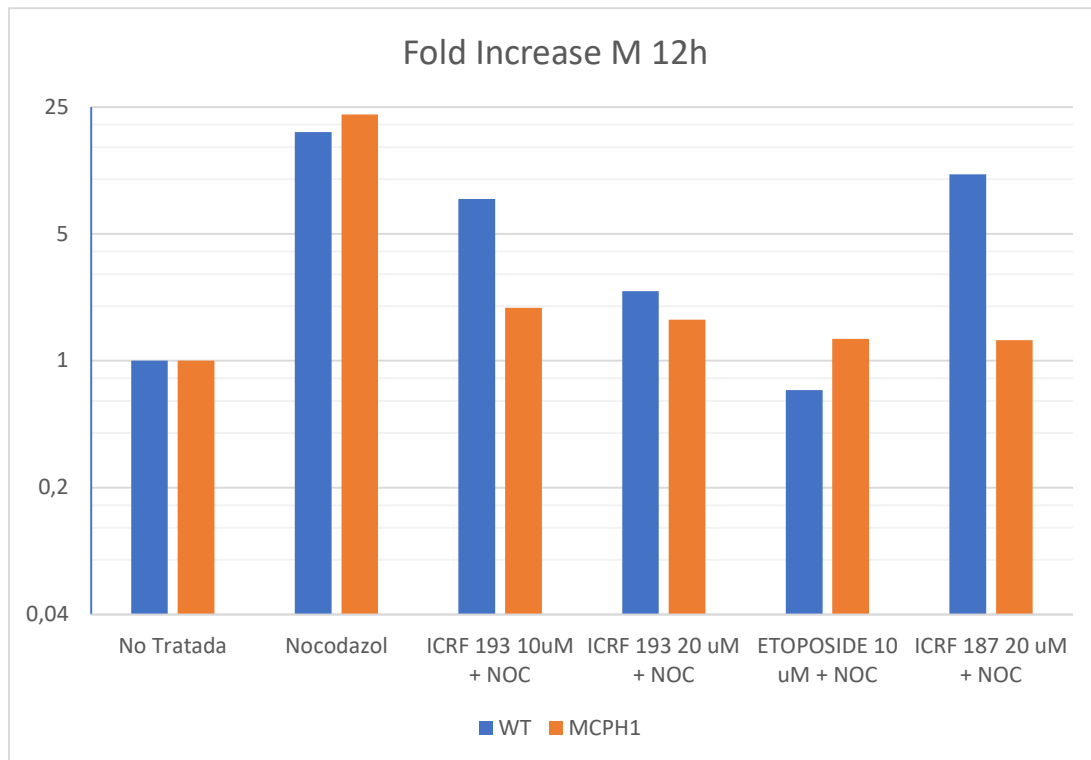


Figura 10: Gráfica con los valores de células con Nocodazol en fase M, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) durante la ventana temporal de 12 horas.

2.- Análisis experimental 2

Este análisis es similar al anterior, sólo que en este experimento la incubación de los tratamientos fue 24 horas en lugar de las 12 horas previas. Los resultados se muestran de la misma forma, primeramente hay dos gráficas mostrando los todos los datos celulares para cada uno de los tratamientos usados (Figuras 11 y 12): Datos Totales WT 24 horas (células RPE-1 WT) y Datos Totales MCPH1 24 horas (células RPE-1 MCPH1 -/-); después (Figuras 13-20) se encuentran las gráficas Fold Increase G1, Fold Increase S, Fold Increase G2 y Fold Increase M, mostrando los mismos resultados pero como aumento proporcional para las diferentes fases del ciclo respecto a un valor de referencia 1, el cual ha sido seleccionado para la muestra no tratada.

En este segundo análisis se usaron los mismos fármacos inhibidores de Topoisomerasa II que en el primer análisis, con la diferencia de que esta vez debido a los resultados obtenidos se decidió únicamente usar ICRF-193 con la concentración de 10uM. El motivo de este análisis era entender cómo la dinámica del ciclo celular, afectada durante el plazo de 12 horas previas, puede llegar a variar durante otras dos horas, haciendo un ciclo diario completo.

Para esta ventana temporal de 24 horas, en condiciones sin tratar el perfil del ciclo celular obtenido es el esperado, tanto para WT como MCPH1. En ambos casos, la mayoría de células se encuentra en fase G1 con un 58,5% para WT y 50,9% en el caso de MCPH1, la fracción de células en fase S es de 13% y 14% respectivamente, G2 de 27% WT y 31,7% MCPH1 y M de un 1% en las células WT y 3,5% en las células sin la función para MCPH1. En comparación con este perfil, los tratamientos indicados producen alteraciones ciertamente particulares, las cuales parecen diferir en cierto modo de lo observado durante la ventana temporal de 12 horas.

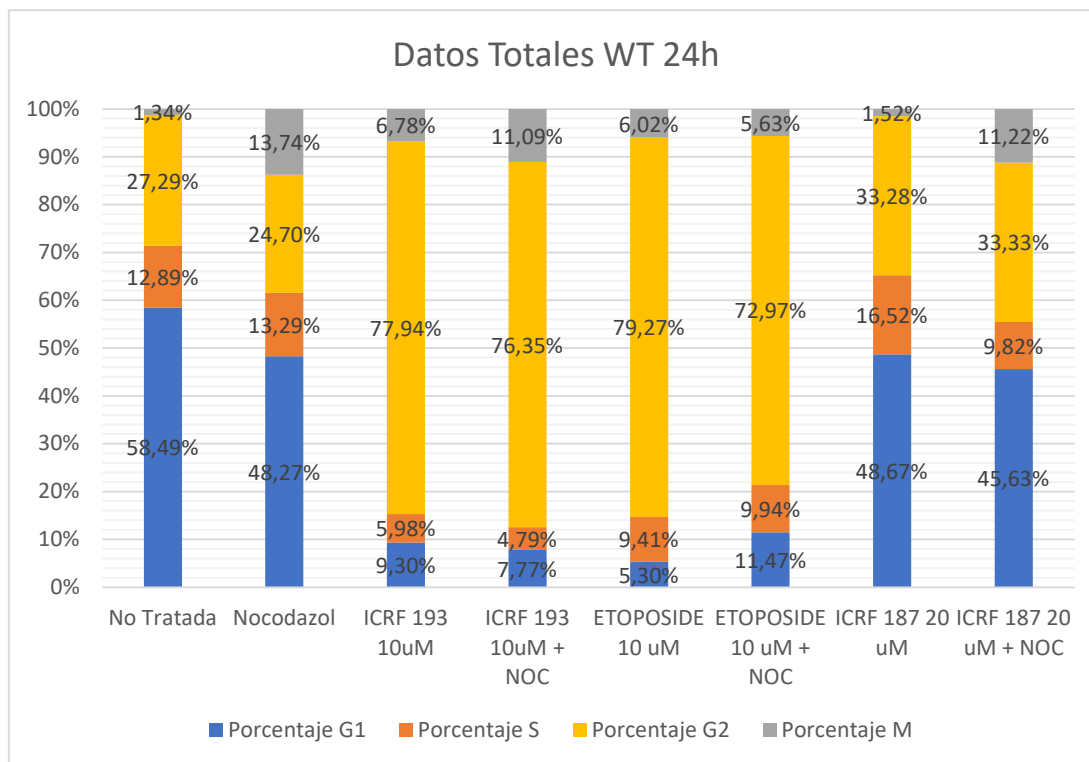


Figura 11: Gráfica con los datos de todas las células en cada una de las fases del ciclo celular para RPE-1 Wild Type durante la ventana temporal de 24 horas.

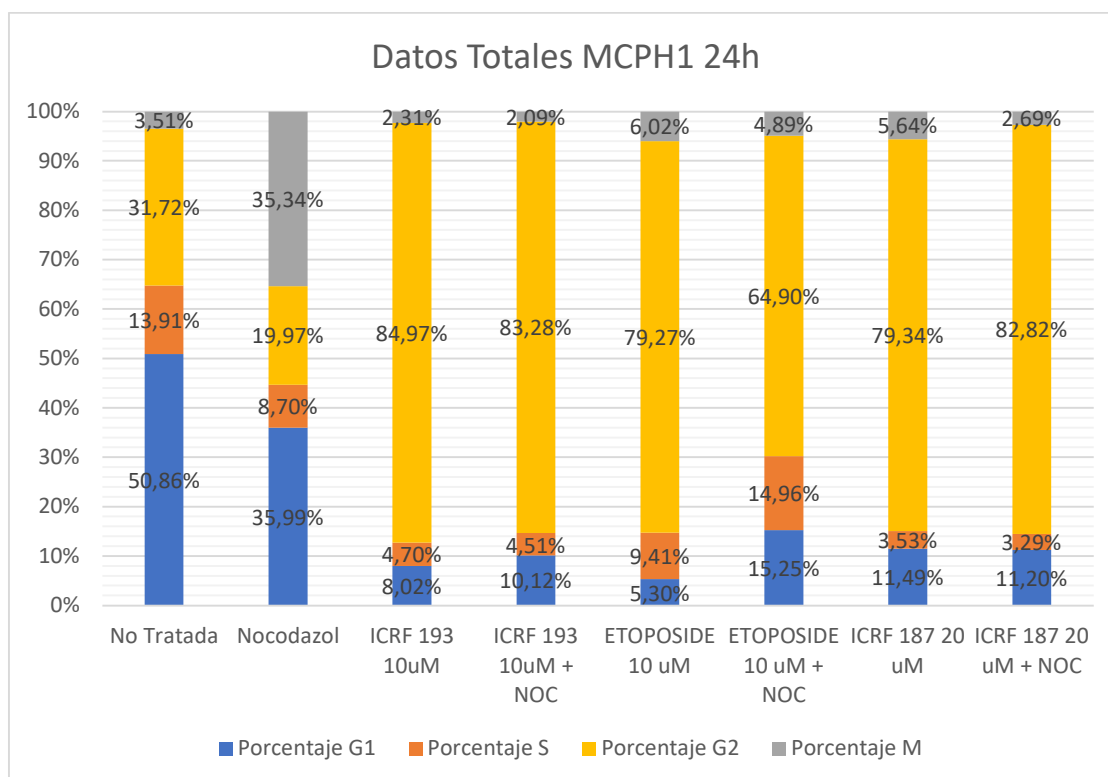


Figura 12: Gráfica con los datos de todas las células en cada una de las fases del ciclo celular para RPE-1 MCPH1 -/- durante la ventana temporal de 24 horas.

