

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

ISTITUTO BIOLOGIA E PATOLOGIA MOLECOLARI DEL CNR DI ROMA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE
XXI CICLO

**IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI GENI CHE
CONTROLLANO IL MOVIMENTO DEI CROMOSOMI
NELLA MITOSI DI *DROSOPHILA MELANOGASTER***

(BIO/18)

Coordinatore: Prof. GIORGIO PRANTERA

Tutor: Dott. MARIA PATRIZIA SOMMA

Dottoranda: Dott. CLAUDIA PELLACANI

RIASSUNTO

La mitosi è un processo biologico complesso, che assicura nelle cellule in divisione la ripartizione uguale dell'informazione genetica nelle due cellule figlie. La corretta esecuzione della mitosi è necessaria per il normale sviluppo di organismi multicellulari e per prevenire l'insorgenza di tumori. Per questo motivo, un obiettivo molto importante della ricerca biologica attuale, è la comprensione dei meccanismi e l'identificazione dei geni/proteine coinvolti nel processo mitotico. La tecnica dell'RNA interference (RNAi) ha avuto un notevole impatto sugli studi di genomica funzionale, e sono state pubblicate numerose ricerche nelle quali questa tecnica è stata usata per assegnare funzioni a geni ignoti. Nel laboratorio dove sto svolgendo l'attività di ricerca abbiamo condotto esperimenti di RNAi su cellule in coltura S2 di *Drosophila melanogaster*, al fine di identificare geni coinvolti nella divisione cellulare. Questo lavoro ha portato all'identificazione di 155 geni mitotici, 70 dei quali non erano mai stati precedentemente implicati in questo processo. Sorprendentemente, questi studi mostrano che l'inattivazione mediante RNAi di diversi fattori di splicing provoca evidenti difetti nella segregazione dei cromosomi. Il mio lavoro di tesi è consistito nella caratterizzazione funzionale di due di questi fattori. In *Drosophila* queste proteine sono codificate dai geni *CG6876* e *CG10754*, che risultano omologhi rispettivamente ai geni *PRPF31* e *SF3A2* presenti in uomo. Le proteine PRPF31 e SF3A2 sono componenti di due snRNP ("small nuclear ribonucleoprotein") coinvolti nel processo di "splicing". Per definire il ruolo mitotico di questi fattori, ho confrontato il fenotipo ottenuto trattando le cellule in coltura S2 con dsRNA per questi geni con il fenotipo ottenuto dall'inattivazione del gene *Ndc80/Hec1*, che codifica per una componente del cinetocore in grado di interagire con i microtubuli del fuso mitotico. Queste analisi hanno rivelato che i geni *CG6876*, *CG10754* e *Ndc80/Hec1* hanno, durante la mitosi, un ruolo molto simile. Infatti sia i fattori di "splicing" che Hec1 sono richiesti per la funzione del cinetocore di formazione delle fibre cinetocoriche. In assenza di queste fibre, i fusi che si formano sono fortemente alterati ed i cromosomi non segregano correttamente. Complessivamente, questi risultati suggeriscono un ruolo inaspettato per i fattori di "splicing" nella formazione del fuso mitotico e nella segregazione cromosomica. Saranno necessari ulteriori studi per chiarire il ruolo di queste proteine nella struttura e funzione del cinetocore.

ABSTRACT

Mitosis is the evolutionarily conserved process that enables a dividing cell to equally partition its genetic material between the two daughter cells. The fidelity of mitotic division is crucial for normal development of multicellular organisms and to prevent cancer or birth defects. Understanding the molecular mechanisms of mitosis requires the identification of genes involved in this process. Previous studies have shown that such genes can be readily identified by RNA interference (RNAi) in *Drosophila* tissue culture cells. Exploiting the powers of bioinformatics and RNAi technology, our laboratory has recently performed a large screen aimed at detection of genes involved in the *Drosophila* mitotic process. This screen has led to the identification of 155 mitotic genes, 70 of which have not been previously implicated in cell division. Surprisingly, these studies showed that RNAi-mediated inactivation of several highly conserved splicing factors results in strong defects in chromosome segregation. My thesis project was focused on the functional characterization of two of these factors. They are encoded by the *CG6876* and *CG10754* *Drosophila* genes, and are highly homologous respectively to the *PRPF31* and *SF3A2* human genes. PRPF31 and SF3A2 are component of two snRNPs involved in splicing regulation. To define the mitotic role of these splicing factors I compared the phenotypes elicited by their depletion with that caused by RNAi-mediated knockout of *Ndc80/Hec1*, which encodes a kinetochore protein that is thought to interact with spindle microtubules. These analyses revealed that *CG6876*, *CG10754* and *Ndc80/Hec1* have very similar mitotic roles. Both the splicing factors and the Ndc80/Hec1 protein are required for the formation of kinetochore-driven kinetochore fibers. In the absence of these fibers spindle assembly is highly abnormal and the chromosomes fail to segregate. Collectively, these results highlight an unanticipated role of splicing factors in spindle assembly and chromosome segregation. Further studies will be required to determine the precise role of these factors in kinetochore structure and function.

INDICE

INTRODUZIONE

La divisione cellulare.....	1
La formazione del fuso mitotico.....	4
Struttura del cinetocore.....	8
Formazione del cinetocore.....	10
Funzione del cinetocore.....	12
“RNA interference”.....	17
Applicazioni dell’RNAi a studi di genetica funzionale.....	19

RISULTATI

Identificazione di nuovi geni mitotici in <i>Drosophila melanogaster</i>	25
Geni richiesti per la segregazione dei cromosomi in <i>Drosophila melanogaster</i>	26
Geni che codificano per proteine del cinetocore.....	28
Geni che codificano per fattori di “splicing”.....	29
Analisi delle caratteristiche strutturali delle proteine codificate dai geni <i>CG6876</i> e <i>CG10754</i>	38
La proteina codificata dal gene <i>CG6876</i> di <i>Drosophila melanogaster</i>	39
La proteina codificata dal gene <i>CG10754</i> di <i>Drosophila melanogaster</i>	41
Produzione di anticorpi contro le proteine PRPF31-like e SF3A2-like di <i>Drosophila melanogaster</i>	42
Analisi delle interazioni delle proteine PRPF31-like e SF3A2-like.....	44
Analisi della localizzazione intracellulare delle proteine PRPF31-like e SF3A2-like	45
Analisi della localizzazione intracellulare delle proteine PRPF31-like e SF3A2-like <i>in vivo</i>	47
Studio del ruolo delle proteine PRPF31-like e SF3A2-like nella formazione del fuso mitotico.....	48

DISCUSSIONE

Efficienza dell’RNAi per l’identificazione di geni mitotici.....	52
Geni che controllano il movimento dei cromosomi nella mitosi.....	52
La reazione di “splicing” e la formazione dello “spliceosoma”.....	54

Possibili funzioni di molecole di RNA in mitosi.....	57
--	----

MATERIALI E METODI

Colture cellulari e trattamento con dsRNA.....	60
Produzione di dsRNA.....	60
Elettroforesi.....	61
Procedure citologiche.....	61
Trasfezione cellule S2.....	62
Espressione e purificazione delle proteine.....	62
Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE).....	63
Western Blot.....	64
Purificazione anticorpi.....	64
Esperimenti di immunoprecipitazione (co-IP).....	64

BIBLIOGRAFIA	66
---------------------------	----

RINGRAZIAMENTI	74
-----------------------------	----

INTRODUZIONE

La divisione cellulare

La divisione cellulare, o mitosi, è un insieme di processi che avvengono nella cellula madre e che assicurano la ripartizione uguale dell'informazione genetica nelle due cellule figlie.

Per dare origine a due cellule geneticamente identiche è necessario che il DNA di ogni cromosoma della cellula madre si replichi fedelmente e che i cromosomi duplicati si distribuiscano equamente tra le due cellule figlie, in modo che ciascuna entri in possesso di una copia dell'intero genoma. L'errato funzionamento dell'apparato mitotico può produrre cellule aneuploidi, che possono innescare processi di carcinogenesi (Mitchison and Salmon, 2001). Per questo un obiettivo molto importante della ricerca biologica attuale è la comprensione dei meccanismi e l'identificazione dei geni/proteine coinvolti nel processo mitotico.

La mitosi è una sequenza continua di eventi, ma tradizionalmente viene suddivisa in cinque stadi: la profase, la prometafase, la metafase, l'anafase e la telofase. Durante la profase la cromatina presente nel nucleo si condensa in cromosomi morfologicamente ben definiti. I cromosomi sono formati da due cromatidi fratelli, ognuno dei quali possiede una regione centromerica a cui si associa un cinetocore (una struttura proteica a cui si legano i microtubuli). Contemporaneamente alla condensazione cromosomica, i centrosomi nucleano i microtubuli da cui si formerà il fuso mitotico. Nei sistemi privi di centrosomi, quali gli oociti di mammifero e le cellule vegetali, i microtubuli vengono nucleati in prossimità dei cromosomi.

Il fuso è costituito da una serie di microtubuli formati da eterodimeri alternati di tubulina α e β strettamente uniti da legami non covalenti. Le subunità di tubulina si associano longitudinalmente a formare le pareti della cavità del microtubulo, che si presenta come un cilindro costituito da 13 protofilamenti paralleli. Ogni protofilamento ha una polarità strutturale: ad una estremità risulta sempre esposta una tubulina α e all'altra una tubulina β ; tutti i protofilamenti sono orientati ugualmente, per cui il microtubulo mantiene nel complesso la stessa polarità dei suoi elementi.

Le β tubuline sono esposte nelle estremità "più" dei microtubuli che polimerizzano velocemente, mentre le α tubuline sono esposte nelle estremità "meno" che polimerizzano più lentamente. Ogni eterodimero tubulinico contiene una molecola di una guanosina

trifosfata (GTP), che idrolizza a guanosina difosfato (GDP) poco dopo aver aggiunto una unità al microtubulo in crescita; di conseguenza la maggior parte del microtubulo è costituito da tubulina GDP, mentre le estremità contengono tubulina GTP. Tuttavia per la casualità dei processi chimici, può accadere che la tubulina finale idrolizzi il suo GTP prima che sia aggiunta la tubulina successiva, di conseguenza il microtubulo si accorcia (depolymerizzazione). Questo comportamento è noto come “instabilità dinamica”. Nella cellula esistono diverse popolazioni di microtubuli, che subiscono rapidi fenomeni di polimerizzazione (crescita) e depolymerizzazione (riduzione). La transizione da uno stato di crescita a uno di riduzione è denominato “catastrofe”, mentre la transizione da riduzione a crescita è definito “rescue” (Kline-Smith and Walczak, 2004)

Durante la mitosi, le estremità “meno” si focalizzano ai poli del fuso e le estremità “più” si dispongono verso l’equatore, determinando la formazione di un fuso bipolare, che lega i cromosomi replicati e li ripartisce tra le due future cellule figlie.

La seconda fase della mitosi, la prometafase, inizia con la frammentazione dell’involucro nucleare in tante vescicole, evento definito “nuclear envelope breakdown” (NEB). I microtubuli nucleati dai centrosomi formano una struttura a stella, denominata aster. Alcuni di questi microtubuli prendono contatto con i cinetocori dei cromatidi fratelli formando i microtubuli cinetocorici (“K-fibers”), mentre altri microtubuli vanno da un polo all’altro e sono chiamati interpolari. I microtubuli astrali ed interpolari insieme alle fibre cinetocoriche sono focalizzati ai poli e formano il fuso mitotico. Durante la prometafase le fibre cinetocoriche subiscono fenomeni di rapido allungamento e regressione che si traducono in un movimento oscillatorio dei cromosomi.

La cellula è in metafase quando ogni cromosoma è correttamente attaccato ai microtubuli provenienti dai poli opposti ed allineato all’equatore del fuso. I cromosomi sono tenuti fermi in “piastra metafasica” dalla tensione esercitata sui cinetocori fratelli dai microtubuli provenienti dai due poli del fuso. Nella maggior parte delle cellule mitotiche, un complesso meccanismo di segnalazione, noto come “spindle assembly checkpoint” (SAC), controlla l’allineamento dei cromosomi al centro della cellula e impedisce l’inizio dell’anafase fino a quando tutti i cromosomi non sono correttamente allineati in piastra (Musacchio and Salmon, 2007).

