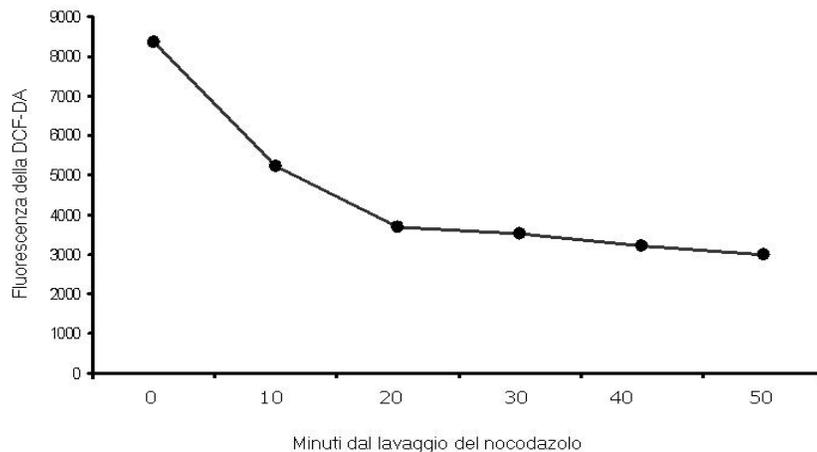


Il cancro si sviluppa spesso da cellule che sono state esposte ad insulti ambientali e/o micro-ambientali (come la luce ultravioletta o l'infiammazione cronica, ad esempio) che alterano, tra l'altro, il metabolismo dei ROS. Nostri dati preliminari suggeriscono che variazioni nella concentrazione intracellulare dei ROS regolano la progressione mitotica. Abbiamo, inoltre, di recente dimostrato che la concentrazione dei ROS influenza anche il funzionamento dello *Spindle Assembly Checkpoint*, il meccanismo che previene l'instabilità cromosomica impedendo l'uscita dalla mitosi fino a che il fuso mitotico non è correttamente assemblato. Ipotizziamo, quindi, che, in mitosi, fluttuazioni precisamente controllate della concentrazione dei ROS siano necessarie per il corretto assemblaggio del fuso mitotico e che uno sregolato metabolismo dei ROS possa contribuire alla trasformazione neoplastica non solo danneggiando importanti componenti cellulari, quali DNA, lipidi e proteine, ma anche alterando la segregazione cromosomica.

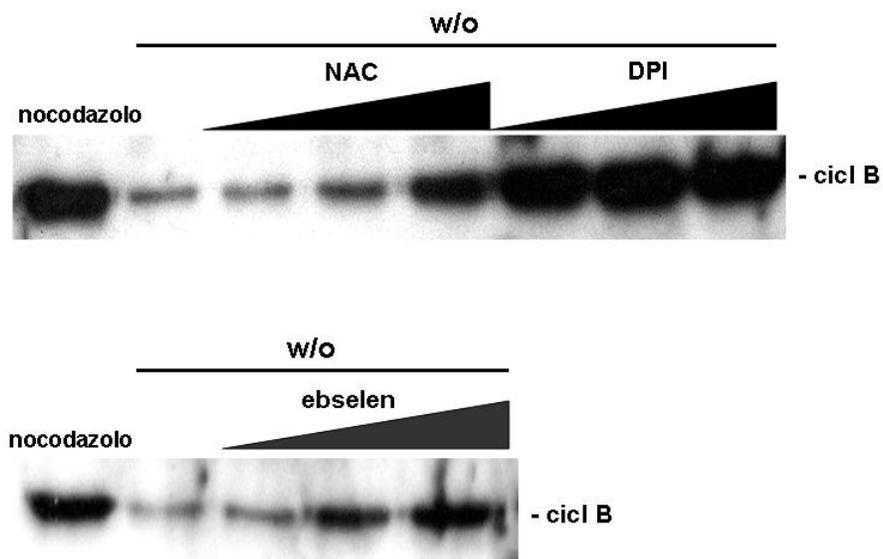
L'obiettivo del mio soggiorno presso il laboratorio del dott. Gadina ai National Institutes of Health (NIH) è stato, quindi, quello di quantificare accuratamente le fluttuazioni della concentrazione intracellulare dei ROS durante la progressione mitotica.

Per tale scopo cellule HeLa sono state trattate per 14 ore con nocodazolo che, inibendo la polimerizzazione dei microtubuli e, quindi, l'assemblaggio del fuso mitotico, sincronizza le cellule in prometafase. Le cellule sono state, poi, lavate per rimuovere il nocodazolo e consentire loro di progredire nel ciclo cellulare. La concentrazione dei ROS nel corso della mitosi è stata determinata misurando, ogni 10 minuti, per 50 minuti, l'ossidazione della diclorofluoresceina diacetato che emette, quando ossidata, fluorescenza misurabile al FACS. Come mostrato in figura 1, l'ossidazione era massima nelle cellule arrestate in nocodazolo e cominciava a diminuire a partire da 10 minuti dalla rimozione del nocodazolo per poi raggiungere un plateau dopo circa 20 minuti. Per questo esperimento il contributo della struttura ospitante è stato di fondamentale importanza: il laboratorio del dott. Gadina ha, infatti, una facility per l'analisi al FACS dotata di citofluorimetri con la sensibilità necessaria per misurare le variazioni nella concentrazione dei ROS in mitosi che, come atteso, non sono enormi dal momento che una troppo elevata produzione di ROS danneggerebbe la cellula, inducendone l'apoptosi.