Si vamos uno a uno observado los tratamientos de izquierda a derecha, en WT nada más empezar ya vemos una diferencia, pues en el tratamiento sólo con Nocodazol el valor de células mitóticas es muy reducido en comparación con el primer análisis experimental y con las células sin función para MCPH1 en esta misma ventana temporal. La segunda gran diferencia que observamos es que al comparar los tratamientos entre ellos (el simple con su dual) se contempla que, en ambas líneas, no hay diferencias significativas entre sus resultados (la única excepción aparente es el caso de ICRF-187 en células WT), indicándonos que quizás a un lapso de 24 horas las células son capaces de adaptarse a los tratamientos que usamos y así poder llegar a entrar en mitosis. La tercer gran diferencia que hay es que Etopósido, el cual sabemos que provoca una gran parada en fase S, no ha provocado en el lapso de tiempo de 24 horas dicha parada en ninguna de las dos líneas celulares, lo cual nos indicaría que quizás este tiempo es más que suficiente para que las células se adapten del todo a su parada en fase S y continúen hasta la fase G2, donde ahora dicha parada sería temporal. Para concluir, el tratamiento de ICRF-187 en células WT no es significativo, pues no ocurre una parada significativa de células en fase G2.

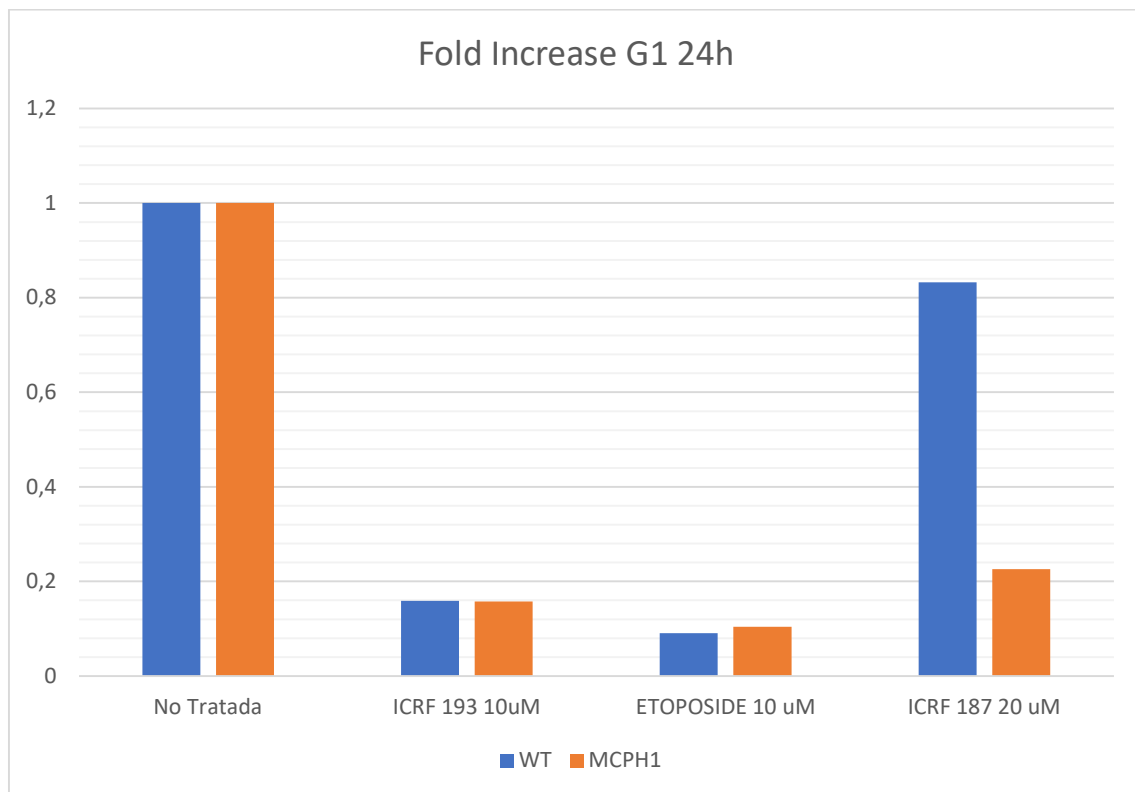


Figura 13: Gráfica con los valores de células sin Nocodazol en fase G1, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) durante la ventana temporal de 24 horas.

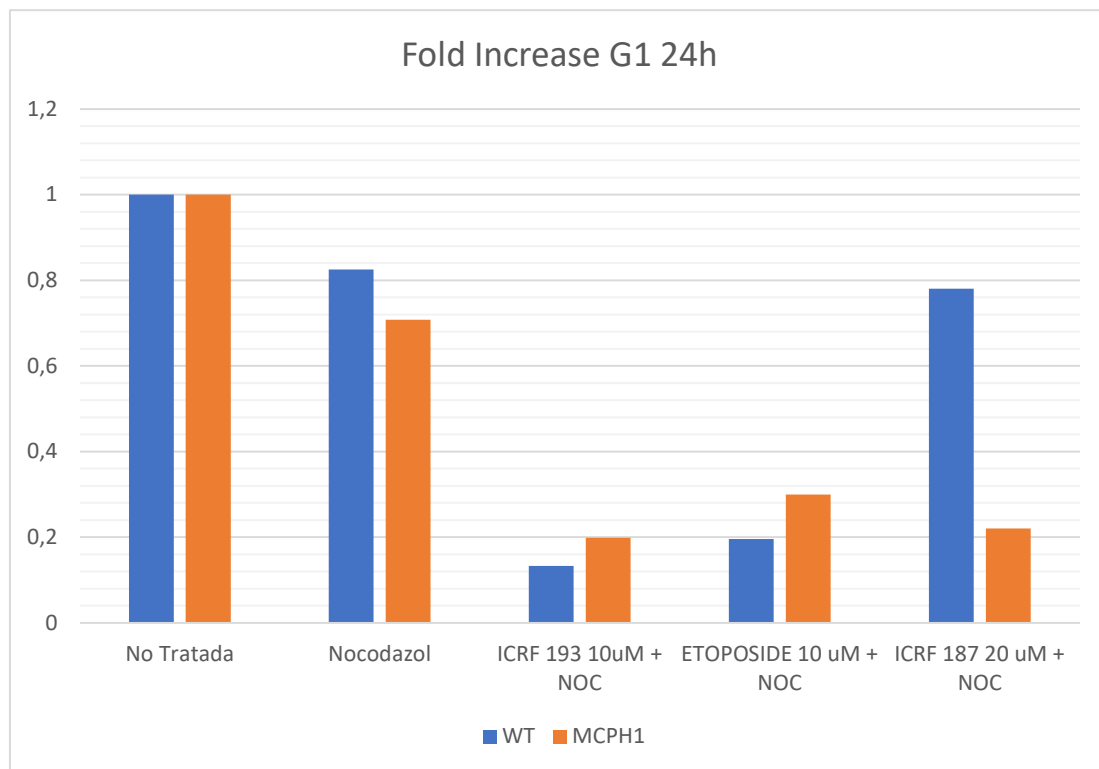


Figura 14: Gráfica con los valores de células con Nocodazol en fase G1, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) durante la ventana temporal de 24 horas.

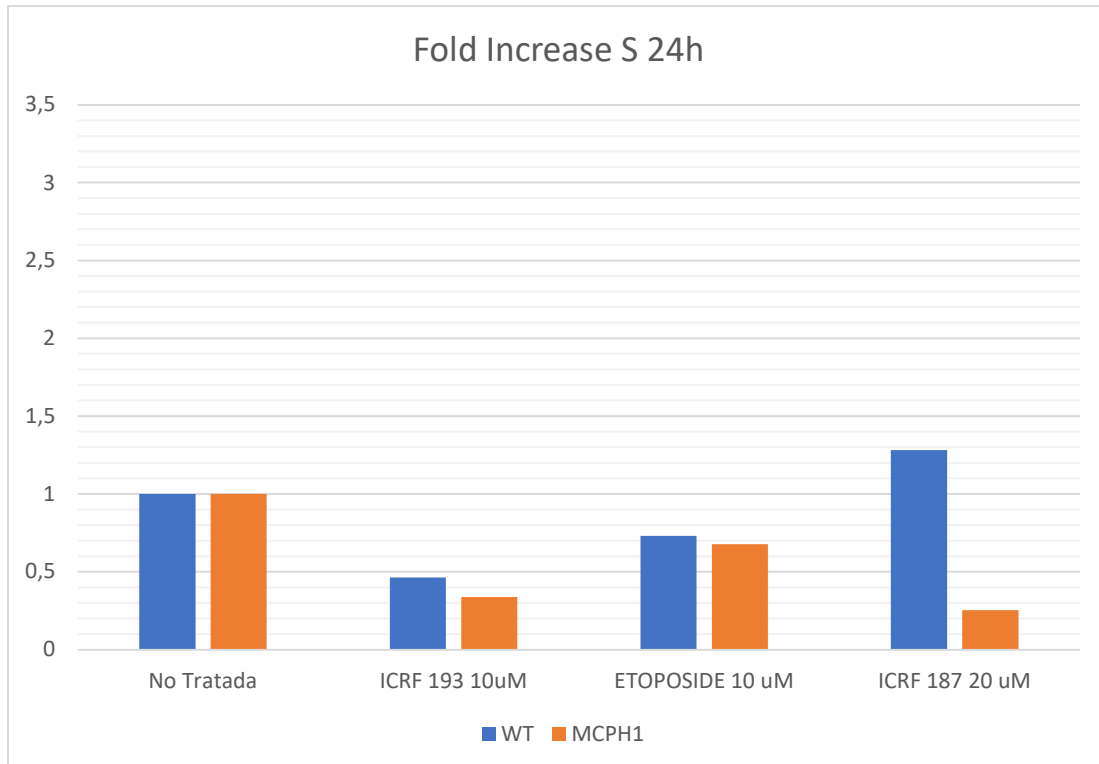


Figura 15: Gráfica con los valores de células sin Nocodazol en fase S, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) durante la ventana temporal de 24 horas.