Durante l’anafase i cromatidi fratelli si separano e si muovono verso i poli opposti del fuso. I cromatidi fratelli appena separati non sono “più” denominati cromatidi, ma cromosomi (non replicati). L’anafase viene solitamente divisa in due sottofasie denominate anafase A e anafase B. Durante l’anafase A, i microtubuli associati al cinetocore si accorciano per

depolimerizzazione provocando un avvicinamento dei cromosomi ai poli. Durante l'anafase B, interazioni tra i microtubuli non cinetocorici provocano un allontanamento dei poli, contribuendo ulteriormente alla segregazione dei due gruppi cromosomici (Brust-Mascher et al., 2004). In telofase, stadio finale della mitosi, la cromatina si decondensa e si riformano la membrana nucleare ed i nucleoli che erano scomparsi durante la profase/prometafase. Contemporaneamente, i microtubuli del fuso si riorganizzano formando un grande fascio tra i due nuclei figli, denominato fuso centrale. Il fuso centrale è una struttura formata da microtubuli che si interdigitano all'equatore della cellula in divisione e mediano l'esecuzione della citochinesi. Il citoplasma si divide mediante un processo noto come "citochinesi", che inizia in tarda anafase ed è mediato da un anello contrattile contenente filamenti di actina e miosina II. Questo anello si forma all'equatore della cellula immediatamente sotto la membrana a cui rimane intimamente connesso e si orienta ad angolo retto rispetto all'asse maggiore del fuso mitotico. La contrazione dell'anello produce un infossamento nella membrana plasmatica, denominato solco citochinetico, che si stringe progressivamente provocando una profonda strozzatura al centro della cellula in divisione. Questa strozzatura si trasforma in sottile ponte citoplasmatico, il "midbody", che alla fine viene rescisso mediante un processo denominato "abscission" che porta alla definitiva separazione delle due cellule figlie (Fig. 1).

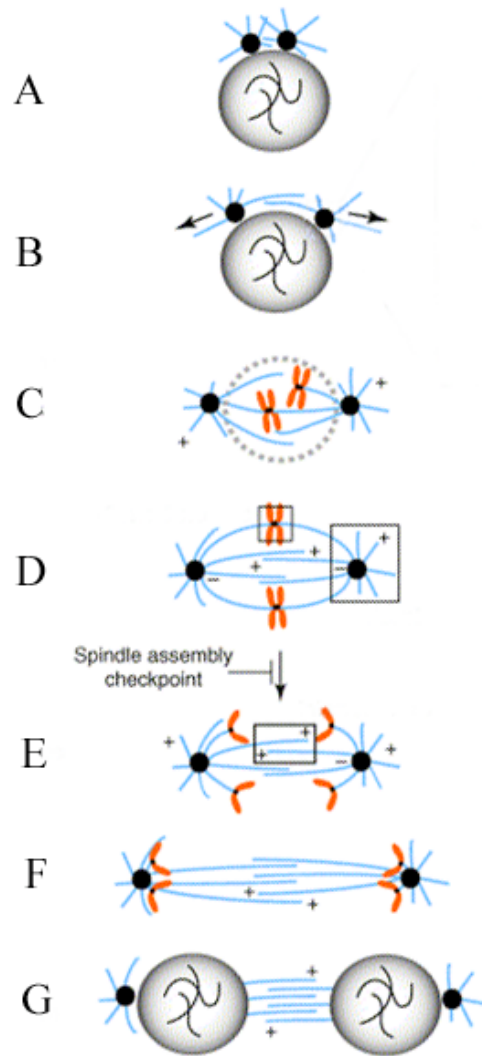


Figura 1: Schema riassuntivo dei principali eventi della mitosi: (A) Interfase, duplicazione dei centrosomi. (B) Profase, separazione dei centrosomi. (C) Prometafase, rottura dell'involucro nucleare, condensazione cromosomica, cattura dei microtubuli da parte dei cinetocori, assemblaggio del fuso bipolare. (D) Metafase, allineamento dei cromosomi in piastra metafasica. (E) Anafase A, movimento dei cromatidi fratelli verso i poli opposti della cellula, (F) Anafase B, allungamento del fuso. (G) Telofase, decondensazione della cromatina, formazione del "midbody", formazione degli involucri nucleari.

La formazione del fuso mitotico

I microtubuli che andranno a formare il fuso mitotico, si sviluppano a partire da appositi centri organizzatori, che ne controllano il numero, la posizione e l'orientamento nel citoplasma. Nella maggior parte delle cellule animali la formazione del fuso è mediata dai centrosomi. Questi organelli sono costituiti da due centrioli immersi in una matrice ricca di proteine denominata materiale pericentriolare. All'interno di questa matrice, sono presenti centinaia di strutture ad anello (denominate γ -TuRC, gamma Tubulin Ring Complex)

costituite da gamma tubulina (γ), un diverso tipo di tubulina, complessata con altre proteine: ogni anello fa da innesco, o sito di nucleazione, per la crescita di un microtubulo.

I dimeri di α e β tubulina si associano all'anello di γ tubulina in un orientamento specifico, tale che l'estremità 'meno' rimane immersa nel centrosoma e cresce solo l'estremità "più", quella rivolta verso l'esterno. Le estremità "più" di questi microtubuli sono fortemente dinamiche, infatti le subunità di tubulina vengono continuamente aggiunte o tolte, andando quindi incontro a processi di rapida crescita e riduzione, finchè non vengono catturati e stabilizzati dai cinetocori dando così inizio alla formazione di un fuso bipolare (processo noto come "search and capture") (Maiato et al., 2004).

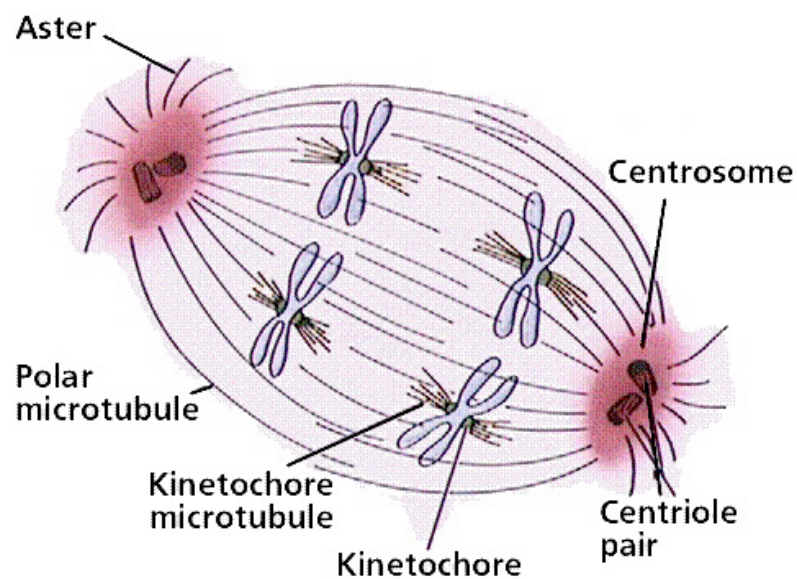


Figura 2. Il fuso mitotico in cellule somatiche animali.

Ma la nucleazione dei microtubuli non avviene soltanto a livello dei centrosomi. È stato ampiamente dimostrato che anche la cromatina è in grado di mediare la formazione di un fuso acentrosomale, cioè privo di centrosomi (Karsenti and Vernos, 2001). Infatti, è stato osservato che l'aggiunta di DNA ad estratti di uova di *Xenopus* privi di centrosomi, porta alla crescita di microtubuli intorno alla cromatina e alla successiva formazione di un fuso bipolare. La proteina capace di promuovere la nucleazione e la stabilizzazione dei microtubuli in questo sistema è Ran, una "Ras-related GTPase" che esiste in due forme, una che lega il GTP e l'altra che lega il GDP (Carazo-Salas et al., 1999). Il fattore di scambio che attiva Ran promuovendo la transizione da Ran-GDP a Ran-GTP è la proteina RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation). Poiché RCC1 è stata trovata legata alla cromatina, si pensa che

L'attività di RCC1 porti ad un aumento della concentrazione locale di Ran attiva (RanGTP) sui cromosomi così da formare un gradiente intorno alla cromatina che favorisce la crescita di microtubuli (Bastiaens et al., 2006). Ran-GTP permette il rilascio da complessi contenenti le importine alfa e beta, di fattori necessari per la nucleazione dei microtubuli e la formazione del fuso mitotico, come NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus protein) e TPX2 (Ems-McClung, 2004). In questo processo, i microtubuli nascono con orientamento casuale e successivamente vengono organizzati con le estremità 'meno' rivolte ai poli della cellula e quelle "più" al centro del fuso. Questa polarizzazione del fuso è mediata da motori molecolari, quali le dineine e le chinesine, che hanno anche il compito di legare microtubuli adiacenti e di organizzarli in fasci antiparalleli (Hirokawa et al., 1998). Infine questi microtubuli vengono focalizzati ai poli del fuso grazie all'azione di proteine che si legano all'estremità "meno" dei microtubuli come Asp e NuMA (Khodjakov et al., 2000)(Fig. 2).

La crescita di microtubuli intorno alla cromatina non è un meccanismo limitato alle cellule prive di centrosomi, quali gli oociti dei vertebrati e le cellule vegetali, ma è presente anche in cellule che normalmente contengono centrosomi. Infatti, recenti studi hanno dimostrato che, quando durante la profase, i centrosomi vengono eliminati con tecniche di microchirurgia, si organizzano fusi bipolari perfettamente funzionanti. Altri esperimenti, in cui sono state utilizzate tecniche di micromanipolazione genetica, confermano che le cellule normalmente contenenti centrosomi sono in grado di formare fusi in assenza di questi organelli. In *Drosophila* i mutanti nei geni di *asterless*, *senzaster* e *centrosomin*, che non hanno centrosomi funzionali e sono privi di asters, sono in grado di formare fusi mitotici anastrali, bipolari e perfettamente funzionanti (Bonaccorsi et al., 2000; Giansanti et al., 2001). Studi condotti su cellule di mammifero hanno mostrato che anche in questo sistema, popolazioni di microtubuli nucleati indipendentemente dal centrosoma svolgono un ruolo importante nella formazione del fuso mitotico. Un recente lavoro ha chiarito il meccanismo di nucleazione di questi microtubuli ed il loro contributo alla formazione del fuso. È stato dimostrato che in assenza di GCP-WD, la proteina umana ortologa al componente dei γ -TuRC di *Drosophila* Dgp71WD, è abolita la nucleazione dei microtubuli sia da parte dei centrosomi che dalla cromatina. Sulla base di esperimenti di ricrescita dei microtubuli dopo esposizione al freddo, è stato proposto che GCP-WD faccia parte di γ -TuRC sia associati ai centrosomi che localizzati nel citoplasma attorno ai cromosomi. I γ -TuRC vicini ai cromosomi verrebbero attivati da Ran-GTP; i microtubuli da essi nucleati sarebbero poi stabilizzati dai cinetocori e progressivamente polarizzati contribuendo così alla formazione di un fuso bipolare (Luders et al., 2006).

Complessivamente tutti i dati riportati suggeriscono che nelle cellule animali esistono almeno due vie di nucleazione dei microtubuli, quella dipendente dai centrosomi e quella mediata dai cromosomi. Un recente modello, definito “inside-out spindle formation”, integra queste due vie in un unico meccanismo di formazione del fuso mitotico (Maiato et al., 2004). Secondo questo studio, i microtubuli corti che si originano vicino alla cromatina legano i cinetocori alle loro estremità “più” mentre hanno le estremità “meno” immerse nel citoplasma. La crescita di questi microtubuli avviene a livello del cinetocore, risultando così uno spostamento delle estremità “meno” verso i poli. Intanto, i microtubuli astrali crescendo nel citoplasma, incontrano questi microtubuli cinetocorici e li catturano in modo da formare un unico fascio di microtubuli. Il fuso mitotico risulta così costituito da microtubuli originatisi in modo diverso, ma perfettamente integrati in un’unica struttura fusiforme bipolare altamente organizzata (Fig. 3).

