

La perdita di integrità del centrosoma durante la mitosi porta alla formazione di fusi multipolari, i quali impediscono una corretta segregazione cromosomica. Il mantenimento di un centrosoma integro è dipendente dal bilancio tra forze che agiscono al centrosoma che si oppongono a forze generate ai cinetocori; tuttavia, la natura molecolare di questo importante bilancio di forze è ancora sconosciuta.

Il mio laboratorio ha precedentemente dimostrato che l'espressione esogena in cellule di mammifero della proteina cinetica Hec1 fusa all'estremità N-terminale (la regione della proteina che media l'interazione con i microtubuli) con il peptide EGFP (EGFP-Hec1) induce fusi multipolari che abbiamo ipotizzato possano derivare da interazioni più stabili tra microtubuli e cinetocori. Tali interazioni potrebbero incrementare le forze che si generano al cinetocore e portare alla rottura del centrosoma. All'opposto, l'espressione di una proteina Hec1 (Hec1-EGFP) con l'EGFP associato al C-terminale (la regione che media l'interazione con gli altri complessi proteici del cinetocore) non modifica il processo mitotico (Mattiuzzo et al., 2011).

Con l'intento di chiarire meglio i meccanismi alla base dell'insorgenza della multipolarità, ho utilizzato metodologie di microscopia avanzata disponibili nel laboratorio portoghese per misurare la stabilità degli attacchi tra microtubuli e cinetocori in condizioni di espressione di EGFP-Hec1 o Hec1-EGFP in cellule *in vivo*. Utilizzando metodi di transfezione transiente con un vettore che esprime una tubulina foto-convertibile (mEOS-tubulin) in grado di cambiare la lunghezza d'onda di emissione dallo spettro del verde al rosso a seguito di illuminazione con raggi UV, ho potuto attivare nel rosso una regione del fuso. L'alta risoluzione e velocità di lavoro delle strumentazioni di acquisizione delle immagini, insieme all'alta qualità delle ottiche del microscopio hanno permesso di effettuare esperimenti di live imaging di cellule attivate con intervalli molto brevi di acquisizione (ogni 15 secondi) e acquisizione di 5 piani sull'asse z per ogni tempo per la ricostruzione tridimensionale dell'immagine.

In tali esperimenti, il movimento verso il centrosoma della regione rossa sul fuso nel tempo fornisce una misura del flusso dei microtubuli, un processo che riflette l'inserimento di monomeri di tubulina all'estremità + dei microtubuli (cinetocore) e l'eliminazione di altri monomeri all'estremità - (centrosoma) (Mitchison, 1989). Nello stesso tipo di esperimenti, la diminuzione della fluorescenza rossa nel tempo fornisce una misura del turn-over di subunità di tubulina al cinetocore. Il decadimento nel tempo dell'intensità della fluorescenza nella regione fotoattivata segue una curva esponenziale doppia con una popolazione a decadimento lento che corrisponde a microtubuli associati ai cinetocori e una popolazione veloce, rappresentata da microtubuli non cinetocorici. Il tempo medio di decadimento nella popolazione di microtubuli a decadimento lento misura la stabilità degli attacchi tra microtubuli e cinetocori in quanto dipende dal tasso al quale microtubuli attaccati sono rilasciati dal cinetocore (Wandke et al., 2012).

I risultati di tali esperimenti hanno mostrato che l'espressione di EGFP-Hec1 diminuisce significativamente la velocità del flusso microtubulare a paragone dell'espressione di Hec1-EGFP ($0,55 \pm 0,14$ vs. $0,83 \pm 0,16$ $\mu\text{m}/\text{minuto}$, media di 2 esperimenti \pm SEM, t-test: $P < 0,001$). Il tempo di dimezzamento ($t/2$) dell'intensità della fluorescenza rossa è anche risultato significativamente più lungo in cellule che esprimono EGFP-Hec1 rispetto a cellule che esprimono Hec1-EGFP sia per quanto riguarda i microtubuli legati al cinetocori ($t/2 = 339,97 \pm 63,81$ vs. $196,73 \pm 20,41$ secondi, media di due esperimenti \pm SEM, t-test: $P < 0,05$) che per i microtubuli non cinetocorici ($16,09 \pm 0,95$ vs. $10,62 \pm 1,52$ secondi, media di due esperimenti \pm SEM, t-test: $P < 0,01$).