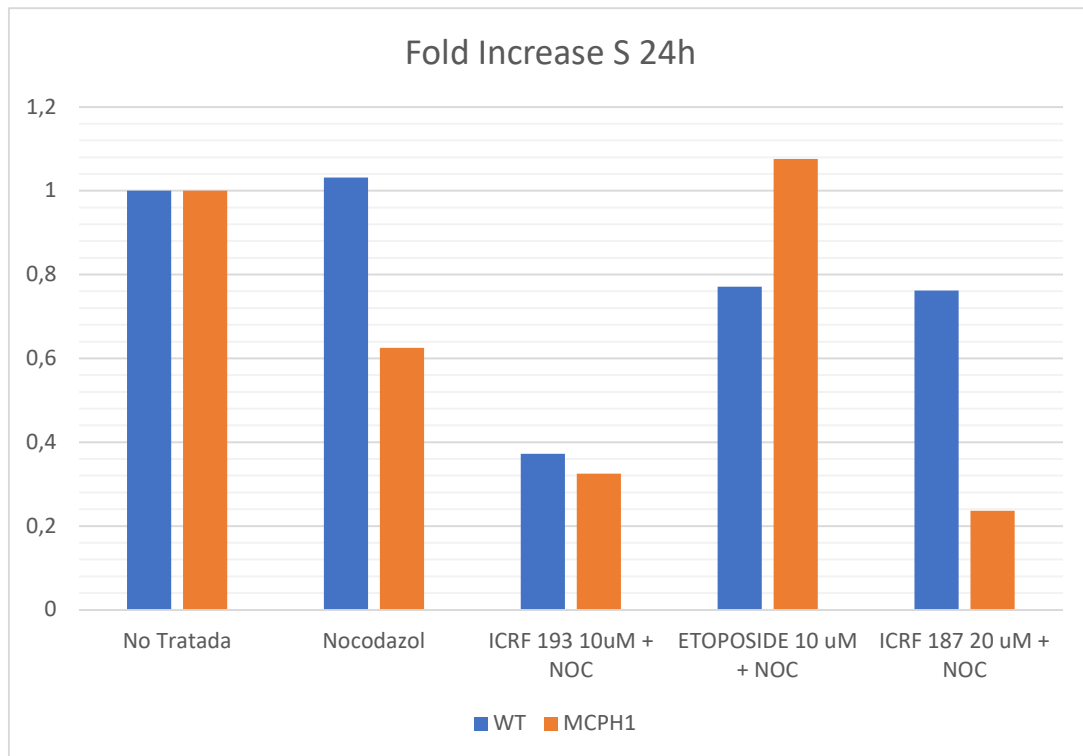


Figura 16: Gráfica con los valores de células con Nocodazol en fase S, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) durante la ventana temporal de 24 horas.

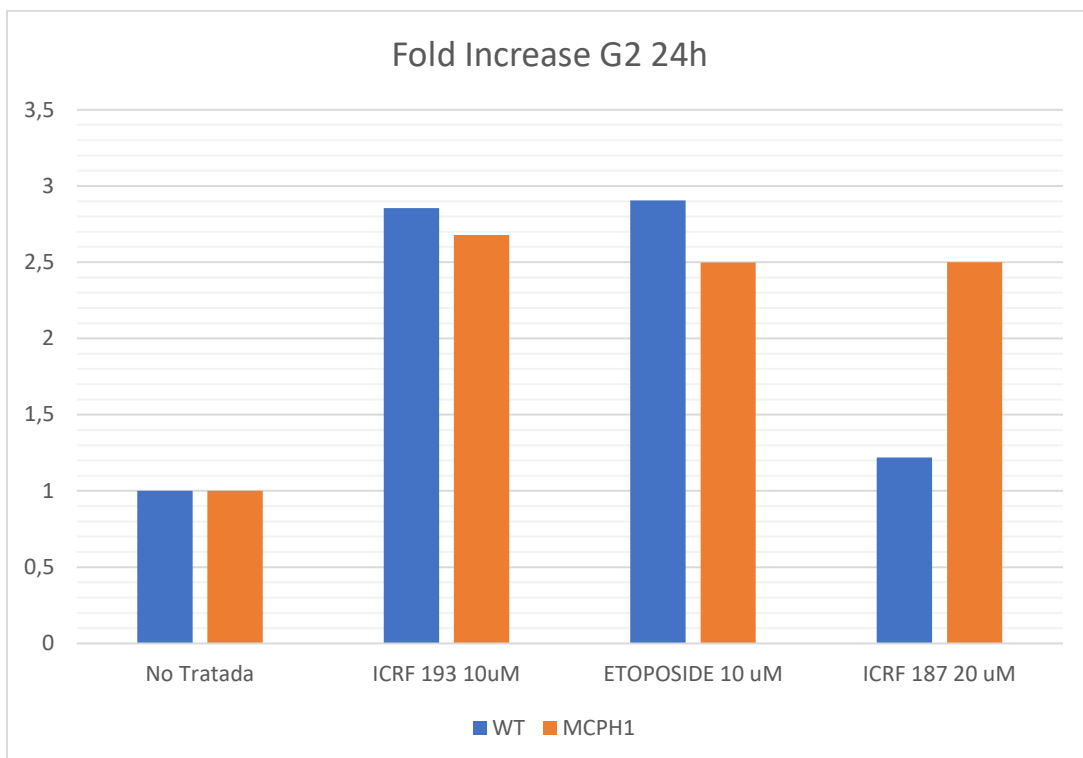


Figura 17: Gráfica con los valores de células sin Nocodazol en fase G2, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) durante la ventana temporal de 24 horas.

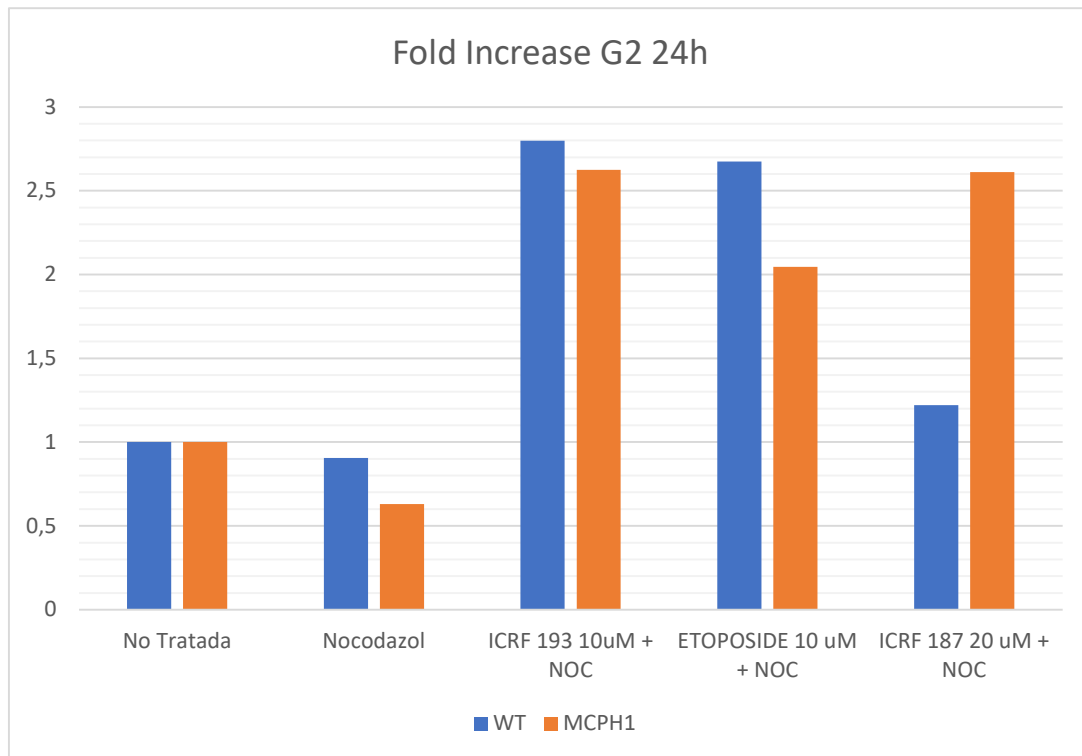


Figura 18: Gráfica con los valores de células con Nocodazol en fase G2, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) durante la ventana temporal de 24 horas.

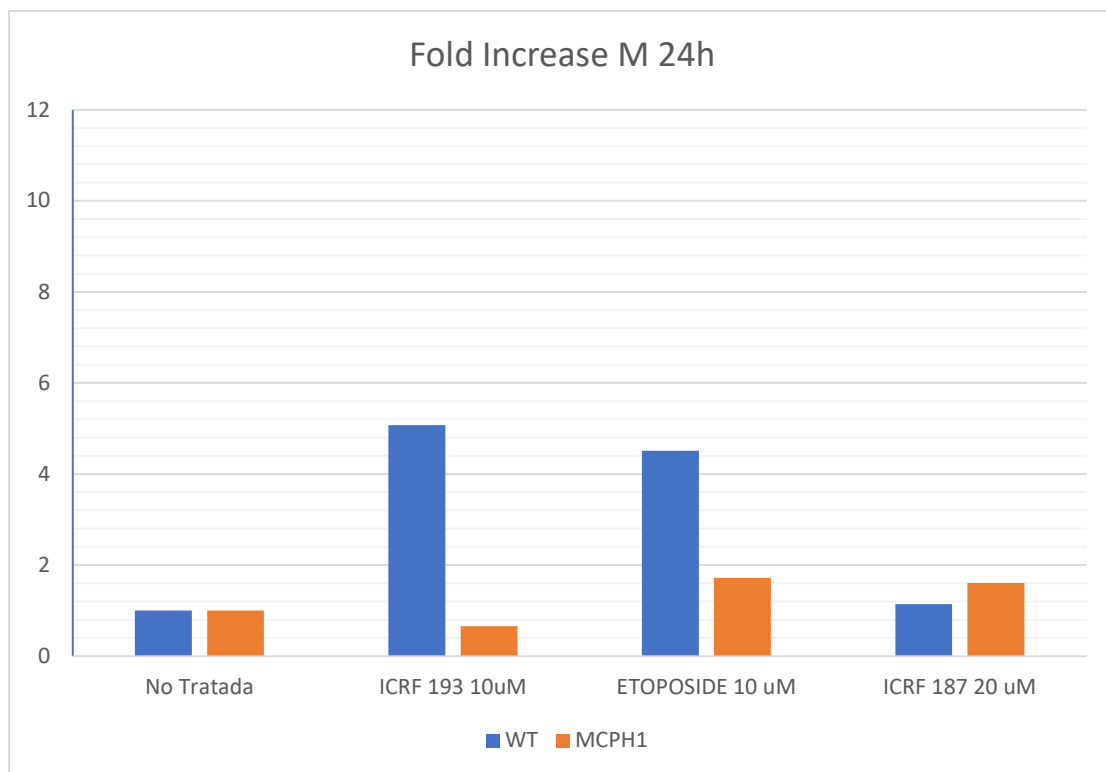


Figura 19: Gráfica con los valores de células sin Nocodazol en fase M, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) durante la ventana temporal de 24 horas.