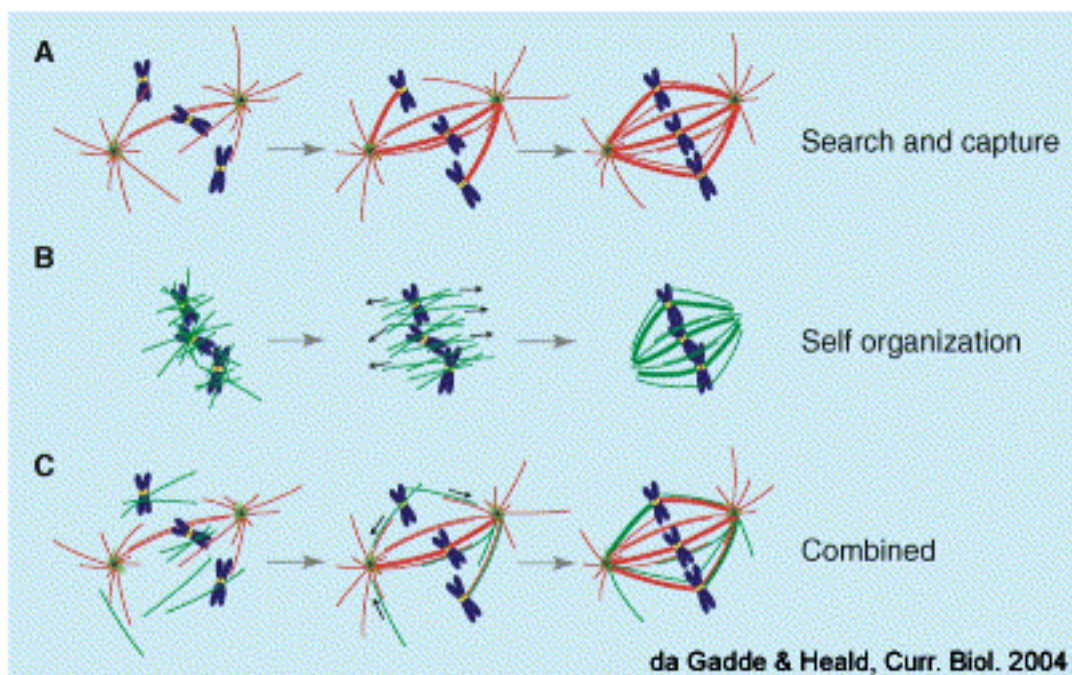


Figura 3. Modelli di formazione del fuso mitotico. (A) Modello “search and capture”: i microtubuli nucleati dai centrosomi incontrano i cromosomi, prendono contatto con i cinetocori e vengono così stabilizzati e formano il fuso; (B) Modello “self organization”: in assenza di centrosomi, i microtubuli sono nucleati vicino alla cromatina e si organizzano in una struttura bipolare grazie all’azione di proteine motore; (C) Modello integrato: i microtubuli periferici o quelli nucleati vicino alla cromatina sono catturati dai microtubuli astrali ed integrati in un’unica struttura che forma il fuso mitotico. In rosso sono disegnati i microtubuli nucleati dai centrosomi, in verde i microtubuli di diversa origine.

Struttura del cinetocore

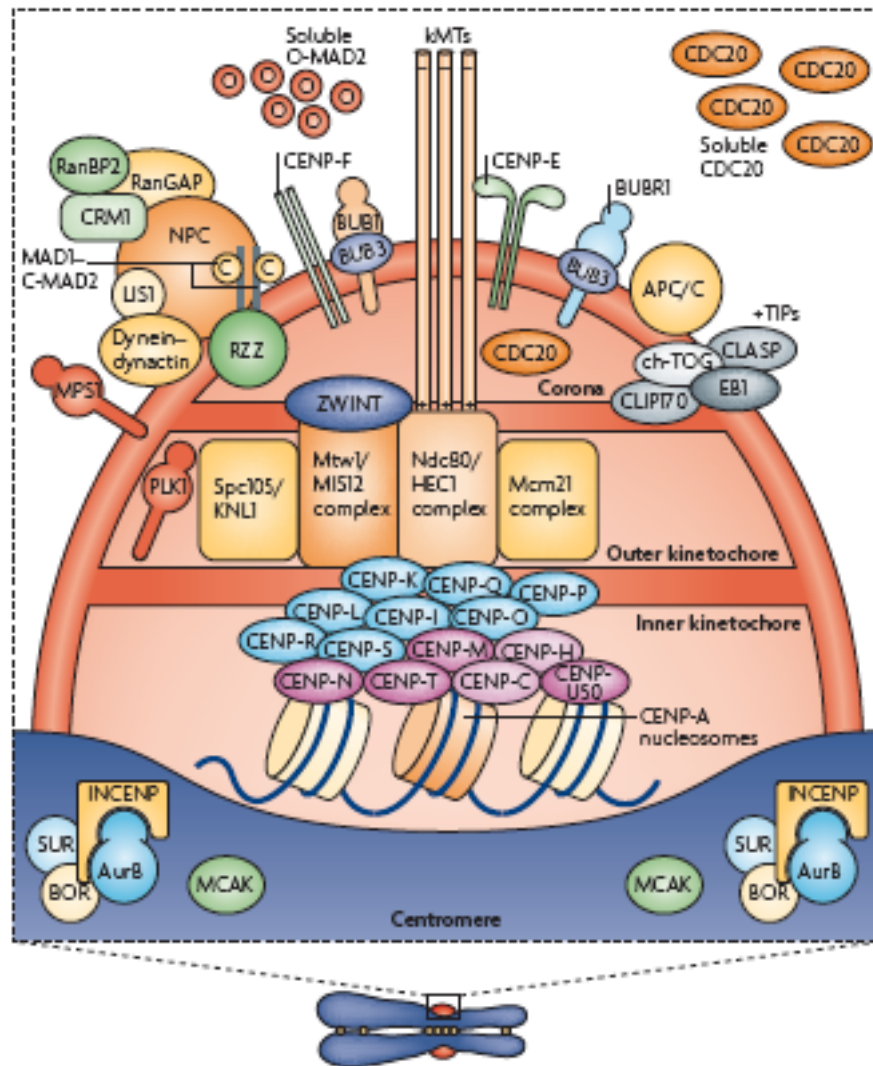
Da tutti questi studi sulla mitosi e la formazione del fuso, appare chiaro che il cinetocore svolge un ruolo essenziale in molti aspetti della mitosi. Il cinetocore è una struttura proteica di forma discoidale che si assembla sulla cromatina centromerica formando un'interfaccia tra i cromosomi ed i microtubuli del fuso mitotico. Il cinetocore dei vertebrati, osservato al microscopio elettronico (Brinkley and Stubblefield, 1966; Comings and Okada, 1971) appare come uno disco trilaminare, in cui si possono distinguere due strati proteici compatti separati da una zona meno densa (Pines, 2006). I pre-cinetocori acquistano la struttura laminare matura dopo la rottura dell'involucro nucleare (Moroi et al., 1981) in un processo che richiede determinanti che sono presenti nello strato interno (Tomkiel et al., 1994).

Lo strato interno è formato da sequenze di DNA altamente ripetuto che è assemblato in una forma specializzata di cromatina che persiste per tutto il ciclo cellulare. In questo strato sono presenti le proteine che mediano il legame tra cinetocore e centromero, quali CENP-A (Palmer *et al.*, 1991), CENP-C, CENP-H e CENP-I/MIS6 (Howman et al., 2000; Oegema et al., 2001; Van Hooser and Heald, 2001). La proteina CENP-A è stata la prima ad essere studiata, ed è importante per il reclutamento di molte proteine dello strato esterno del cinetocore.

Lo strato esterno, invece è una struttura proteica (Cooke et al., 1993) che contiene componenti dinamici attivi durante la mitosi. La presenza di cromatina nella piastra esterna del cinetocore è stata a lungo dibattuta. Inizialmente si era pensato che la piastra esterna fosse composta da anse e ripiegamenti di cromatina (Rattner and Lin, 1987; McEwen et al., 1993) ma studi successivi hanno escluso la presenza di DNA in questa zona. Il modello attualmente accettato prevede che la piastra esterna sia composta solamente da proteine.

La piastra esterna è associata ad una struttura nota come corona fibrosa che può essere osservata mediante microscopia elettronica generalmente solo in assenza di microtubuli e sembra essere composta da numerose proiezioni fibrillari che si dipartono dalla piastra esterna conferendole un aspetto lanuginoso (Ris and Witt, 1981). La corona fibrosa è ricca di componenti sia stabili che transienti coinvolti nello "spindle checkpoint" e nell'attacco dei microtubuli, quali Polo-like kinase (PLK), i motori molecolari dineina e varie chinesine (CENP-E/Cenp-meta e Kif18A/Klp67A), le proteine dello "spindle checkpoint" (MPS1, BUBR1, MAD1, MAD2, ROD, ZW10, ZWINT-1), le proteine non-motore associate ai microtubuli (MAPs) CLASP/MAST/orbit, il complesso Ndc80 (Wordeman et al., 1996;

Blower and Karpen, 2001; Van Hooser and Heald, 2001; Wigge and Kilmartin, 2001; DeLuca et al., 2002; Desai et al., 2003; Liu et al., 2003; Stucke et al., 2004; Liu et al., 2006; Cheeseman and Desai, 2008) (Fig. 4).



da Musacchio & Salmon, Nat. Rev. Mol. Cell Biol, 2007

Figura 4: Struttura del cinetocore umano

Formazione del cinetocore

Il sistema di interazione tra le differenti componenti del cinetocore non è ancora stato del tutto chiarito e molti gruppi stanno svolgendo ricerche per comprendere meglio quali siano effettivamente le interazioni dirette tra le proteine cinetoriche fino ad ora note. Lo studio della dinamica di formazione del cinetocore ha dimostrato che le diverse proteine si localizzano seguendo un preciso ordine temporale che presenta delle differenze nei vari organismi. Qui di seguito illustrerò i risultati ottenuti nello studio di formazione del cinetocore in cellule umane.

La proteina CENP-A (CID in *Drosophila* e Cse4 in *S. cerevisiae*) è una variante dell'istone H3 ed è la componente principale necessaria per la formazione di un cinetocore funzionale in quanto la sua presenza è indispensabile per la localizzazione di molte altre proteine. Identificata mediante l'utilizzo di siero autoimmune di pazienti affetti da CREST (malattia autoimmune il cui nome è un acronimo delle caratteristiche sintomatiche più comuni, C, Calcinosi, R, sindrome di Raynaud, E, disfunzione Esofagea, S, Sclerodattilia, T, Telangiectasia), questa proteina è presente solo nei centromeri funzionali (Warburton et al., 1997; Meluh et al., 1998). Nell'uomo sembra che le proteine RbAp46 e RbAp48, KNL2 ed il complesso MIS18 siano necessari affinché CENP-A sia reclutata sul DNA centromerico. A differenza delle altre proteine che si localizzano solo all'inizio della profase, CENP-A si trova associata alla cromatina per tutto il ciclo cellulare ed è quindi considerata una componente costitutiva del cinetocore. Recentemente sono stati isolati due complessi proteici contenenti CENP-A e ne sono stati caratterizzati i componenti (Foltz et al., 2006; McClelland et al., 2007). Il primo complesso, denominato CENP-A NAC (Nucleosome Associated Complex) è strettamente associato al nucleosoma contenente CENP-A ed è formato oltre che da CENP-C e CENP-H, da altre 4 proteine (CENP-M, CENP-N, CENP-T e CENP-U). Il complesso NAC è necessario per reclutare il complesso CAD (CENP-A-nucleosome Distal) a sua volta composto da 8 proteine (CENP-I, CENP-O, CENP-L, CENP-K, CENP-P, CENP-Q, CENP-R e CENP-S). Data la complessa rete di interazione di tutti questi fattori nella formazione del cinetocore, è stato proposto di denominare l'intero gruppo di proteine come "constitutive centromere-associated network" (CCAN), in base alla loro co-localizzazione con CENP-A durante tutto il ciclo cellulare. La funzione di tutte queste proteine è oggetto di molti studi e le evidenze sperimentali non sono sempre coerenti nei diversi lavori. Appare chiara una forte interdipendenza tra i vari componenti per la loro localizzazione centromerica: spesso l'assenza di un fattore causa la mancata localizzazione di altri fattori. Inoltre, in questi

esperimenti di deplezione sono stati osservati fenotipi mitotici difettivi nella congressione dei cromosomi molto simili. Questo risultato era atteso, ma ha confermato che tutte queste proteine hanno funzioni fortemente correlate.

Il processo di formazione dello strato esterno e della corona fibrosa comincia in tarda fase G2 e prosegue fino alla profase e non sembra essere lineare, ma regolato da molteplici vie contemporaneamente. Principalmente due componenti del CCAN, CENP-C e CENP-I, sono necessari per la localizzazione di tutte le proteine cinetocoriche più esterne. CENP-C è richiesto per il reclutamento di Mis12, BUB1, BUBR1, CENP-E, ZW10 e ROD. CENP-I è invece importante per la localizzazione di Nuf2 e CENP-F.