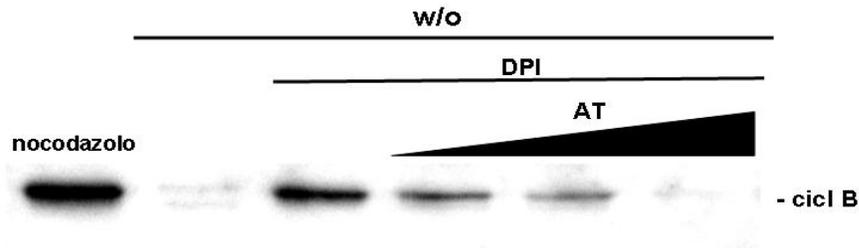


**Figura 1.** La produzione di ROS é elevata in mitosi. Cellule HeLa, trattate per 14 ore con nocodazolo, sono state rilasciate in mezzo fresco. La concentrazione dei ROS é stata determinata misurando al FACS, ogni 10 minuti, per 50 minuti, la fluorescenza emessa dall'ossidazione della diclorofluoresceina diacetato.

Inoltre, per avere un'indicazione sulla relazione causa-effetto tra l'aumento dei ROS in mitosi e la progressione della stessa, le cellule HeLa, sincronizzate in prometafase con il nocodazolo, sono state rilasciate in mezzo fresco contenente sostanze anti-ossidanti. La produzione di ROS é stata inibita o aggiugendo difenilene iodonio (DPI, un potente inibitore delle NADPH-ossidasi e degli enzimi contenenti flavo-gruppi) o aumentando la capacità di scavenging delle cellule con Ebselen (un potente mimetico della glutatione riduttasi) o con N-acetil-cisteina (NAC, un precursore del riducente glutatione). L'uscita dalla mitosi é stata monitorata seguendo, mediante western blot, la degradazione della ciclina B1. Come mostrato in figura 2, tutte e tre le sostanze anti-ossidanti bloccavano la degradazione di ciclina B1 in maniera dose-dipendente. Inoltre, come mostrato in figura 3, il blocco in mitosi causato dal DPI era revertito dall'aminotriazolo (AT), una sostanza che aumenta la concentrazione dei ROS inibendo la catalasi, l'enzima che catalizza la conversione del perossido di idrogeno in acqua ed ossigeno.



**Figura 2.** Sostanze anti-ossidanti bloccano l'uscita dalla mitosi. Cellule HeLa sono state trattate per 14 ore con nocodazolo. Parte delle cellule sono state poi rilasciate in mezzo fresco (w/o: wash-out) con l'aggiunta o meno di dosi crescenti di NAC, DPI o Ebselen. Le cellule sono state quindi lisate e i livelli di ciclina B sono stati analizzati mediante western blot.



**Figura 3.** Il blocco dell'uscita dalla mitosi indotto dal DPI é revertito dall'AT. Cellule HeLa sono state trattate per 14 ore con nocodazolo. Parte delle cellule sono state poi rilasciate in mezzo fresco (w/o: wash-out) con l'aggiunta o meno di DPI. A parte delle cellule trattate con DPI sono state aggiunte anche dosi crescenti di AT. Le cellule sono state quindi lisate e i livelli di ciclina B sono stati analizzati mediante western blot.

In conclusione, quindi, gli esperimenti condotti durante il soggiorno presso il laboratorio del dott. Gadina hanno permesso di quantizzare precisamente le fluttuazioni della concentrazione intracellulare dei ROS durante la mitosi. Inoltre, l'uso di sostanze ossidanti o riducenti ha permesso di dimostrare come in cellule HeLa queste fluttuazioni siano necessarie per la degradazione della ciclina B1 e, quindi, per l'uscita dalla mitosi. A questo punto, verificheremo se le variazioni nella concentrazione dei ROS influenzino l'assemblaggio del fuso mitotico con esperimenti di microscopia in cellule HeLa trattate con gli stessi agenti ossidanti e riducenti utilizzati negli esperimenti mostrati nelle figure 2 e 3. A tale scopo, nel laboratorio del dott. Gadina abbiamo già fatto degli esperimenti preliminari per ottimizzare le condizioni necessarie per determinare in immunofluorescenza la concentrazione dei ROS, limitando il più possibile il forte background emesso dai reagenti utilizzati per farlo, in modo tale da poter verificare, prima di procedere con gli esperimenti, che le sostanze ossidanti o riducenti stiano effettivamente funzionando come atteso.