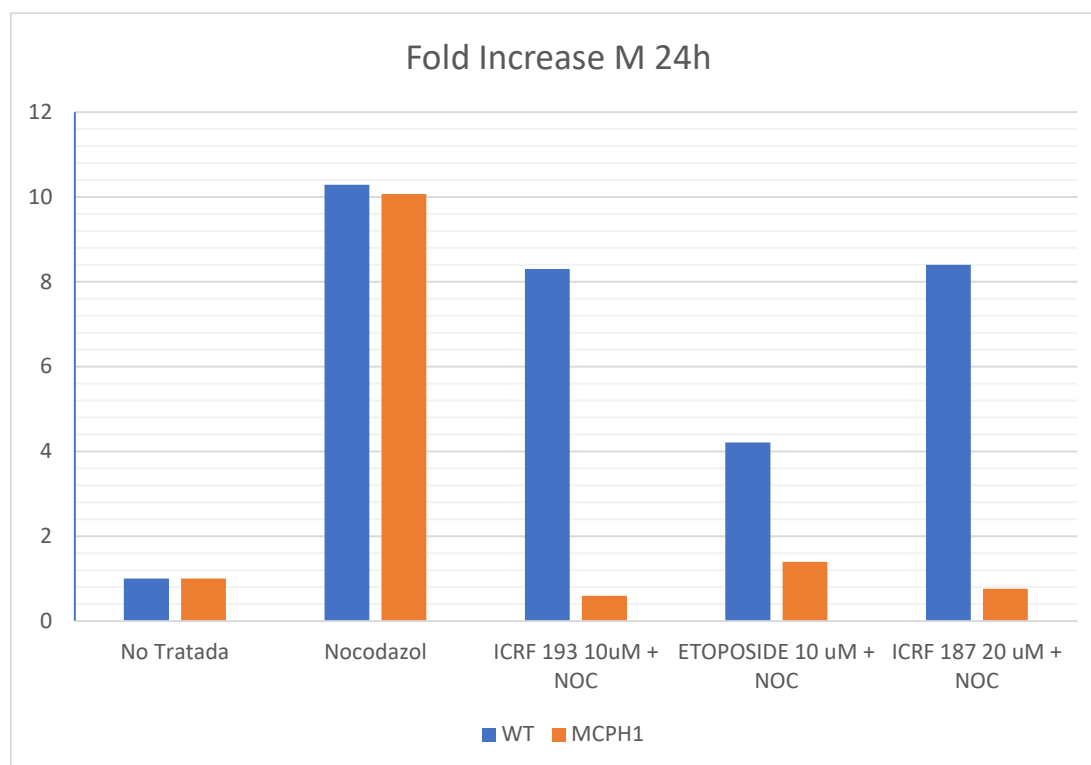


Figura 20: Gráfica con los valores de células con Nocodazol en fase M, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) durante la ventana temporal de 24 horas.

3.- Resultados 3

En este último análisis experimental sirvió para replicar el experimento 2 realizado previamente y determinar si los datos obtenidos eran reproducibles. De nuevo los resultados se muestran de la misma forma, primeramente tenemos dos gráficas (Figuras 21 y 22) con todos los datos celulares para los diferentes tratamientos usados: Datos Totales WT 24 horas (células RPE-1 WT) y Datos Totales MCPH1 24 horas (células RPE-1 MCPH1 -/-); después (Figuras 23-26) se encuentran las gráficas Fold Increase G1, Fold Increase S, Fold Increase G2 y Fold Increase M, mostrando a su vez los mismos resultados pero como aumento proporcional para las diferentes fases del ciclo celular respecto a un valor de referencia 1, el cual ha sido seleccionado para la muestra no tratada.

En este último análisis para el estudio de la alteración del ciclo celular se volvieron a repetir los mismos fármacos inhibidores de Topoisomerasa II que en el segundo análisis, con la diferencia de que esta vez debido a los resultados obtenidos se decidió no usar ICRF-187. El motivo de este análisis, como ya se ha dicho, es intentar repetir el segundo ensayo, con el fin de asegurarse que los resultados son reproducibles y no se cometió ningún error importante durante la realización de ellos.

Para esta réplica de la temporal de 24 horas, en condiciones sin tratar el perfil del ciclo celular obtenido es el esperado, tanto para WT como MCPH1. En ambos casos, la mayoría de células se encuentra en fase G1 con un 66,5% para WT y 62,5% en el caso de MCPH1, la fracción de células en fase S es del 11% en ambas líneas, G2 de 21% WT y 24,5% MCPH1 y M de un 1% también en ambas líneas.

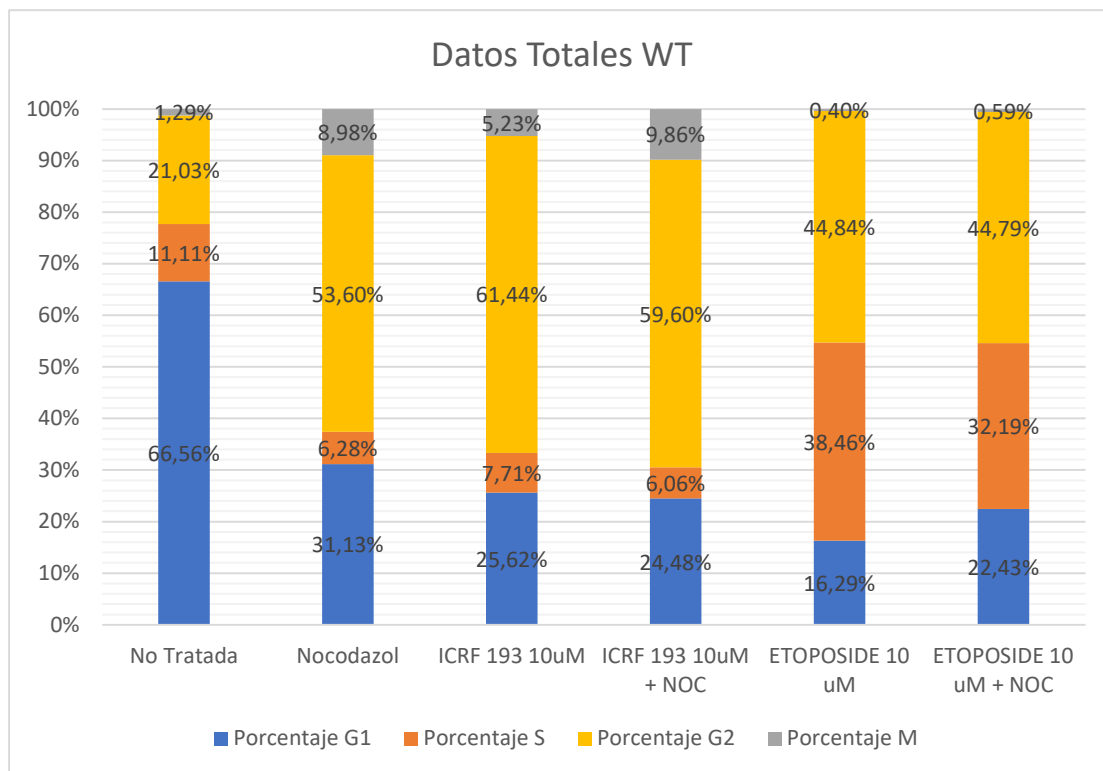


Figura 21: Gráfica con los datos de todas las células en cada una de las fases del ciclo celular para RPE-1 Wild Type como réplica de la ventana temporal de 24 horas.

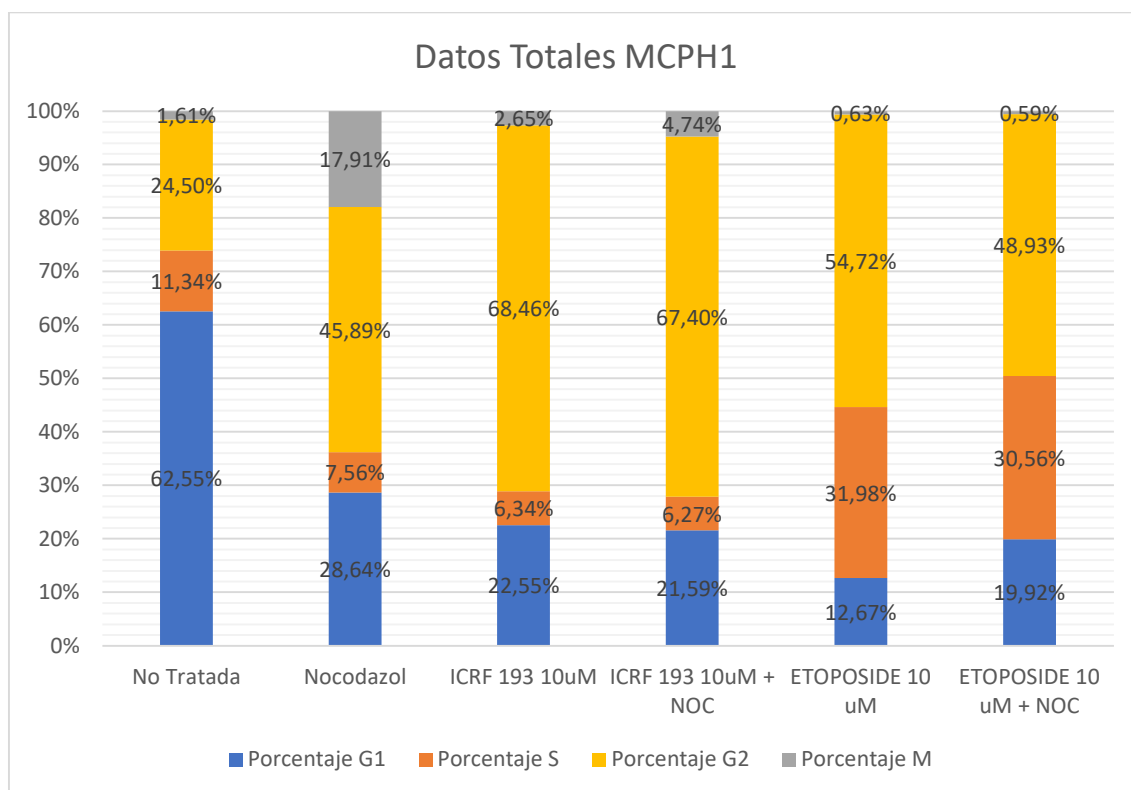


Figura 22: Gráfica con los datos de todas las células en cada una de las fases del ciclo celular para RPE-1 MCPH1 -/- como réplica de la ventana temporal de 24 horas.