Mis12 e Nuf2, benchè presenti in due diverse vie, fanno in realtà parte di un unico complesso, il complesso KMN (KNL-1/Mis12 /Ndc80) responsabile del legame dei microtubuli al cinetocore. Ndc80, conservato dal lievito all'uomo, è a sua volta costituito da quattro proteine: Ndc80, Nuf2, Spc24 e Spc25. Ndc80/Nuf2 e Spc24/Spc25 formano due eterodimeri e nei metazoi, si associano al cinetocore prima della rottura dell'involucro nucleare (Desai et al., 2003). Analisi biochimiche hanno evidenziato che questo complesso è capace di legare direttamente i microtubuli al cinetocore (Cheeseman et al., 2006; Wei et al., 2007). Nel dominio globulare di Ndc80 è presente un dominio CH ("calponin-homology domain"). I domini CH sono stati osservati e descritti per la prima volta in proteine che legano l'actina, come α -actina (Djinovic Carugo et al., 1997). Questo dominio è stato identificato anche in EB1, una proteina che si associa all'estremità "più" dei microtubuli (Hayashi and Ikura, 2003). Tale osservazione suggerisce che questo motivo strutturale sia utilizzato anche in Ndc80 per legare i microtubuli. Il complesso KMN è infine responsabile della localizzazione delle proteine dello "spindle checkpoint" come MPS1, MAD1 e MAD2 ed interagisce fisicamente con Zwint, una proteina che funziona come recettore per il complesso RZZ, Rod-ZW10-Zwilch (Obuse et al., 2004). Anche questa osservazione dimostra la interdipendenza delle vie per la formazione del cinetocore: Zwint, la cui localizzazione dipende da CENP-I e dal complesso KMN, interagisce funzionalmente con ZW10 e Rod che sono reclutati da CENP-C. Il complesso RZZ è richiesto per il legame delle proteine motore dineina/dinactina al cinetocore (Chan et al., 2005). Queste proteine sono i principali effettori del movimento verso i poli lungo i microtubuli sia dei cromosomi che di proteine.

La via di formazione del cinetocore mediata dalla proteina CENP-C sembra importante non solo per il corretto assemblaggio del cinetocore, ma anche per la segregazione cromosomica e nella transizione da metafase ad anafase. Infatti le cellule prive di CENP-C, presentano cinetocori con diametro ridotto e privi di attacco ai microtubuli (Tomkiel et al.,

1994). CENP-C è necessaria per reclutare, oltre il complesso RZZ, altre componenti dello “spindle checkpoint” come BUB1 e BUBR1. BUB1 a sua volta è necessaria per la localizzazione di CDC20, un cofattore del complesso APC/C (“Anaphase Promoting Complex/cyclosome”). Durante la prometafase l’associazione sequenziale di CENP-F, reclutato da CENP-I, con BUBR1 predispone il sito per l’attacco al cinetocore di CENP-E (Chan et al., 1998). Sia la localizzazione di BUBR1 che il reclutamento delle proteine motore, come MCAK, che controllano i processi di polimerizzazione e depolimerizzazione dei microtubuli, non dipendono solo da CENP-C, ma anche da Aurora B. Quest’ultima proteina fa parte del complesso conosciuto come “chromosomal passenger complex” che ha un ruolo importante nel controllo della formazione del cinetocore stesso, nel suo legame ai microtubuli e nella formazione del fuso centrale negli stadi finali della mitosi.

Funzione del cinetocore

Il cinetocore svolge diverse importanti funzioni durante la mitosi. Innanzitutto è il sito di attacco dei microtubuli sul cromosoma e tale attacco è necessario per il corretto allineamento dei cromosomi in piastra metafasica e per la loro segregazione ai poli. Al cinetocore sono anche presenti le proteine motore che regolano la dinamica dei microtubuli e quindi i movimenti dei cromosomi. Infine è il sito di assemblaggio del complesso del checkpoint, un insieme di proteine che controllano la transizione metafase-anafase (Biggins and Walczak, 2003; Musacchio and Salmon, 2007; Cheeseman and Desai, 2008).

In genere, negli organismi eucariotici superiori, i cinetocori sono in grado di legare dai 10 ai 45 microtubuli, il numero varia a seconda del sistema cellulare osservato. Il legame tra cinetocore e microtubuli deve essere abbastanza forte per garantire la giusta segregazione ai poli opposti dei cromatidi fratelli. I principali responsabili di questo legame sono il complesso Ndc80 e la proteina KNL1, che insieme a Mis 12 sono conosciuti come sistema KMN. Si è visto che il complesso Ndc80 da solo ha una debole affinità nel legare i microtubuli, ma quando si associa con il complesso Mis 12 e la proteina KNL1, la sua affinità aumenta (Cheeseman et al., 2006). Altre proteine sono coinvolte nell’interazione con i microtubuli come le proteine motore dineina e la chinesina CENP-E.

La dineina citosolica è una proteina motore che si muove in direzione dell’estremità “meno” dei microtubuli. In prometafase, questa proteina, trasportando i cromosomi verso i poli del fuso dove la densità di microtubuli è più elevata, favorirebbe le interazioni

dell'estremità “più” dei microtubuli con la piastra esterna del cinetocore. La dineina è reclutata al cinetocore dal complesso RZZ e svolge un ruolo importante nella rimozione del blocco metafasico imposto dallo “spindle checkpoint” (vedi sotto).

CENP-E appartiene alla superfamiglia delle chinesine (Vale et al., 1985) ed è capace di legare i microtubuli tramite due domini, uno nella porzione N-terminale e uno in quella C-terminale (Liao et al., 1994). CENP-E è diretta all'estremità “più” dei microtubuli ed è responsabile del movimento dei cromosomi dai poli del fuso verso l'equatore della cellula. Recentemente è stato chiarito come CENP-E favorisca l'allineamento dei cromosomi in piastra metafasica. Il gruppo di Khodjakov (Kapoor et al., 2006) ha dimostrato che i cromosomi monorientati non ancora allineati prendono contatto con i microtubuli cinetocorici di cromosomi biorientati già in piastra e, scivolando lateralmente su questi microtubuli, arrivano velocemente al centro del fuso. Questo scivolamento laterale è mediato da CENP-E, la cui assenza causa infatti la mancata congressione dei cromosomi (Kapoor et al., 2006). Infine è stato dimostrato che CENP-E interagisce con CENP-F ed anche questa ultima proteina mostra affinità per i microtubuli, sia da sola che associata alle proteine che legano la dineina, come NDE1 e NDEL1 (Vergnolle and Taylor, 2007).

La dinamicità dei microtubuli al cinetocore è finemente regolata da una serie di fattori proteici che controllano i processi di polimerizzazione e depolimerizzazione alle estremità di queste strutture. Alcune chinesine hanno attività di depolimerizzazione e sono coinvolte nella regolazione del movimento dei cromosomi durante tutta la mitosi. In particolare, le chinesine Kip3 (famiglia 8; Klp67A in *Drosophila*) e le chinesine della famiglia 13, che includono la chinesina umana MCAK e le chinesine di *Drosophila* Klp10A e Klp59C, destabilizzano le estremità dei microtubuli favorendone il repentino accorciamento. Kip3, Klp67A, MCAK/Klp59C sono localizzate sul cinetocore ed agiscono sulle estremità “più” dei microtubuli, mentre Klp10A è presente prevalentemente ai poli del fuso dove destabilizza le estremità “meno” ad essi associate (Sharp et al., 2000). È interessante considerare gli studi sui fenotipi mitotici causati dall'inattivazione dei geni che codificano per queste proteine: l'assenza di Klp67A e Klp10A determina l'allungamento del fuso metafasico, a causa proprio dell'assenza di attività destabilizzanti alle estremità dei microtubuli. In cellule prive di MCAK/Klp59C sono stati invece osservati principalmente difetti nell'allineamento dei cromosomi in piastra. Tale osservazione suggerisce che questa chinesina sia principalmente coinvolta nell'interazione tra i microtubuli ed i cinetocori.

Al cinetocore sono inoltre presenti delle proteine che, al contrario, promuovono la polimerizzazione dei microtubuli, e che quindi promuovono il movimento dei cromosomi

verso la piastra metafasica. Queste proteine sono: CLIP-170 (CLIP-190 in *Drosophila melanogaster*), le proteine ad essa associate (CLASPs) come MAST/Orbit (Inoue et al., 2000; Maiato et al., 2002; Sharp, 2002), EB1 (Schuyler and Pellman, 2001) e MAP215 (Charrasse et al., 1998). Le cellule prive di MAST/Orbit e di EB1 presentano fusi mitotici corti, dato che conferma il ruolo svolto da queste proteine nella crescita dei microtubuli in mitosi.

Le interazioni tra microtubuli e cinetocore sono sottoposte anche ad una fine regolazione ad opera di chinasi come Aurora B/Ipl1. Questa proteina fa parte insieme ad INCENP (INner CENtrome Protein), TD-60 e survivin del complesso proteico delle “chromosome passenger”. Queste proteine sono così chiamate per il caratteristico comportamento che hanno in mitosi: dall’inizio della mitosi fino alla metafase sono localizzate sul cinetocore, dall’anafase in poi si ridistribuiscono sui microtubuli del fuso e sul cortex cellulare. Aurora B, reclutata al cinetocore dalla proteina INCENP, influenza l’attività e la formazione di molte proteine presenti al cinetocore ed è richiesta per la correzione di legami errati cinetocore-microtubulo. Se, per esempio, i due cinetocori dello stesso cromosoma sono attaccati ai microtubuli provenienti dallo stesso polo (attacco sintelico), i cinetocori non sono in tensione. Questa perdita di tensione attiva la chinasi Aurora B (Sandall et al., 2006) che fosforila alcuni substrati specifici con conseguente destabilizzazione del legame cinetocore-microtubulo (Tanaka et al., 2002). I substrati di Aurora B identificati al cinetocore sono: il complesso “Dam1 ring complex” (Cheeseman et al., 2002) in lievito, la chinesina MCAK (Andrews et al., 2004; Lan et al., 2004) e il complesso Ndc80 (Cheeseman et al., 2006; DeLuca et al., 2006). In particolare la fosforilazione della subunità Ndc80 provoca una riduzione dell’affinità del complesso Ndc80 per i microtubuli.

Nel momento in cui avviene il legame tra uno dei due cinetocori fratelli ed i microtubuli del fuso, il cromosoma si sposta verso il polo della cellula da cui provengono i microtubuli a cui è legato e solo quando anche l’altro cinetocore presente sullo stesso cromosoma si lega ai microtubuli provenienti dal polo opposto, il cromosoma risulta “biorientato”. Il cromosoma “biorientato” compie delle oscillazioni tra i poli della cellula, ed il periodo di queste oscillazioni diminuisce fino a diventare brevissimo quando i cromosomi si allineano in piastra metafasica.

L’allineamento dei cromosomi in metafase, conseguenza di un corretto orientamento “bipolare”, è un processo conservato in tutti gli eucarioti superiori, ed è essenziale per la corretta segregazione dei cromosomi durante l’anafase. Se i cromatidi fratelli si separano prima che tutti i cromosomi del complemento siano allineati in piastra equatoriale, possono

verificarsi errori di segregazione, con la conseguente formazione di cellule aneuploidi. Si è pertanto evoluto un meccanismo che impedisce l'entrata in anafase fino a quando tutti i cromosomi non sono bi-orientati ed allineati in piastra metafasica. Questo meccanismo denominato “Spindle-Assembly Checkpoint” (SAC) è mediato da alcuni complessi multiproteici (denominati collettivamente MCC) (Musacchio and Salmon, 2007).

Questi complessi hanno la funzione di monitorare costantemente le interazioni tra cinetocore e microtubuli. I primi componenti dei MCC, sono stati identificati in *S. cerevisiae* attraverso l'analisi genetica di mutanti che non si bloccavano in mitosi in presenza di un danno al fuso (Hoyt et al., 1991; Murray et al., 1991). In questi lavori furono definite due classi fenotipiche: Mad (Mitotic arrest deficient) e Bub (Bubbling uninhibited by benzimidazole). I geni che le compongono (Mad1, Mad2, Mad3/BubR1, Bub1 e Bub3) sono altamente conservati e mantengono inalterata la loro funzione in tutti gli organismi dove sono stati studiati. In seguito è stato identificato un altro gruppo di proteine che controlla il comportamento dei cromosomi in mitosi, il complesso RZZ (Abrieu et al., 2000; Karess, 2005). La principale funzione degli MCC è la regolazione negativa del complesso APC/C (“Anaphase Promoting Complex/cyclosome”). L'APC è una poliubiquitina ligasi che ha come substrato la securina, una proteina centromerica che agisce da inibitore stechiometrico della separasi, una proteasi che, all'inizio dell'anafase, degrada le coesine che tengono uniti i cromatidi fratelli (Peters, 2006; Sullivan and Morgan, 2007). Gli MCC regolano negativamente CDC20, un cofattore necessario per l'attivazione dell'APC. Fin quando gli MCC inibiscono CDC20, l'anafase non può avvenire perché i cromatidi fratelli sono tenuti insieme dalle coesine.