Questi risultati dimostrano che l'espressione di Hec1 legata all'estremità N-terminale a EGFP media una interazione del cinetocore con il microtubulo che risulta più stabile rispetto all'espressione della proteina modificata all'estremità C-terminale. Tale risultato dimostra che la frammentazione del centrosoma in condizioni di espressione di EGFP-Hec1 dipende da una stabilizzazione degli attacchi tra centrosomi e cinetocori che incrementa le forze mediate da proteine motrici nella direzione dal centrosoma al fuso. Tali forze frammentano il centrosoma.

Questo risultato riveste una potenziale importanza nel campo della terapia molecolare del cancro, in quanto la segregazione dei cromosomi di cellule tumorali in un fuso multipolare genera

cellule geneticamente aberranti che sono eliminate dalla popolazione per apoptosi. Risultati del nostro laboratorio, sostenuti anche dai risultati ottenuti in collaborazione col laboratorio portoghese, ci hanno portato a proporre l'induzione di fusi mutipolari come una strategia antitumorale (Orticello et al., manoscritto in preparazione)

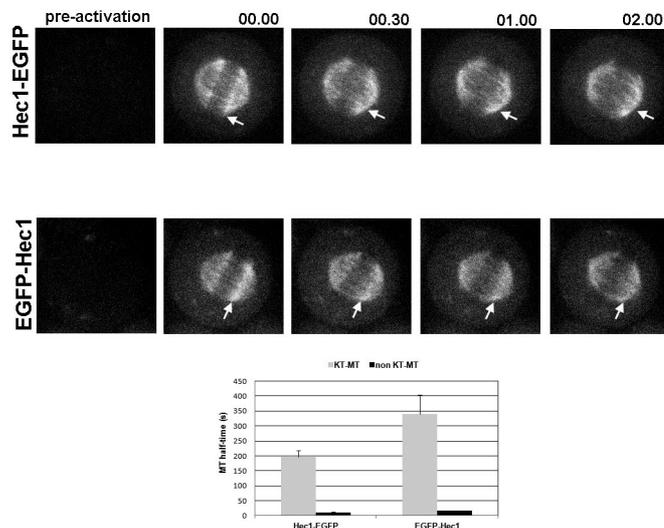


Figura 1. Analisi della fluorescenza rossa sul fuso mitotico di cellule che esprimono Hec1-EGFP o EGFP-Hec1 nei 2 minuti dall'attivazione. Le frecce identificano il movimento della barra di fluorescenza. Nel grafico sono riportati i valori del tempo medio di dimezzamento per i microtubuli cinetocorici e non cinetocorici.

Bibliografia

Mattiuzzo M, Vargiu G, Totta P, Fiore M, Ciferri C, Musacchio and Degrassi F. (2011) Abnormal Kinetochores-Generated Pulling Forces from Expressing a N-Terminally Modified Hec1 PlosOne, e16307. doi: 10.1371/journal.pone.0016307

Mitchison, T.J. (1989). Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: Evidence from photoactivation of fluorescence. *J. Cell Biol.* 109, 637–652.

Orticello M, Fiore M, Totta P, Desideri M, Passeri D, Lenzi J, Barisic M, Rosa A, Orlandi A, Maiato H, Del Bufalo D, Degrassi F (2013) Expression of a modified Hec1 protein suppresses tumor cell growth in vitro and in vivo, in preparation .

Wandke C, Barisic M, Sigl R, Rauch V, Wolf F, Amaro AC, Tan CH, Pereira AJ, Kutay U, Maiato H, Meraldi P, Geley (2012) Human chromokinesins promote chromosome congression and spindle microtubule dynamics during mitosis. *J Cell Biol* 198: 847–863.