En este tercer análisis vemos que los resultados son parcialmente diferentes a los del segundo análisis experimental y más cercanos a lo esperado a priori según los datos observados a 12 horas. La principal diferencia la contemplamos en Etopósido, donde ahora sí está presente la parada en fase S que habíamos observado en el primer análisis; además, vemos que esta vez tampoco entran las células en división, quedando en parada permanente en fase G2. En el caso del tratamiento con ICRF-193 los resultados, aunque puedan parecer a primera vista similares con los del segundo análisis experimental, sus valores difieren pues esta vez vemos que no hay tantas células paradas en fase G2 y también hay un mayor número de células en G1; este resultado nos indicaría que la parada, supuestamente temporal en el segundo análisis experimental era total, pues aunque hubiese células mitóticas, el bajo número de células en G1 en comparación con esta réplica nos indica lo contrario. En resumen, este tercer análisis a 24 horas al darnos resultados algo diferentes y más acordes a lo observado a 12 horas, nos indicaría que el segundo análisis experimental podría haber sufrido algún inconveniente durante el desarrollo del mismo, de manera que los datos del mismo son menos fiables.

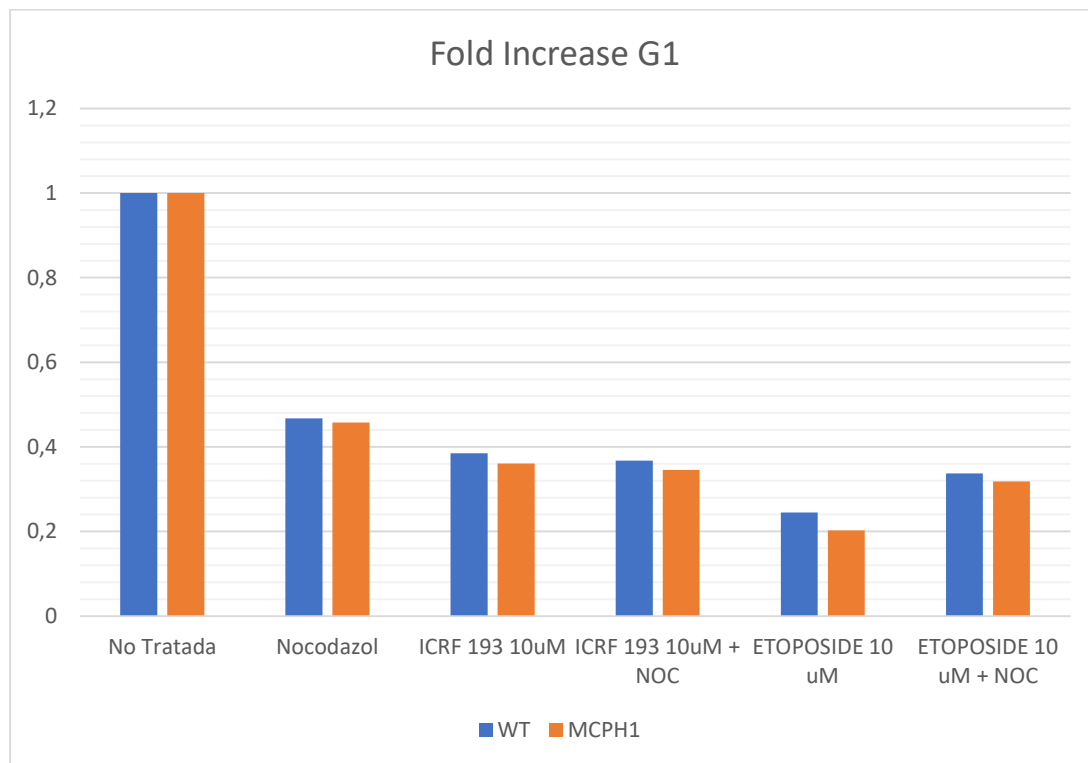


Figura 23: Gráfica con los valores de células con y sin Nocodazol en fase G1, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) como réplica de la ventana temporal de 24 horas.

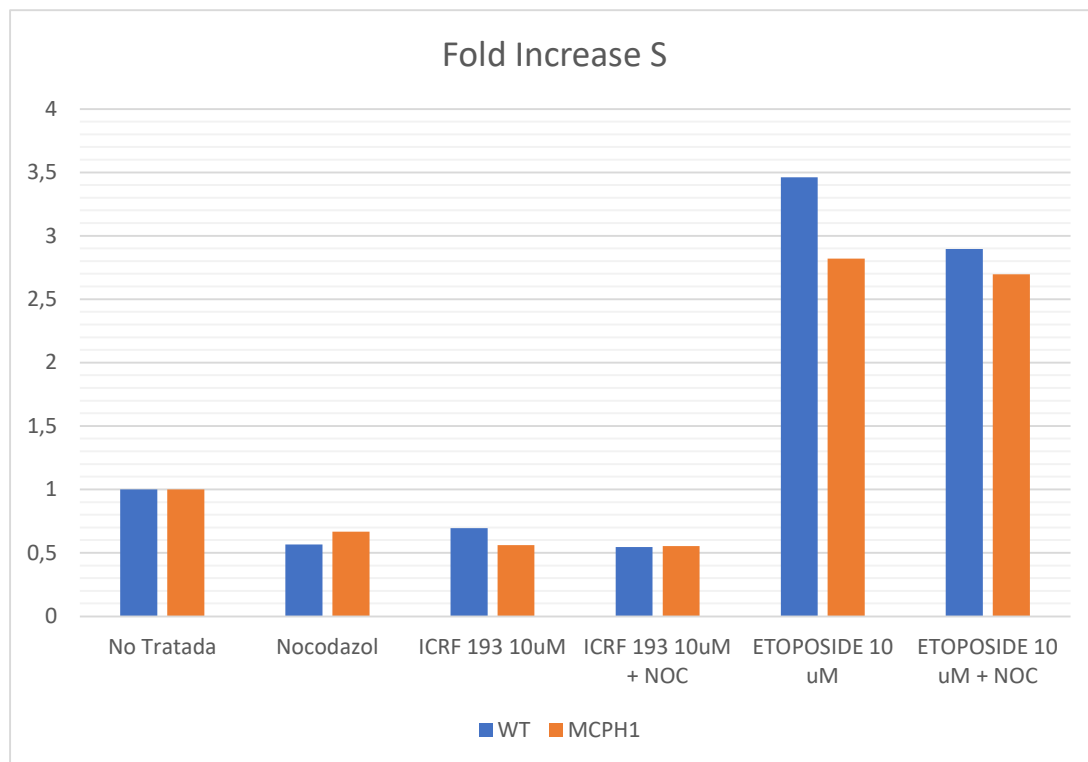


Figura 24: Gráfica con los valores de células con y sin Nocodazol en fase S, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) como réplica de la ventana temporal de 24 horas.



Figura 25: Gráfica con los valores de células con y sin Nocodazol en fase G2, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) como réplica de la ventana temporal de 24 horas.

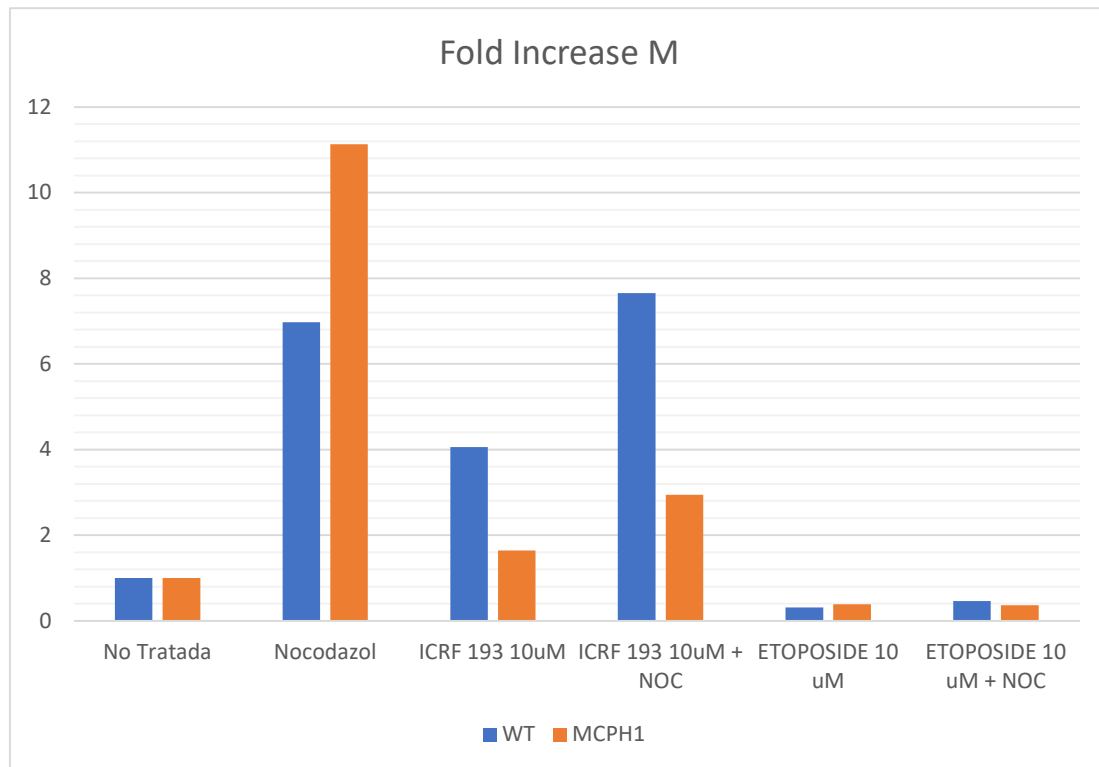


Figura 26: Gráfica con los valores de células con y sin Nocodazol en fase M, para ambas líneas celulares, como aumento proporcional respecto a 1 (seleccionado para la muestra No Tratada) como réplica de la ventana temporal de 24 horas.