Gli MCC si accumulano sui cinetocori dei cromosomi che non sono correttamente bi-orientati e basta un solo cromosoma carico di MCC per inibire l'anafase. Tuttavia, quando tutti i cromosomi sono allineati in piastra metafasica e i microtubuli che li connettono ai poli sono in tensione, gli MCC vengono trasportati dalla dineina verso i poli. La rimozione degli MCC dal cinetocore libera CDC20 con conseguente attivazione dell'APC che, aggiungendo residui di ubiquitina alla securina, ne attiva la degradazione da parte del proteosoma. Questa degradazione permette il rilascio della separasi che, rimuovendo le coesine, separa il cromosoma nei due cromatidi fratelli che possono essere trasportati ai poli in anafase.

Benché siano note molte caratteristiche strutturali e funzionali delle proteine dei MCC, rimane ancora da chiarire come queste molecole interagiscano fra loro e con l'apparato mitotico. La prima proteina del SAC studiata è stata Mad2. Attualmente si pensa che questa proteina esista in 2 frazioni in equilibrio dinamico tra loro. Una frazione è stabilmente associata con Mad1,

mentre l'altra è libera nel citoplasma. Il complesso Mad1-Mad2 legato al cinetocore promuove l'interazione tra Mad2 libero e CDC20, rendendo così inattivo l'APC.

BUBR1 è una chinasi che lega direttamente CDC20 nel MCC. L'attività chinasi di questa proteina nel controllo del SAC è oggetto di molti studi contraddittori; basti pensare che il dominio chinasi è assente in Mad3, il gene ortologo di BUBR1 in *S. cerevisiae*. Studi recenti suggeriscono che l'attività chinasi di BUBR1 sia coinvolta nella regolazione dell'allineamento dei cromosomi in piastra metafasica (Ditchfield et al., 2003; Lampson and Kapoor, 2005). In particolare, BUBR1 interagisce e fosforila CENP-E, che come già illustrato precedentemente, svolge un ruolo essenziale nella congressione dei cromosomi.

Studi di cinetica hanno dimostrato che la proteina BUB1 è legata più stabilmente di BUBR1 al cinetocore (Howell et al., 2004) ed è necessaria per la localizzazione al cinetocore di BUBR1, Mad1, Mad2, CDC20, CENP-F e MCAK. È stato dimostrato che interagisce con Aurora-B, che fosforila CDC20 e che partecipa direttamente alla formazione del MCC ma, anche per BUB1, non è stato ancora chiarito se la sua attività chinasi sia direttamente coinvolta nella sua attività di proteina del SAC.

Per quanto riguarda il complesso RZZ, è stato dimostrato che è necessario per il reclutamento della dineina al cinetocore. Come altre proteine del SAC, la quantità del complesso RZZ legata al cinetocore diminuisce quando avviene l'attacco dei microtubuli. Esperimenti di immunolocalizzazione e di analisi del comportamento delle proteine RZZ in vivo hanno mostrato che questa riduzione è accompagnata da una redistribuzione di ZW10-Rod lungo i microtubuli cinetocorici verso i poli. Questo movimento è mediato dal complesso dineina-dinactina che studi successivi hanno dimostrato svolgere un ruolo fondamentale nella inattivazione del SAC (Howell et al., 2001). Infatti, il complesso dineina-dinactina trasporta lungo i microtubuli oltre il complesso RZZ anche altre proteine del checkpoint come Mad1, Mad2, MPS1 e CENP-F. Questa rimozione dal cinetocore è alla base dell'inattivazione del SAC che precede l'anafase, in quanto impedendo la formazione di nuovi MCC, causa il rilascio di CDC20 e quindi l'attivazione dell'APC/C.

Recentemente è stato suggerito un nuovo modello sulla struttura e funzione del cinetocore che cerca di integrare tutte le informazioni relative alle varie componenti cinetocoriche. Questo modello suggerisce che esista un'associazione molto stretta tra l'attacco dei microtubuli al cinetocore e la regolazione del "checkpoint" (Burke and Stukenberg, 2008). Infatti alcune proteine responsabili delle interazioni microtubulo-cinetocore sono anche in grado di reclutare le proteine dello "spindle checkpoint". Alla base di questa duplice funzione sembra esistere una competizione al cinetocore tra il legame dei microtubuli e il legame con le

proteine del “checkpoint”. È stato osservato che in assenza di microtubuli, il complesso KMN già presente sul cinetocore, è necessario per reclutare le proteine del “checkpoint”. Il complesso Ndc80 è infatti richiesto per il legame al cinetocore delle proteine Mad1, Mad2, Mps1 e RZZ. In particolare la proteina Ndc80 è in grado di interagire con Mad1 e Mps1, la proteina KNL-1 con Bub3/Bub1 e Bub3/BubR1 (Kiyomitsu et al., 2007) e la proteina Mis12 è in grado di riunire al cinetocore il complesso RZZ attraverso l’interazione con la proteina Zwint-1. Quando, invece, si genera un attacco stabile dei microtubuli al cinetocore, si attiva una cascata regolativa che porta all’inattivazione dello “spindle checkpoint”. È stato proposto che Ndc80/KNL1, legate ai microtubuli, perdono la capacità di interazione con Mad1. Contemporaneamente, la presenza dei microtubuli blocca il legame tra CENP-E e BUBR1, disattivando l’attività chinasi di BUBR1 e permettendo così alla dineina di rimuovere il complesso RZZ, Mad1 e Mad2 dal cinetocore. In questo modello quindi il complesso KMN ha un ruolo essenziale nella funzionalità del cinetocore in quanto è fondamentale per l’ancoraggio dei microtubuli, ma funziona anche per l’attivazione del segnale del “checkpoint” perché serve come base per il reclutamento delle proteine dei complessi MCC.

“RNA interference”

Il sequenziamento di vari genomi eucariotici e la pubblicazione della sequenza del genoma umano (Venter et al., 2001), ha dato inizio alla cosiddetta era post-genomica. L’obiettivo principale nella ricerca post-genomica è quello di attribuire una funzione a ciascun gene identificato dal sequenziamento e dalle procedure di annotazione.

Il genoma di *Drosophila melanogaster* è stato completamente sequenziato nel 2000 grazie ad un lavoro di collaborazione tra un consorzio universitario ed un’azienda privata, la Celera Genomics Systems (Maryland, USA) (Adams et al., 2000). Si è scoperto che il genoma di *Drosophila* contiene circa 13.000 geni, il 70% dei quali sono simili a geni umani; quindi le informazioni ricavate sul genoma di *Drosophila* possono essere di aiuto per identificare le funzioni di geni umani (Rubin et al., 2000).

Un metodo recente ed innovativo per conoscere la funzione genica è quello del silenziamento genico tramite RNA interference (RNAi). Il silenziamento genico post-trascrizionale (PTGS), inizialmente considerato un fenomeno anomalo limitato solo alle piante, si è rivelato un argomento di grande interesse per i biologi. Si è infatti constatato che è

parte di un meccanismo ancestrale di regolazione genica e di difesa contro agenti virali, comune a funghi, piante, nematodi, insetti e mammiferi. Studi recenti hanno suggerito che un meccanismo simile all'RNAi può contribuire alla formazione e al rimodellamento della cromatina nei funghi, in *C. elegans* e in *Drosophila*, (Volpe et al., 2002; Hall et al., 2003; Pal-Bhadra et al., 2004; Verdel et al., 2004).

Le conoscenze attuali sull'RNAi sono state ottenute principalmente dallo studio di organismi modello quali *C. elegans* e *Drosophila* (Ambros, 2001). Il fenomeno dell'RNAi è stato scoperto per la prima volta nel nematode *Caenorhabditis elegans* come risposta all'introduzione di RNA a doppio filamento (dsRNA) nelle gonadi. Studi condotti da Guo e Kemphues sull'inattivazione genica in *C. elegans* hanno evidenziato che non (Verni et al., 2000)solo l'RNA anti-senso, ma anche l'elica di RNA codificante inattivava la traduzione dell'mRNA endogeno corrispondente (Guo and Kemphues, 1995). Fire e colleghi hanno poi definitivamente dimostrato che il silenziamento era ancora più efficace se nelle gonadi di *C. elegans* veniva iniettato RNA a doppia elica (Fire et al., 1998). Studi successivi hanno permesso di chiarire i meccanismi molecolari dell'RNAi e portato all'elaborazione di un modello che spiega il silenziamento genico mediante RNA interference (Fig. 5). Questo modello, suggerito da Zamore, prevede che il dsRNA introdotto nella cellula venga riconosciuto da un sistema enzimatico DICER (Bernstein et al., 2001) che lo taglia in RNA di circa 21-25 nucleotidi, noti come “small interfering RNA” (siRNA) (Hamilton and Baulcombe, 1999; Hammond et al., 2000; Zamore et al., 2000; Elbashir et al., 2001; Hutvagner and Zamore, 2002). I siRNA si legano poi a un complesso proteico denominato RISC (“RNA-Induced Silencing Complex”). Tale complesso media la denaturazione dei siRNA ed il legame di questi con l'mRNA endogeno corrispondente ed infine utilizza la sua attività nucleasica per degradare l'mRNA.

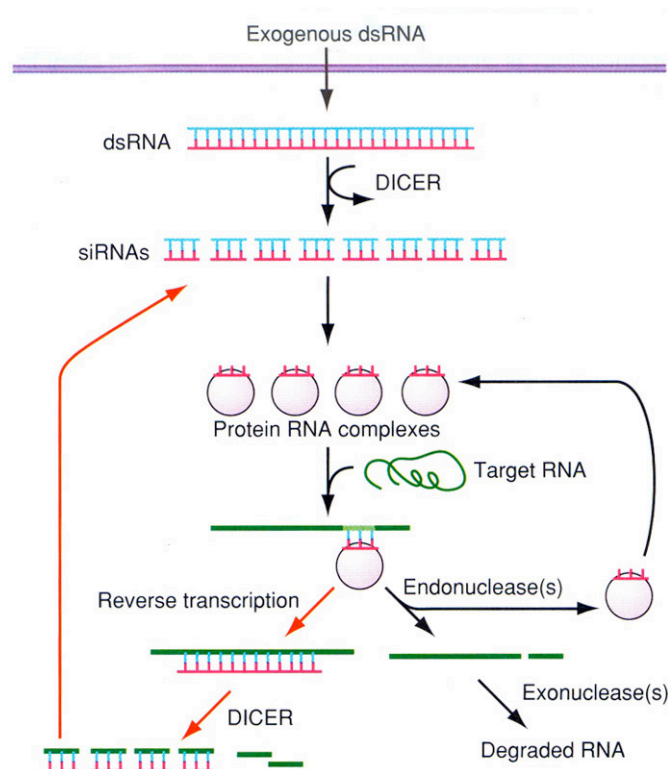


Figura 5. In questo schema è mostrato il meccanismo di funzionamento dell'RNA interference (RNAi). L'RNA a doppio filamento (dsRNA) viene tagliato dal complesso enzimatico DICER in piccoli frammenti (siRNA, small interfering RNA) che legandosi a diversi complessi proteici mediano la degradazione dell'mRNA endogeno corrispondente.

Applicazioni dell'RNAi a studi di genomica funzionale

La tecnica dell'RNAi ha avuto un notevole impatto sugli studi di genomica funzionale e sono state pubblicate numerose ricerche nelle quali la tecnica dell'RNAi è stata usata per assegnare funzioni a geni ignoti. Tre gruppi di ricerca hanno effettuato le prime importanti applicazioni genomiche dell'RNAi in *C. elegans*. Gönczy e collaboratori (Gönczy et al., 2000) hanno usato questa tecnica per inibire l'espressione del 96% dei 2.300 geni presenti sul cromosoma III di *C. elegans* ed hanno così identificato molti geni necessari per le divisioni embrionali. Fraser e collaboratori (Fraser et al., 2000) hanno invece usato l'RNAi per identificare le funzioni di circa il 90% dei geni presenti sul cromosoma I di *C. elegans*. In questo lavoro, l'inibizione della funzione genica è stata ottenuta mediante alimentazione dei nematodi con batteri in cui venivano espressi i dsRNA. È stato così possibile assegnare una funzione embrionale al 13,9% dei geni analizzati. Alcuni dsRNA hanno dato più di un fenotipo, confermando che alcuni geni svolgono funzioni diverse all'interno dello stesso organismo.

In un lavoro successivo, condotto da Kamath e colleghi, l'analisi funzionale, tramite RNAi, è stata estesa all'intero genoma di *C. elegans* (Kamath et al., 2003)(Kamath *et al.*, 2003). Sono stati così ottenuti fenotipi mutanti per 1.722 geni (10,3% dei geni totali analizzati), 2/3 dei quali erano ancora funzionalmente ignoti. Questo lavoro ha confermato che i geni essenziali per la vitalità in *C. elegans* sono coinvolti in processi cellulari di base e presentano un elevato grado di omologia con geni presenti in altri eucarioti. Inoltre, 33 geni identificati in questo lavoro hanno un significativo grado di omologia con altrettanti geni umani indicati come candidati responsabili di diverse sindromi.

Sulla scia di questi importanti risultati raggiunti in *C. elegans*, molti ricercatori hanno usato l'RNAi anche in un altro organismo modello, la *Drosophila melanogaster*. Il primo lavoro che ha dimostrato la possibilità di indurre silenziamento post-trascrizionale gene-specifico in embrioni di *Drosophila* è stato quello di Kennerdell e Carthew (Kennerdell and Carthew, 1998). In seguito, Clemens e colleghi hanno introdotto dsRNA in cellule in coltura di *Drosophila*, provando che in questo sistema l'RNAi è un metodo assai efficace per l'inattivazione di geni bersaglio (Clemens et al., 2000).

La prima applicazione sistematica dell'RNAi all'analisi molecolare della mitosi è stata effettuata nel laboratorio dove sto svolgendo l'attività (Somma et al., 2002). È stata usata la tecnica dell'RNAi per studiare la citochinesi in cellule in coltura di *Drosophila*. La citochinesi è un processo complesso grazie al quale le cellule figlie si separano al termine della divisione cellulare. Se tale processo è alterato si osserva la comparsa di cellule binucleate. Da questi esperimenti è emerso che i dsRNA corrispondenti ai geni *anillin*, *acGAP*, *pavarotti*, *rho1*, *pebble*, *spaghetti squash*, *syntaxin1A* e *twinstar* distruggono la citochinesi nelle cellule S2, generando fenotipi caratteristici. Per i tre geni *anillin*, *acGAP* e *syntaxin1A* si è dimostrato per la prima volta un loro coinvolgimento nella citochinesi e si è potuto definire il loro ruolo in questo processo in base al fenotipo ottenuto per RNAi.

In un successivo lavoro Goshima e Vale (Goshima and Vale, 2003) si sono avvalsi dell'RNAi nelle cellule S2 di *Drosophila* per studiare le funzioni mitotiche di 25 chinesine. La superfamiglia delle chinesine comprende proteine motore che si muovono lungo i microtubuli e sono implicate nella formazione del fuso, nei movimenti dei cromosomi e nella citochinesi. Oltre a un dominio altamente conservato di circa 340 amminoacidi, le chinesine con attività di motore presentano domini che mediano l'oligomerizzazione, la regolazione dell'attività motore e l'interazione con specifiche proteine da trasportare (Hirokawa et al., 1998; Goldstein, 2001; Vale, 2003). Analizzando i fenotipi prodotti dall'RNAi nella linea cellulare S2, si è osservato che quattro chinesine, Klp61F (omologa a BimC/Eg5), Klp10A

(omologa a KinI), Klp67A (omologa a Kin3) e Ncd (omologa a Kin C), sono coinvolte nell'assemblaggio dei fusi bipolari. Inoltre Klp67A e le chinesine CENP-meta (omologa a CENP-E), Klp3A (omologa alle cromochinesine), e Nod (omologa a Kid) sono implicate nell'allineamento dei cromosomi in piastra metafase. Una sola chinesina, Pavarotti (Pav; ortologa a MKLP1/ZEN-4/CHO1) è risultata necessaria per la formazione e per il mantenimento del fuso centrale e quindi per la corretta escuzione della citochinesi.

In un altro lavoro il gruppo di Vale (Rogers et al., 2003) ha studiato i fenotipi prodotti dall'RNAi per 90 proteine implicate nella formazione della lamella, una struttura ricca in actina presente nelle cellule S2 di *Drosophila*. Complessivamente, i risultati di Rogers e collaboratori hanno mostrato che su 90 proteine implicate nella dinamica dell'actina, 13 sono necessarie per la formazione della lamella e 7 sono implicate nella citochinesi.

Un'applicazione della tecnica dell'RNAi ad un più esteso numero di geni è stata effettuata da Kiger e colleghi per analizzare le basi molecolari della morfologia cellulare di *Drosophila* (Kiger et al., 2003). Per identificare i geni responsabili della forma cellulare, sono state analizzate due linee cellulari morfologicamente distinte, rispettivamente Kc₁₆₇ e S2R⁺ (Schneider, 1972). Kiger e colleghi hanno eseguito un'analisi per RNAi di un set di dsRNA corrispondenti a 994 geni che si presumeva fossero coinvolti nella regolazione della morfologia cellulare. Usando la microscopia a fluorescenza per visualizzare i filamenti di actina, i microtubuli e il DNA, sono stati identificati e caratterizzati i fenotipi aberranti prodotti dall'inattivazione di 160 geni. Poiché profili fenotipici simili sono presumibilmente dovuti all'inattivazione di geni funzionalmente correlati, è stato possibile determinare le funzioni di geni ignoti sulla base del fenotipo di quelli noti.

Successivamente, in un lavoro di Boutros e colleghi (Boutros et al., 2004), la tecnica dell'RNAi è stata applicata all'intero genoma di *Drosophila*. Cellule in coltura sono state trattate con 19.470 dsRNA allo scopo di individuare nuovi geni necessari per la crescita e la vitalità cellulare. Questi ricercatori hanno scoperto che 438 dsRNA identificavano geni essenziali per la vitalità cellulare. Per circa l'80% di questi geni non si conoscevano ceppi mutanti in *Drosophila*. Nel restante 20% dei geni erano compresi geni con ruoli precedentemente dimostrati nella crescita cellulare e nel ciclo cellulare.

Nello stesso periodo sia il gruppo di O'Farrell (Echard et al., 2004) che il gruppo di Perrimon (Eggert et al., 2004) si sono avvalsi della tecnica dell'RNAi per identificare i geni richiesti per la citochinesi in *Drosophila*. Il primo gruppo ha condotto studi su cellule in coltura S2 che sono state trattate complessivamente con 7.216 dsRNA. È stata osservata la comparsa di cellule binucleate dopo trattamento con dsRNA corrispondenti a 30 geni, di cui

11 non erano mai stati coinvolti nella citochinesi. Il gruppo di Perrimon ha usato la tecnica dell'RNAi sull'intero genoma di *Drosophila*. Questo gruppo è riuscito ad identificare 214 proteine coinvolte nella citochinesi, 25 delle quali non erano state precedentemente caratterizzate.

Da questi risultati e da quelli precedentemente menzionati, risulta evidente che l'RNAi è un metodo estremamente efficiente per lo studio delle funzioni geniche in *Drosophila*, costituendo una valida alternativa all'analisi genetica classica (Maiato et al., 2003). È inoltre chiaro che l'RNAi è un metodo particolarmente adatto per lo studio dei processi cellulari come la mitosi. I risultati ottenuti in questo campo con la *Drosophila* sono molto importanti in quanto il processo mitotico è evolutivamente molto conservato, ed è quindi probabile che la caratterizzazione di nuovi geni mitotici di *Drosophila*, mediante RNAi, possa portare all'identificazione di nuove funzioni mitotiche in uomo.

Contributi fondamentali alla scoperta dei geni coinvolti nella divisione mitotica sono stati forniti dall'applicazione sistematica dell'RNAi su cellule in coltura S2 di *Drosophila melanogaster* condotta dal gruppo di Vale (Goshima et al., 2007) e da uno studio effettuato nel laboratorio dove sto svolgendo l'attività di ricerca (Somma et al., 2008). Il gruppo di Vale ha identificato in totale 209 geni coinvolti nella mitosi, ed in particolare 189 geni responsabili per la formazione del fuso e per il corretto allineamento dei cromosomi in metafase. I geni identificati sono stati suddivisi in base al fenotipo ottenuto per inattivazione mediante RNAi e raggruppati in quattro gruppi principali. Al primo gruppo appartengono i geni la cui inattivazione determina difetti nella funzionalità del centrosoma. Nel secondo gruppo sono presenti i geni che una volta inattivati determinano difetti nella forma del fuso, come fusi monopolari, multipolari o privi di focalizzazione ai poli. Al terzo gruppo appartengono i geni la cui inattivazione provoca nelle cellule difetti nella dimensione del fuso (fusi lunghi/fusi corti). All'ultimo gruppo appartengono i geni richiesti per una corretta struttura e per un normale allineamento dei cromosomi in metafase. Secondo gli autori sono state assegnate nuove funzioni mitotiche a ben 150 geni che suggeriscono nuove ipotesi sulla formazione del fuso mitotico e sul ruolo svolto dai centrosomi e dai cinetocori in questo processo.

Nel lavoro condotto nel laboratorio di cui faccio parte abbiamo effettuato esperimenti di RNAi per 1000 geni di *Drosophila*. Questi geni provengono da una lista arricchita in geni mitotici. Tale lista è stata ottenuta utilizzando dati relativi a numerosi esperimenti di "microarray" in cui è stata analizzata l'espressione di 13.166 geni in vari tessuti di *Drosophila melanogaster* con la piattaforma "Affymetrix" (Spellman and Rubin, 2002). Partendo dall'ipotesi che geni funzionalmente correlati vengano espressi contemporaneamente, è stato

usato il coefficiente di Pearson per ordinare i geni in base alla loro co-espressione rispetto a sei geni mitotici noti. I geni presi come riferimento sono: *gluon* (*glu*, che codifica per una condensina ed è quindi implicato nella condensazione cromosomica); *ida/APC5* (che codifica per una subunità dell'anaphase promoting complex); *eb1* (che codifica per una proteina che si lega ai microtubuli ed è necessaria per la formazione del fuso); *cid/CenpA* (che codifica per una proteina di tipo istonico omologa a CenpA, necessaria per la funzionalità del centromero); *zw10* (che codifica per un componente del checkpoint del fuso); e *citron kinase* (*sti*, che codifica per una serina/treonina chinasi specificamente necessaria per la citochinesi). Sono state così ricavate sei liste in cui i geni di *Drosophila* sono stati ordinati in base al loro coefficiente di coespressione con i suddetti geni mitotici. Sono state quindi determinate le posizioni di 72 geni mitotici noti nelle 6 liste di co-espressione (Tabella 1).

Da un esame della Tabella 1 emerge chiaramente che le prime 1000 posizioni di ogni lista di co-espressione sono fortemente arricchite in geni mitotici noti. Sulla base di queste liste di co-espressione è stata costruita una nuova lista detta “media” (Tabella 1), ordinando i geni in base alla loro presenza nelle prime 3000 posizioni delle 6 liste e all'ordine occupato in ciascuna di esse. In questa lista “media” il 59% dei geni mitotici noti è compreso nelle prime 1000 posizioni. Si può quindi concludere che in questi 1000 geni sia compreso il 59% di tutti i geni mitotici di *Drosophila*, inclusi quelli non ancora identificati. Si è pertanto deciso di condurre esperimenti di RNAi per i 1000 geni inclusi nella lista “media”, con l'obiettivo di identificare nuove funzioni mitotiche.

Abbiamo così identificato 155 geni, la cui inattivazione mediante RNAi causa fenotipi con evidenti alterazioni mitotiche. In base al fenotipo osservato, questi geni sono stati suddivisi in 7 categorie principali: 13 geni sono risultati fondamentali per la progressione del ciclo cellulare, 44 per l'integrità cromosomica, 11 per un'appropriata condensazione dei cromosomi in mitosi, 41 per la corretta segregazione dei cromosomi, 33 per la formazione del fuso, 7 per la citochinesi e in ultimo l'inattivazione di 6 geni ha evidenziato il loro coinvolgimento in più funzioni mitotiche.

Tabella 1. Posizione di 72 geni mitotici all'interno di liste di co-espressione con sei geni mitotici di riferimento (*sti*, *zw10*, *eb1*, *cid*, *glu*, *ida/APC*). I geni nelle liste di co-espressione sono stati suddivisi in gruppi da 500, come indicato nella prima colonna della tabella.

	<i>sti</i>	<i>zw10</i>	<i>eb1</i>	<i>cid</i>	<i>glu</i>	<i>Ida</i>	<i>media</i>
1-500	35	36	18	40	39	47	42
501-1000	10	22	25	17	15	13	17
1001-1500	15	10	11	11	15	13	8
1501-2000	14	6	15	8	6	3	8
>2000	26	26	31	24	25	25	25

È interessante confrontare i risultati da noi ottenuti con quelli del lavoro del gruppo di ricerca di Goshima. Nel nostro screening abbiamo identificato 98 geni mitotici contro i 198 individuati da Goshima e coll., ma effettuando esperimenti per solo 1000 geni invece che per tutti i ~13.000 geni di *Drosophila*. Inoltre ben 30 di questi geni non sono stati identificati da Goshima e coll., mentre noi non abbiamo ottenuto un fenotipo mitotico dopo l'inattivazione di 17 geni della nostra lista, che sono stati invece classificati da Goshima e coll. come geni mitotici. Si può quindi concludere che il nostro innovativo approccio basato sull'analisi informatica dei dati di co-espressione sia stato altamente produttivo nell'identificazione di nuovi geni mitotici.