Discusión:

Estudios previos del grupo de investigación en el que he desarrollado este TFG había mostrado en otros modelos celulares que la falta de función del gen MCPH1 altera el funcionamiento del Decatenation Checkpoint. En concreto, en células HeLa transfectadas con siRNAs frente a este gen, o bien en células linfoblastoides procedentes de pacientes MCPH1, se observaba que la incubación con ICRF-193 inducía una parada permanente del ciclo celular en fase G2 (Arroyo *et al.* 2019; Arroyo *et al.* 2020). Además, ésta parada no se eliminaba si se inhibía el efector de este punto de control, ATR, mediante incubación con cafeína.

Los resultados obtenidos en este TFG indican que en un modelo celular RPE1, el cual contiene una mutación en su genoma en el gen MCPH1 de falta de función inducida por Crispr-CAS9, la dinámica del ciclo celular responde de manera similar. Previamente, se había demostrado que en este modelo celular se observaban las alteraciones de la mitosis característica de la falta de función de este gen, como son: incremento de la fracción de células con condensación cromosómica prematura (Trimborn *et al.* 2004; Arroyo *et al.* 2015) y retraso en el alineamiento cromosómico durante prometafase (Arroyo *et al.* 2017). Por tanto, era de interés verificar de manera experimental si el funcionamiento del Decatenation Checkpoint estaba también alterado en las células RPE $-/-$, dado que este modelo celular es de gran interés para los proyectos de investigación futuros del grupo de investigación.

El principal resultado obtenido es que la incubación prolongada con ICRF tanto a 12 como a 24 horas induce una parada permanente del ciclo celular en fase G2, en células RPE-1 sin función para el gen MCPH1. En células WT, en cambio, ésta parada es temporal y pasado cierto tiempo las células tienen capacidad de entrar en división mitótica. Este proceso se denomina adaptación al punto de control, que indica la capacidad para reanudar el ciclo y progresar hasta la siguiente fase a pesar de que el daño (inhibición de Topoisomerasa II) sigue presente y no se ha reparado (*Andreassen et al., 2003*). El gen MCPH1 es fundamental para conferir esa capacidad de adaptación a este punto de control. Esta actividad parece estar mediada por la interacción funcional con las quinasas CHK1 y PLK1 (Arroyo et al. 2020).

Sin embargo, cuando se empleó otro inhibidor de Topoisomerasa II, Etopósido, los resultados fueron similares para células WT y MCPH1. El mecanismo de acción de Etopósido e ICRF es bastante diferente, a pesar de que ambos son inhibidores de Topoisomerasa II (*Hande, 2008; Damelin & Bestor, 2007; Luo et al., 2009*).

La incubación prolongada con Etopósido durante 12 horas, tanto en células RPE-1 WT y RPE-1 sin función para el gen MCPH1, produce una parada del ciclo celular en fase S, haciendo de tal forma que sean incapaces de entrar en división mitótica. El segundo análisis nos dice que ésta parada es temporal, pues células consiguen pasar a la fase G2 y detener nuevamente el ciclo; otro factor es que pasado ese tiempo algunas células (tanto RPE-1 WT y RPE-1 sin función para MCPH1) son capaces de entrar en división mitótica. El principal problema viene con los resultados del tercer análisis, pues este nos indica que la parada que ocurre a las 12 horas se mantiene con el paso del tiempo tanto en RPE-1 WT y RPE-1 sin función para MCPH1, pero este aumento del tiempo permite a las células ser capaces de adaptarse para poder avanzar y detenerse en la fase G2 sin llegar a entrar en división mitótica.

La incubación prolongada con Etopósido durante 12 horas, tanto en células RPE-1 WT y RPE-1 sin función para el gen MCPH1, produce una parada del ciclo celular en fase S, haciendo de tal forma que sean incapaces de entrar en división mitótica. En relación con nuestros análisis, hay cierta incongruencia entre los obtenidos en el análisis experimental 2 y 3, ambos a 24 horas, para este tratamiento. A priori, tiene más lógica pensar que la interrupción de la síntesis de ADN se mantiene de manera prolongada, que sería lo observado en el análisis 3. Es por ello que le damos más validez a dicho análisis, si bien se debería volver a repetir para confirmar este punto. Además de una parada en fase S, también se observa que conforme avanza el tiempo se observa un incremento en la fracción de células retenidas en la fase G2. Lo que es relevante es que los resultados obtenidos indican que la respuesta celular a la presencia de roturas de cadena doble en el ADN no difiere en células WT y MCPH1 -/-. En ambos casos, se ha observado que las células tienen problemas durante la replicación del ADN, y que además se detienen en G2 como respuesta a la presencia de dicho daño, sin llegar a entrar en mitosis. Estos resultados son similares a los observados previamente en otros modelos celulares (Arroyo et al. 2019).

Conclusiones:

- Las células RPE1 WT se detienen de modo temporal en fase G2 del ciclo celular en respuesta a la incubación prolongada con ICRF, un inhibidor catalítico de Topoisomerasa II. Pasado cierto tiempo, dichas células tienen capacidad de evadir el punto de control que se active en este caso, “Decatenation Checkpoint”, y comienzan a entrar en mitosis.
- Las células RPE-1 con mutaciones de falta de función en el gen MCPH1 se detienen de modo permanente en fase G2 del ciclo celular en respuesta a la incubación prolongada con ICRF. A diferencia de las células WT, este arresto es permanente y no son capaces de entrar en mitosis durante todo el tiempo de incubación. Estos resultados son similares a los observados previamente en otros tipos celulares.
- Las células RPE WT y MCPH1-/- muestran una respuesta similar a la incubación con el inhibidor de Topoisomerasa II Etopósido. En ambos casos, la replicación del ADN se ve interferida y se observa una acumulación de células en dicho punto del ciclo celular. Además, también hay una acumulación progresiva en fase G2 pero no se observa un incremento de la fracción de células en mitosis, lo que sugiere que el punto de control en G2 que se activa provoca una parada permanente robusta.
- Los resultados del análisis experimental 2 pueden estar distorsionados debido a alguna incorrección durante el procedimiento experimental.

Bibliografía:

1. Andreassen, P. R., Lohez, O. D., & Margolis, R. (2003). G2 and spindle assembly checkpoint adaptation, and tetraploidy arrest: Implications for intrinsic and chemically induced genomic instability. *Mutation Research: Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*, 532(1-2), 245-253. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.08.020>
2. Arroyo, M. G., Cañuelo, A., Calahorra, J., Hastert, F. D., Sánchez, A. G., Clarke, D. J., & Marchal, J. A. (2020). Mitotic entry upon Topo II catalytic inhibition is controlled by Chk1 and Plk1. *FEBS Journal*, 287(22), 4933-4951. <https://doi.org/10.1111/febs.15280>
3. Arroyo, M. P. M., Kuriyama, R., Trimborn, M., Keifenheim, D., Cañuelo, A., Sánchez, A. M., Clarke, D. R., & Marchal, J. A. (2017). MCPH1, mutated in primary microcephaly, is required for efficient chromosome alignment during mitosis. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12793-7>
4. Arroyo, M. G., Kuriyama, R., Guerrero, I., Keifenheim, D., Cañuelo, A., Calahorra, J., Sánchez, A. G., Clarke, D. J., & Marchal, J. A. (2019). MCPH1 is essential for cellular adaptation to the G2 -phase decatenation checkpoint. *The FASEB Journal*, 33(7), 8363-8374. <https://doi.org/10.1096/fj.201802009rr>
5. Arroyo, M. P. M., Trimborn, M., Sánchez, A. M., Hirano, T., Neitzel, H., & Marchal, J. (2015). Chromosome structure deficiencies in MCPH1 syndrome. *Chromosoma*, 124(4), 491-501. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0512-2>
6. Baird, C. L., Harkins, T. T., Morris, S., & Lindsley, J. E. (1999). Topoisomerase II drives DNA transport by hydrolyzing one ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13685-13690. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13685>
7. Baldwin, E. L., & Osheroff, N. (2005). Etoposide, Topoisomerase II and Cancer. *Bentham Science Publishers*, 5(4), 363-372. <https://doi.org/10.2174/1568011054222364>
8. Berger, J. M. (1998a). Type II DNA topoisomerases. *Current Opinion in Structural Biology*, 8(1), 26-32. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(98\)80006-7](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(98)80006-7)
9. Berger, J. M. (1998b). Structure of DNA topoisomerases. *Biochimica et biophysica acta (N)*, 1400(1-3), 3-18. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(98\)00124-9](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(98)00124-9)
10. Berger, J. M., Gamblin, S. J., Harrison, S. C., & Wang, J. Z. (1996). Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature*, 379(6562), 225-232. <https://doi.org/10.1038/379225a0>
11. Bettencourt-Dias, M., Hildebrandt, F., Pellman, D., Woods, C. G., & Godinho, S. A. (2011). Centrosomes and cilia in human disease. *Trends in Genetics*, 27(8), 307-315. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.05.004>
12. Bollimpelli, V. S., Dholaniya, P. S., & Kondapi, A. K. (2017). Topoisomerase II β and its role in different biological contexts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 633, 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.06.021>
13. Bond, J., & Woods, C. J. (2006). Cytoskeletal genes regulating brain size. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(1), 95-101. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.11.004>