Il mio lavoro di tesi è consistito nella caratterizzazione funzionale di alcuni geni che svolgono un ruolo importante nel movimento dei cromosomi durante la mitosi. In cellule trattate con dsRNA per questi geni i cromosomi non si allineano mai in piastra metafasica. Il fuso poi si allunga assumendo una configurazione di tipo ana-telofasico ed i cromosomi non si separano nei cromatidi fratelli, ma migrano casualmente ai poli. Alcuni dei geni di questa categoria codificano per proteine necessarie per la funzione del cinetocore come Ndc80 e Nuf2. Poiché proteine coinvolte in uno stesso processo è probabile che abbiano lo stesso fenotipo citologico dopo deplezione mediante RNAi, si può ipotizzare che anche gli altri geni appartenenti a questa categoria codifichino per proteine cinetocoriche. In realtà l'analisi delle sequenze degli amminoacidi indica che la maggior parte dei geni di questa categoria codifica per fattori coinvolti nel processo di splicing. Il lavoro della mia tesi è consistito nello studio di

due geni importanti per la segregazione dei cromosomi in cellule di *Drosophila* e che codificano per proteine che risultano altamente omologhe a polipeptidi caratterizzati come fattori di splicing in uomo e topo. I risultati da me ottenuti suggeriscono un nuovo ruolo dello splicing nella funzione del centromero/cinetocore durante la mitosi.

RISULTATI

Identificazione di nuovi geni mitotici in *Drosophila melanogaster*

Nel laboratorio dove ho svolto l'attività di ricerca abbiamo usato la tecnica dell'RNA "interference" su cellule in coltura S2 di *Drosophila melanogaster*, al fine di identificare nuovi geni coinvolti nella mitosi. Si è partiti da una lista arricchita in geni mitotici, ottenuta analizzando i dati di sequenziamento e "microarray" dei 13.168 geni di *Drosophila* disponibili, ed ordinando tutti i geni in base alla loro co-espressione con sei geni mitotici noti (vedi Introduzione). Per ciascun gene sono stati generati, tramite PCR, segmenti di DNA da cui sono state prodotte molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA) che sono state aggiunte al terreno di coltura delle cellule S2 per inattivare i geni corrispondenti. Dopo 72 ore di trattamento, le cellule sono state fissate con formaldeide e quindi colorate per la tubulina ed il DNA per evidenziare contemporaneamente fuso mitotico e cromosomi. L'analisi citologica di fusi mitotici ha evidenziato una serie di fenotipi mitotici difettivi. In base al fenotipo osservato, questi geni sono stati suddivisi in 7 categorie principali: 13 geni sono risultati fondamentali per la progressione del ciclo cellulare, 44 per l'integrità cromosomica, 11 per un'appropriata condensazione dei cromosomi in mitosi, 41 per la corretta segregazione dei cromosomi, 33 per la formazione del fuso, 7 per la citochinesi e in ultimo l'inattivazione di 6 geni ha evidenziato il loro coinvolgimento in più funzioni mitotiche.

Per il mio progetto di ricerca ho preso in considerazione la classe di geni responsabili della corretta segregazione dei cromosomi durante la mitosi.

Geni richiesti per la segregazione dei cromosomi in *Drosophila melanogaster*

Come ampiamente descritto nell'introduzione, i cromosomi hanno movimenti oscillatori in prometafase poi, una volta stabilito un corretto attacco bipolare del cinetocore ai microtubuli provenienti dai centrosomi, si allineano in piastra in metafase. L'allineamento di tutti i cromosomi soddisfa il "checkpoint" mitotico che permette l'ingresso della cellula in anafase, la separazione dei cromatidi fratelli che possono migrare ai poli del fuso (Fig. 6).

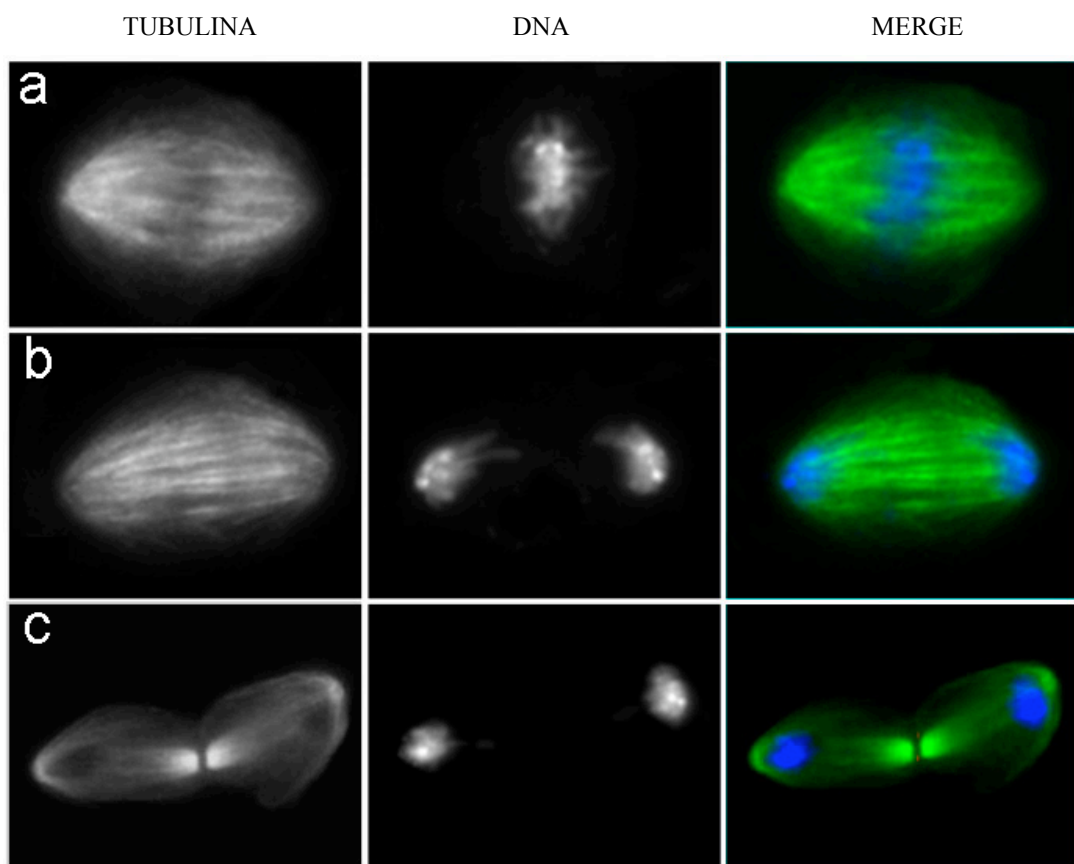


Figura 6. Preparati citologici di cellule in coltura S2 di *Drosophila* nelle principali fasi della mitosi, quali metafase (a), anafase (b) e telofase (c). Nell'ultima colonna la tubulina è in verde, il DNA in blu.

La mia attenzione è stata rivolta ad un gruppo di geni la cui inattivazione determina difetti nei movimenti dei cromosomi in mitosi. Nella Fig. 7 sono presentati i fenotipi citologici ottenuti per inattivazione di questa classe di geni. Si possono osservare evidenti difetti di congressione e segregazione: infatti, pur essendo il fuso mitotico ben organizzato, i

cromosomi non congregano in piastra metafisica. Successivamente, il fuso si allunga ed i cromosomi si muovono lungo i microtubuli, ma senza separazione dei cromatidi fratelli. Malgrado questi difetti, non vi è blocco della divisione e la mitosi procede fino agli stadi terminali dove si osservano sia ponti cromatidici che interi cromosomi che migrano verso i poli della cellula in divisione. Data la non risoluzione dei cromatidi fratelli non è corretto parlare di anafase e telofase, e quindi indicherò gli stadi successivi alla metafase in queste cellule come pseudoanafase e pseudotelofase.

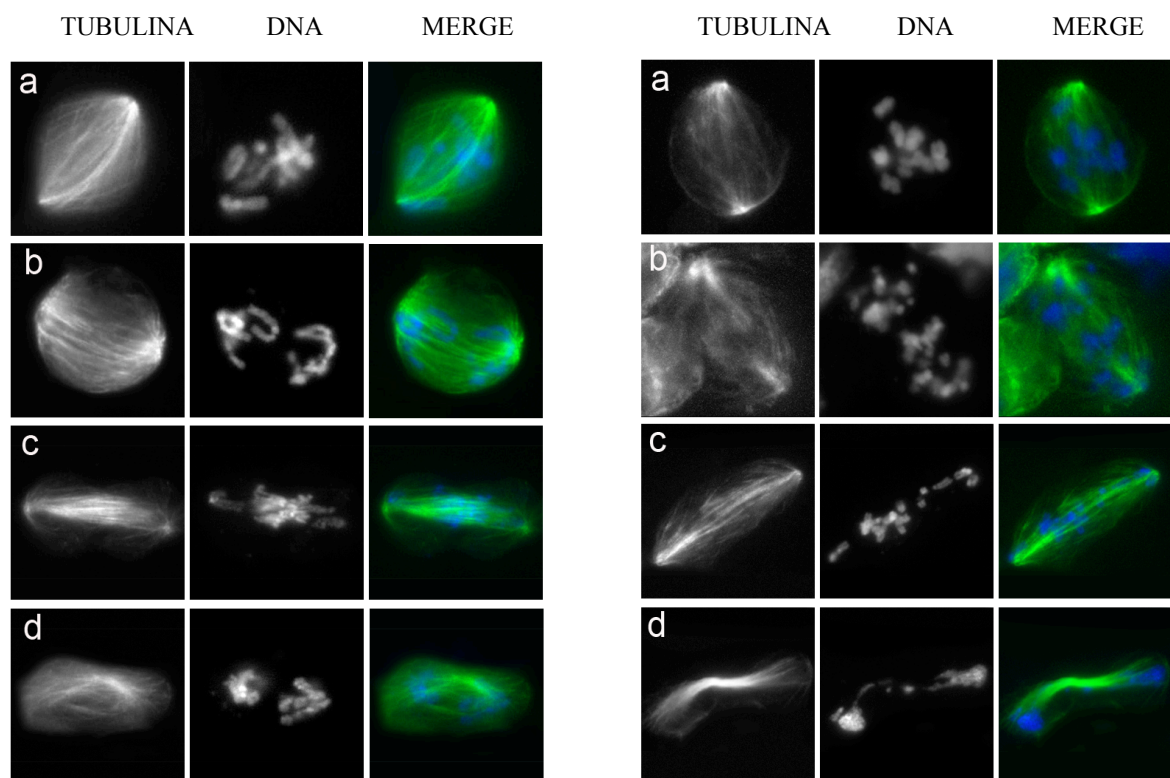


Figura 7. Esempi di fenotipi mitotici ottenuti mediante RNAi in cellule S2 di *Drosophila melanogaster*: (a) metafase; (b) pseudoanafase A; (c) pseudoanafase B; (d) pseudotelofase. Nell'ultima colonna la tubulina è in verde, il DNA in blu.

Nella tabella 2 sono elencati i geni che appartengono a questa classe fenotipica e le informazioni sulla probabile funzione delle proteine da essi codificate. Molte delle informazioni funzionali derivano da studi in uomo, ma possono essere considerate valide anche per le proteine di *Drosophila*, dato l'elevato grado di conservazione di cui parlerò in seguito.

Tabella 2.

Nome del gene in Drosophila	Funzione della proteina
<i>CG16941</i>	Processamento dell'mRNA
<i>U2af50</i>	Processamento dell'mRNA
<i>Dim1</i>	Processamento dell'mRNA
<i>CG6876</i>	Processamento dell'mRNA
<i>CG3605</i>	Processamento dell'mRNA
<i>CG6015</i>	Processamento dell'mRNA
<i>CG10754</i>	Processamento dell'mRNA
<i>CG5931</i>	Processamento dell'mRNA
<i>U2A</i>	Processamento dell'mRNA
<i>Ndc80 (Hec1-like)</i>	Legame al cinetocore
<i>Kmn1</i>	Legame al cinetocore
<i>Nuf-2</i>	Legame al cinetocore

Come si vede dalla Tabella 2, le proteine codificate da questi geni possono essere suddivise in base alla loro funzione in due gruppi: a) componenti del cinetocore, b) proteine coinvolte nel processamento dell'mRNA ("splicing").