14. Burden, D. A., & Osheroff, N. (1998). Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica et biophysica acta (N)*, 1400(1-3), 139-154. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(98\)00132-8](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(98)00132-8)
15. Chaplet, M., Rai, R., Jackson-Bernitsas, D., Li, K., & Lin, S. Y. (2006). BRIT1/MCPH1: A Guardian of Genome and an Enemy of Tumors. *Cell Cycle*, 5(22), 2579-2583. <https://doi.org/10.4161/cc.5.22.3471>
16. Damelin, M., & Bestor, T. H. (2007). The decatenation checkpoint. *British Journal of Cancer*, 96(2), 201-205. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603537>
17. Darvish, H., Nieh, S. E., Monajemi, G. B., Mohseni, M., Ghasemi-Firouzabadi, S., Abedini, S. S., Bahman, I., Jamali, P., Azimi, S., Mojahedi, F., Dehghan, A., Shafeghati, Y., Jankhah, A., Falah, M., Banavandi, M. J. S., Ghani-Kakhi, M., Garshasbi, M., Rakhshani, F., Naghavi, A., . . . Najmabadi, H. (2010). A clinical and molecular genetic study of 112 Iranian families with primary microcephaly. *Journal of Medical Genetics*, 47(12), 823-828. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.076398>
18. Deming, P. B., Cistulli, C. A., Zhao, H., Graves, P. R., Piwnica-Worms, H., Paules, R. S., Downes, C. P., & Kaufmann, W. K. (2001). The human decatenation checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(21), 12044-12049. <https://doi.org/10.1073/pnas.221430898>
19. Deming, P. B., Flores, K. G., Downes, C. P., Paules, R. S., & Kaufmann, W. K. (2002). ATR Enforces the Topoisomerase II-dependent G2 Checkpoint through Inhibition of Plk1 Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(39), 36832-36838. <https://doi.org/10.1074/jbc.m206109200>
20. Downes, C. P., Clarke, D. J., Mullinger, A. M., Giménez-Abián, J. F., Creighton, A., & Johnson, R. E. (1994). A topoisomerase II-dependent G2 cycle checkpoint in mammalian cells. *Nature*, 372(6505), 467-470. <https://doi.org/10.1038/372467a0>
21. Evans, P. D. (2004). Reconstructing the evolutionary history of microcephalin, a gene controlling human brain size. *Human Molecular Genetics*, 13(11), 1139-1145. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh126>
22. Evans, P. J., Gilbert, S. M., Mekel-Bobrov, N., Vallender, E. J., Anderson, J. L., Vaez-Azizi, L. M., Tishkoff, S. A., Hudson, R., & Lahn, B. T. (2005). *Microcephalin*, a Gene Regulating Brain Size, Continues to Evolve Adaptively in Humans. *Science*, 309(5741), 1717-1720. <https://doi.org/10.1126/science.1113722>
23. Farooq, M., Baig, S. M., Tommerup, N., & Kjaer, K. W. (2010). Craniosynostosis-microcephaly with chromosomal breakage and other abnormalities is caused by a truncating MCPH1 mutation and is allelic to premature chromosomal condensation syndrome and primary autosomal recessive microcephaly type 1. *American Journal of Medical Genetics*, 152A(2), 495-497. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33234>
24. Fortune, J. E., & Osheroff, N. (2000). Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: When enzymes stop being nice. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (pp. 221-253). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(00\)64006-0](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(00)64006-0)
25. Franchitto, A., Oshima, J., & Pichierri, P. (2003). The G2-phase Decatenation Checkpoint Is Defective in Werner Syndrome Cells^{1, 2}. *American Association for Cancer Research*.

26. Garshasbi, M., Motazacker, M. M., Kahrizi, K., Behjati, F., Abedini, S. S., Nieh, S. E., Firouzabadi, S. G., Becker, C., Rüschemdorf, F., Nürnberg, P., Tzschach, A., Vazifehmand, R., Erdogan, F., Ullmann, R., Lenzner, S., Kuss, A. W., Ropers, H., & Najmabadi, H. (2006). SNP array-based homozygosity mapping reveals MCPH1 deletion in family with autosomal recessive mental retardation and mild microcephaly. *Human Genetics*, 118(6), 708-715. <https://doi.org/10.1007/s00439-005-0104-y>
27. Ghani-Kakhki, M., Robinson, P. A., Morlot, S., Mitter, D., Trimborn, M., Albrecht, B., Varon, R., Sperling, K., & Neitzel, H. (2012). Two Missense Mutations in the Primary Autosomal Recessive Microcephaly Gene MCPH1 Disrupt the Function of the Highly Conserved N-Terminal BRCT Domain of Microcephalin. *Molecular Syndromology*, 3(1), 6-13. <https://doi.org/10.1159/000338975>
28. Gilmore, E. C., & Walsh, C. T. (2013). Genetic causes of microcephaly and lessons for neuronal development. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Developmental Biology*, 2(4), 461-478. <https://doi.org/10.1002/wdev.89>
29. Giménez-Abián, J. F., Clarke, D. R., Devlin, J. P., Giménez-Abián, M. I., De La Torre, C., Johnson, R. E., Mullinger, A. M., & Downes, C. P. (2000). Premitotic chromosome individualization in mammalian cells depends on topoisomerase II activity. *Chromosoma*, 109(4), 235-244. <https://doi.org/10.1007/s004120000065>
30. Gruber, R., Zhou, Z., Sukchev, M., Joerss, T., Frappart, P. O., & Wang, Z. (2011). MCPH1 regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1–Cdc25 pathway. *Nature Cell Biology*, 13(11), 1325-1334. <https://doi.org/10.1038/ncb2342>
31. Hande, K. R. (2008). Topoisomerase II inhibitors. *Update on Cancer Therapeutics*, 3(1), 13-26. <https://doi.org/10.1016/j.uct.2008.02.001>
32. Hosseini, M., Tonekaboni, S. A. M., Papari, E., Bahman, I., Behjati, F., Kahrizi, K., & Najmabadi, H. (2012). A novel mutation in MCPH1 gene in an Iranian family with primary microcephaly. *PubMed*, 62(11), 1244-1247. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23866422>
33. Hussain, M. M., Bakhtiar, S. M., Farooq, M., Anjum, I., Janzen, E., Toliat, M. R., Eiberg, H., Kjaer, K. W., Tommerup, N., Noegel, A. A., Nürnberg, P., Baig, S. M., & Hansen, L. K. (2013). Genetic heterogeneity in Pakistani microcephaly families. *Clinical Genetics*, 83(5), 446-451. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2012.01932.x>
34. Israels, E. D., & Israels, L. G. (2000). The Cell Cycle. *Oncologist*, 5(6), 510-513. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-6-510>
35. Jackson, A., Eastwood, H., Bell, S., Adu, J., Toomes, C., Carr, I. M., Roberts, E., Hampshire, D. J., Crow, Y. J., Mighell, A. J., Karbani, G., Jafri, H., Rashid, Y., Mueller, R. P., Markham, A. F., & Woods, C. W. (2002). Identification of Microcephalin, a Protein Implicated in Determining the Size of the Human Brain. *American Journal of Human Genetics*, 71(1), 136-142. <https://doi.org/10.1086/341283>
36. Jackson, A., McHale, D., Campbell, D. K., Jafri, H., Rashid, Y., Mannan, J., Karbani, G., Corry, P. M., Levene, M. I., Mueller, R. P., Markham, A. F., Lench, N., & Woods, C. J. (1998). Primary Autosomal Recessive Microcephaly (MCPH1)

- Maps to Chromosome 8p22-pter. *American Journal of Human Genetics*, 63(2), 541-546. <https://doi.org/10.1086/301966>
37. Jeffers, L. J., Coull, B. J., Stack, S. J., & Morrison, C. (2008). Distinct BRCT domains in Mcph1/Brit1 mediate ionizing radiation-induced focus formation and centrosomal localization. *Oncogene*, 27(1), 139-144. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210595>
 38. Jenkins, J. M., Ayton, P. M., Jones, T. A., Davies, S. C., Simmons, D., Harris, A. L., Sheer, D., & Hickson, I. D. (1992). Isolation of cDNA clones encoding the β isozyme of human DNA topoisomerase II and localisation of the gene to chromosome 3p24. *Nucleic Acids Research*, 20(21), 5587-5592. <https://doi.org/10.1093/nar/20.21.5587>
 39. Kaindl, A. M. (2014). Autosomal recessive primary microcephalies (MCPH). *European Journal of Paediatric Neurology*, 18(4), 547-548. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2014.03.010>
 40. Kaindl, A. M., Passemard, S., Kumar, P., Kraemer, N., Issa, L., Zwirner, A., Gérard, B., Verloes, A., Mani, S., & Gressens, P. (2010). Many roads lead to primary autosomal recessive microcephaly. *Progress in Neurobiology*, 90(3), 363-383. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.11.002>
 41. Leung, J. W., Leitch, A., Wood, J. R., Shaw-Smith, C., Metcalfe, K., Bicknell, L. S., Jackson, A., & Chen, J. (2011). SET Nuclear Oncogene Associates with Microcephalin/MCPH1 and Regulates Chromosome Condensation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21393-21400. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.208793>
 42. Liang, Y., Gao, H., Lin, S. Y., Peng, G., Huang, X., Zhang, P., Goss, J. A., Brunicardi, F. C., Multani, A. S., Chang, S., & Li, K. (2010). BRIT1/MCPH1 Is Essential for Mitotic and Meiotic Recombination DNA Repair and Maintaining Genomic Stability in Mice. *PLOS Genetics*, 6(1), e1000826. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000826>
 43. Lin, S. Y., Rai, R., Li, K., Xu, Z., & Elledge, S. J. (2005). BRIT1/MCPH1 is a DNA damage responsive protein that regulates the Brca1-Chk1 pathway, implicating checkpoint dysfunction in microcephaly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(42), 15105-15109. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507722102>
 44. Lindsley, J. E., & Wang, J. Z. (1991). Proteolysis patterns of epitopically labeled yeast DNA topoisomerase II suggest an allosteric transition in the enzyme induced by ATP binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(23), 10485-10489. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.23.10485>
 45. Liu, L., Rowe, T., Yang, L., Tewey, K. M., & Chen, G. (1983). Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II. *Journal of Biological Chemistry*, 258(24), 15365-15370. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)43815-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)43815-4)
 46. Mochida, G. H., & Walsh, C. T. (2001). Molecular genetics of human microcephaly. *Current Opinion in Neurology*, 14(2), 151-156. <https://doi.org/10.1097/00019052-200104000-00003>
 47. Molnár, Z., Kaas, J. H., De Carlos, J. A., Hevner, R. F., Lein, E. S., & Němec, P. (2014). Evolution and Development of the Mammalian Cerebral Cortex. *Brain Behavior and Evolution*, 83(2), 126-139. <https://doi.org/10.1159/000357753>

48. Neitzel, H., Neumann, L. M., Schindler, D., Wirges, A., Tönnies, H., Trimborn, M., Krebsová, A., Richter, R., & Sperling, K. (2002). Premature Chromosome Condensation in Humans Associated with Microcephaly and Mental Retardation: A Novel Autosomal Recessive Condition. *American Journal of Human Genetics*, 70(4), 1015-1022. <https://doi.org/10.1086/339518>
49. Osheroff, N. (1986). Eukaryotic topoisomerase II. Characterization of enzyme turnover. *Journal of Biological Chemistry*, 261(21), 9944-9950. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)67607-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)67607-0)
50. Osheroff, N. (1987). Role of divalent cation in topoisomerase II mediated reactions. *Biochemistry*, 26(20), 6402-6406. <https://doi.org/10.1021/bi00394a015>
51. Osheroff, N., Shelton, E. R., & Brutlag, D. L. (1983). DNA topoisomerase II from *Drosophila melanogaster*. Relaxation of supercoiled DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 258(15), 9536-9543. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)44700-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)44700-4)
52. Ouellette, E. M., Rosett, H. L., Rosman, N. P., & Weiner, L. (1977). Adverse Effects on Offspring of Maternal Alcohol Abuse during Pregnancy. *The New England Journal of Medicine*, 297(10), 528-530. <https://doi.org/10.1056/nejm197709082971003>
53. Paridaen, J. T., & Huttner, W. B. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Reports*, 15(4), 351-364. <https://doi.org/10.1002/embr.201438447>
54. Peng, G., Yim, E. K., Dai, H., Jackson, A., Van Der Burgt, I., Pan, M., Hu, R., Li, K., & Lin, S. Y. (2009). BRIT1/MCPH1 links chromatin remodelling to DNA damage response. *Nature Cell Biology*, 11(7), 865-872. <https://doi.org/10.1038/ncb1895>
55. Pfau, R., Thrush, D. L., Hamelberg, E., Bartholomew, D., Botes, S., Pastore, M., Tan, C. M., Del Gaudio, D., Gastier-Foster, J. M., & Astbury, C. (2013). MCPH1 deletion in a newborn with severe microcephaly and premature chromosome condensation. *European Journal of Medical Genetics*, 56(11), 609-613. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2013.09.007>
56. Plummer, G. S. (1952). ANOMALIES OCCURRING IN CHILDREN EXPOSED *IN UTERO* TO THE ATOMIC BOMB IN HIROSHIMA. *Pediatrics*, 10(6), 687-693. <https://doi.org/10.1542/peds.10.6.687>
57. Ponting, C. P., & Jackson, A. (2005). Evolution of primary microcephaly genes and the enlargement of primate brains. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(3), 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.04.009>
58. Pulvers, J. N., Journiac, N., Arai, Y., & Nardelli, J. (2015). MCPH1: a window into brain development and evolution. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00092>
59. Qazi, Q. H., & Reed, T. E. (2008). A problem in diagnosis of primary versus secondary microcephaly. *Clinical Genetics*, 4(1), 46-52. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1973.tb01121.x>
60. Rai, R., Dai, H., Multani, A. S., Li, K., Chin, K., Gray, J. W., Lahad, J. P., Liang, J., Mills, G. B., Meric-Bernstam, F., & Lin, S. Y. (2006). BRIT1 regulates early DNA damage response, chromosomal integrity, and cancer. *Cancer Cell*, 10(2), 145-157. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.07.002>

61. Richardson, J., Shaaban, A. M., Kamal, M., Alisary, R., Walker, C., Ellis, I. O., Speirs, V., Green, A. R., & Bell, S. (2011). Microcephalin is a new novel prognostic indicator in breast cancer associated with BRCA1 inactivation. *Breast Cancer Research and Treatment*, 127(3), 639-648. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1019-4>
62. Roca, J., Berger, J., & Wang, J. (1993). On the simultaneous binding of eukaryotic DNA topoisomerase II to a pair of double-stranded DNA helices. *Journal of Biological Chemistry*, 268(19), 14250-14255. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)85234-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)85234-1)
63. Roca, J., & Wang, J. Z. (1992). The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: A key step in DNA transport by type II DNA topoisomerases. *Cell*, 71(5), 833-840. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90558-t](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90558-t)
64. Sander, M., & Tt, H. (1983). Double strand DNA cleavage by type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 258(13), 8421-8428. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)82081-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)82081-x)
65. Singh, N., Basnet, H., Wiltshire, T., Mohammad, D. H., Thompson, J. C., Heroux, A., Botuyan, M. V., Yaffe, M. B., Couch, F. J., Rosenfeld, M. G., & Mer, G. (2012). Dual recognition of phosphoserine and phosphotyrosine in histone variant H2A.X by DNA damage response protein MCPH1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(36), 14381-14386. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212366109>
66. Singh, N., Wiltshire, T., Thompson, J. C., Mer, G., & Couch, F. J. (2012). Molecular Basis for the Association of Microcephalin (MCPH1) Protein with the Cell Division Cycle Protein 27 (Cdc27) Subunit of the Anaphase-promoting Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 287(4), 2854-2862. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.307868>
67. Spohr, H., Willms, J., & Steinhausen, H. (1993). Prenatal alcohol exposure and long-term developmental consequences. *The Lancet*, 341(8850), 907-910. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)91207-3](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)91207-3)
68. Sun, T., & Hevner, R. F. (2014). Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(4), 217-232. <https://doi.org/10.1038/nrn3707>
69. Tiwari, V. K., Burger, L., Nikolettou, V., Deogracias, R., Thakurela, S., Wirbelauer, C., Kaut, J., Terranova, R., Hoerner, L., Mielke, C., Boege, F., Murr, R., Peters, A. H., Barde, Y., & Schübeler, D. (2012). Target genes of Topoisomerase II β regulate neuronal survival and are defined by their chromatin state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16). <https://doi.org/10.1073/pnas.1119798109>
70. Trimborn, M., Bell, S., Felix, C., Rashid, Y., Jafri, H., Griffiths, P. D., Neumann, L. M., Krebs, A., Reis, A., Sperling, K., Neitzel, H., & Jackson, A. (2004). Mutations in Microcephalin Cause Aberrant Regulation of Chromosome Condensation. *American Journal of Human Genetics*, 75(2), 261-266. <https://doi.org/10.1086/422855>
71. Trimborn, M., Richter, R., Sternberg, N., Gavvovidis, I., Schindler, D., Jackson, A., Prott, E., Sperling, K., Gillissen-Kaesbach, G., & Neitzel, H. (2005). The first missense alteration in the MCPH1 gene causes autosomal recessive microcephaly with an extremely mild cellular and clinical phenotype. *Human Mutation*, 26(5), 496. <https://doi.org/10.1002/humu.9382>

72. Trimborn, M., Schindler, D., Neitzel, H., & Hirano, T. (2006). Misregulated Chromosome Condensation in MCPH1 Primary Microcephaly is Mediated by Condensin II. *Cell Cycle*, 5(3), 322-326. <https://doi.org/10.4161/cc.5.3.2412>
73. Wang, Y., & Su, B. (2004). Molecular evolution of microcephalin, a gene determining human brain size. *Human Molecular Genetics*, 13(11), 1131-1137. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh127>
74. Watanabe, M., Tsutsui, K., Tsutsui, K., & Inoue, Y. (1994). Differential expressions of the topoisomerase II α and II β mRNAs in developing rat brain. *Neuroscience Research*, 19(1), 51-57. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(94\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0168-0102(94)90007-8)
75. Wilstermann, A. M., & Osheroff, N. (2003). Stabilization of Eukaryotic Topoisomerase II-DNA Cleavage Complexes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(3), 321-338. <https://doi.org/10.2174/1568026033452519>
76. Wood, J. L. N., Johnson, K. A., & Omori, Y. (1967). Miscellaneous. Obstetrical & Gynecological Survey, 22(5), 775-780. <https://doi.org/10.1097/00006254-196710000-00008>
77. Woods, C. J. (2004). Human microcephaly. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(1), 112-117. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.01.003>
78. Woods, C. J., Bond, J., & Enard, W. (2005). Autosomal Recessive Primary Microcephaly (MCPH): A Review of Clinical, Molecular, and Evolutionary Findings. *The American Journal of Human Genetics*, 76(5), 717-728. <https://doi.org/10.1086/429930>
79. Woods, C. J., & Parker, A. (2013). Investigating microcephaly. *Archives of Disease in Childhood*, 98(9), 707-713. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2012-302882>
80. Xu, X., Lee, J., & Stern, D. I. (2004). Microcephalin Is a DNA Damage Response Protein Involved in Regulation of CHK1 and BRCA1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(33), 34091-34094. <https://doi.org/10.1074/jbc.c400139200>
81. Yamashita, D., Shintomi, K., Ono, T., Gavvovidis, I., Schindler, D., Neitzel, H., Trimborn, M., & Hirano, T. (2011). MCPH1 regulates chromosome condensation and shaping as a composite modulator of condensin II. *Journal of Cell Biology*, 194(6), 841-854. <https://doi.org/10.1083/jcb.201106141>
82. Yang, S., Lin, F., & Lin, W. (2008). MCPH1/BRIT1 cooperates with E2F1 in the activation of checkpoint, DNA repair and apoptosis. *EMBO Reports*, 9(9), 907-915. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.128>
83. Zechiedrich, L., Christiansen, K., Andersen, A. H., Westergaard, O., & Osheroff, N. (1989). Double-stranded DNA cleavage/religation reaction of eukaryotic topoisomerase II: evidence for a nicked DNA intermediate. *Biochemistry*, 28(15), 6229-6236. <https://doi.org/10.1021/bi00441a014>
84. Zechiedrich, L., & Osheroff, N. (1990). Eukaryotic topoisomerases recognize nucleic acid topology by preferentially interacting with DNA crossovers. *The EMBO Journal*, 9(13), 4555-4562. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07908.x>
85. Zhou, Z., Tapias, A., Bruhn, C., Gruber, R., Sukchev, M., & Wang, Z. (2013). DNA damage response in microcephaly development of MCPH1 mouse model. *DNA Repair*, 12(8), 645-655. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.017>