Geni che codificano per proteine del cinetocore

Per questa classe di geni abbiamo instaurato una collaborazione con il prof. Mike Goldberg della Cornell University (Ithaca, USA). Mediante esperimenti di immunoprecipitazione e analisi di spettrometria di massa, il gruppo del prof. Goldberg ha identificato le proteine Ndc80/Hec1-like, KMN e Nuf-2 come componenti di un complesso, di cui fa parte anche la proteina cinetocorica ZW10 (v. Introduzione). La localizzazione di Ndc80/Hec1-like al cinetocore è stata confermata da esperimenti di immunocitologia in cui è stato utilizzato l'anticorpo anti Hec-1, da me generato (Fig. 8). Contemporaneamente altri gruppi hanno isolato e caratterizzato queste proteine come importanti componenti del cinetocore (Przewloka et al., 2007; Schittenhelm et al., 2007).

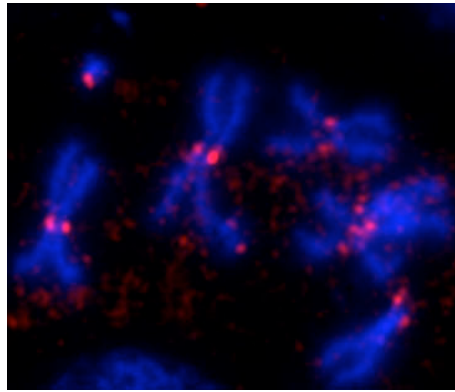


Figura 8. Localizzazione al cinetocore della proteina Ndc80/Hec1-like (rosso) su preparati cromosomici (DNA in blu) di neuroblasti larvali di *Drosophila melanogaster*.

Geni che codificano per fattori di “splicing”

Grazie all’uso della tecnica dell’RNA “interference” su cellule in coltura S2 di *Drosophila*, è stato possibile identificare anche un altro gruppo di geni importanti per la corretta segregazione dei cromosomi durante la mitosi.

L’inattivazione di questo secondo gruppo di geni provoca gli stessi difetti di congressione in piastra e di separazione dei cromosomi osservati in cellule interferite per i geni che codificano per proteine del cinetocore, suggerendo una funzione comune di questi geni durante la mitosi. Inizialmente ho preso in considerazione tutti i geni del secondo gruppo, ma in seguito, per poter condurre un’analisi più dettagliata, mi sono concentrata su 2 geni in particolare. I geni sono stati scelti in base alla penetranza del fenotipo dell’RNAi e sono *CG6876* e *CG10754*.

Ho condotto una prima analisi per stabilire se il cinetocore fosse correttamente assemblato e se fossero presenti le proteine del “checkpoint” del fuso in cellule trattate con dsRNA per questi geni. Ho quindi effettuato esperimenti di immunolocalizzazione in queste cellule per saggiare la presenza della proteina CENP-C, un componente costitutivo del cinetocore, delle proteine BubR1, ZW-10 e Cenp-meta, componenti del “checkpoint” del fuso (v. Introduzione).

CENP-C è associata stabilmente ai cromosomi durante tutto il ciclo cellulare ed è necessaria per un corretto assemblaggio del cinetocore, per la segregazione dei cromosomi e per la transizione metafase-anafase. Nei preparati citologici di cellule di controllo in prometafase e metafase si osserva un duplice segnale di immunofluorescenza sui cromosomi,

corrispondente ai due cromatidi fratelli. Quando avviene l'anafase il segnale diventa singolo in quanto in seguito alla degradazione delle coesine che tengono uniti i cromatidi fratelli, ogni cromatidio migra ad un polo della cellula (Fig. 9).

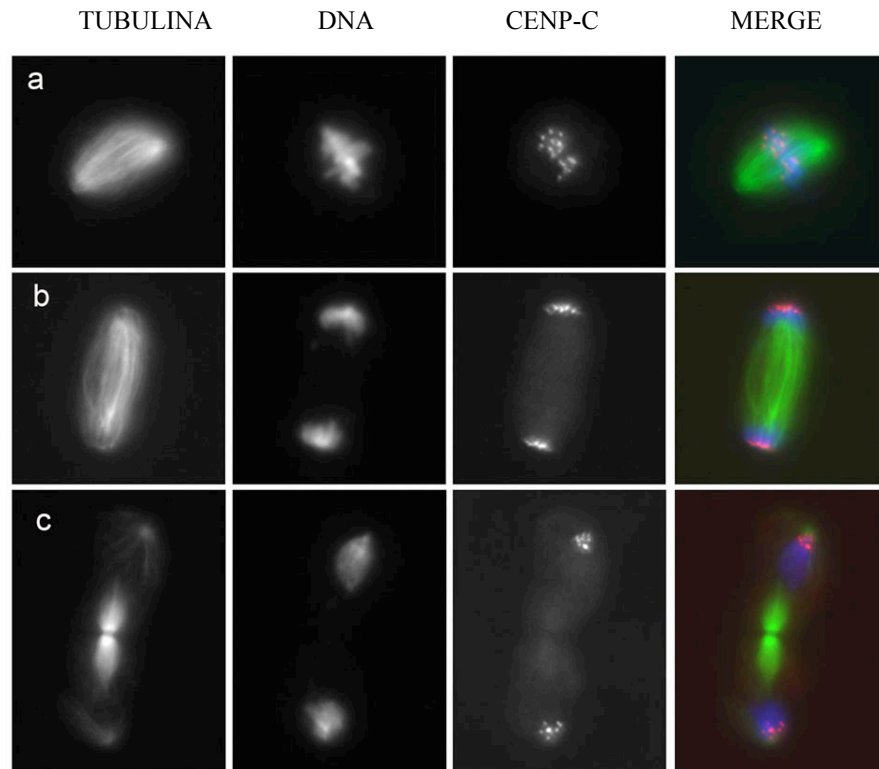


Figura 9. Localizzazione della proteina CENP-C in cellule di controllo: (a) metafase; (b) anafase; (c) telofase. Nell'ultima colonna la tubulina è in verde, il DNA in blu e CENP-C in rosso.

La conferma che nelle cellule interferite per i geni da me analizzati, i cromatidi non si separano, è stata ottenuta usando CENP-C come “marker” del cinetocore. Nelle pseudo-anafasi e nelle pseudo-telofasi, infatti è possibile osservare due segnali su ogni cromosoma, riconducibili ai due cinetocori dei cromatidi fratelli, fino agli stadi finali della mitosi (Fig. 10).

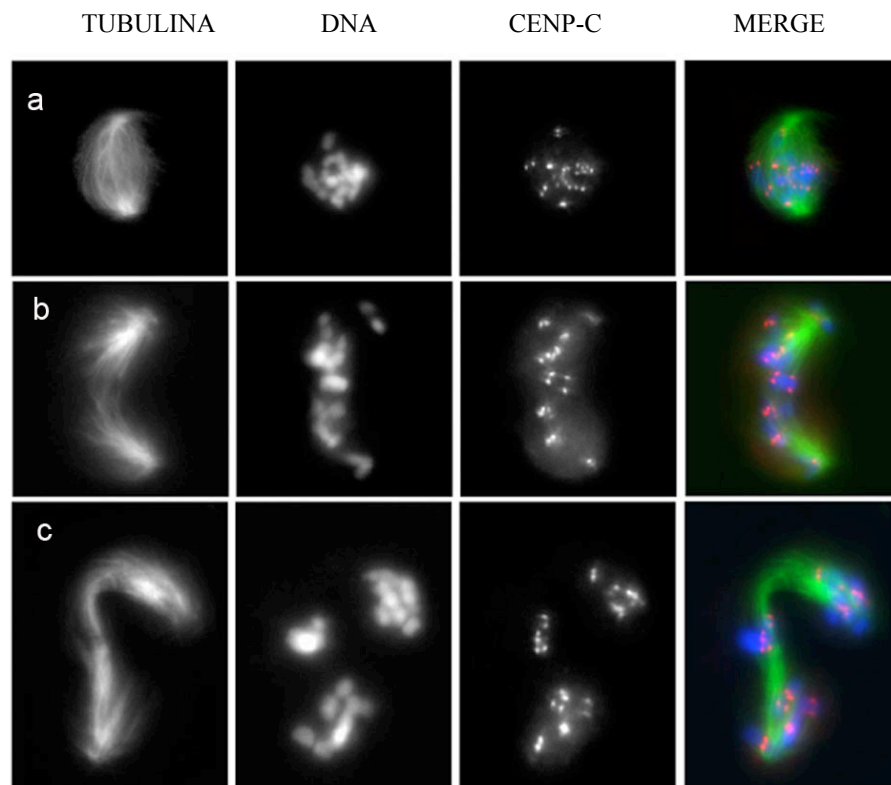


Figura 10. Localizzazione della proteina CENP-C in cellule interferite per *CG6876* e *CG10754*: (a) metafase; (b) pseudoanafase; (c) pseudotelofase. Nell'ultima colonna la tubulina è in verde, il DNA in blu e CENP-C in rosso.

La proteina BubR1, un componente essenziale del “checkpoint” del fuso, si lega ai cinetocori in prometafase nelle cellule di controllo. Una volta avvenuto il corretto legame dei microtubuli in metafase, BubR1 viene rimossa durante la transizione metafase-anafase. Negli stadi finali della mitosi il segnale di BubR1 è completamente assente (Fig 11).

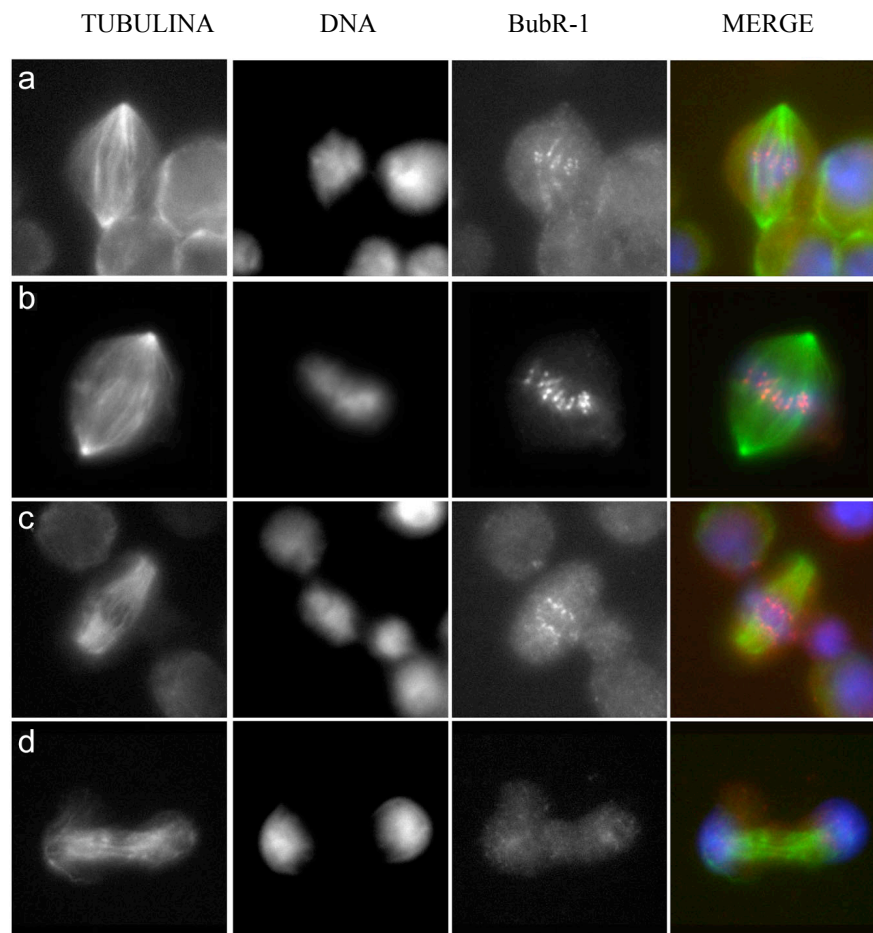


Figura 11. Localizzazione della proteina BubR1 in cellule di controllo: (a) prometafase; (b) metafase; (c) anafase precoce; (d) telofase. Nell'ultima colonna la tubulina è in verde, il DNA in blu e BubR1 in rosso.

Nelle cellule interferite, invece il segnale di BubR1 permane fino alla pseudo-telofase (Fig 12). Ciò indica che il “checkpoint” del fuso in queste cellule rimane attivo e quindi i cromatidi non possono essere separati. Infatti, la presenza di BubR1, impedendo il legame di Cdc20 al complesso APC/C, inibisce la degradazione della securina che mantiene così inattiva la separasi, l'enzima responsabile della degradazione delle coesine che tengono uniti i cromatidi fratelli. Inoltre la permanenza di BubR1 suggerisce che non c'è un attacco stabile dei microtubuli ai cinetocori in cellule interferite per questi geni.

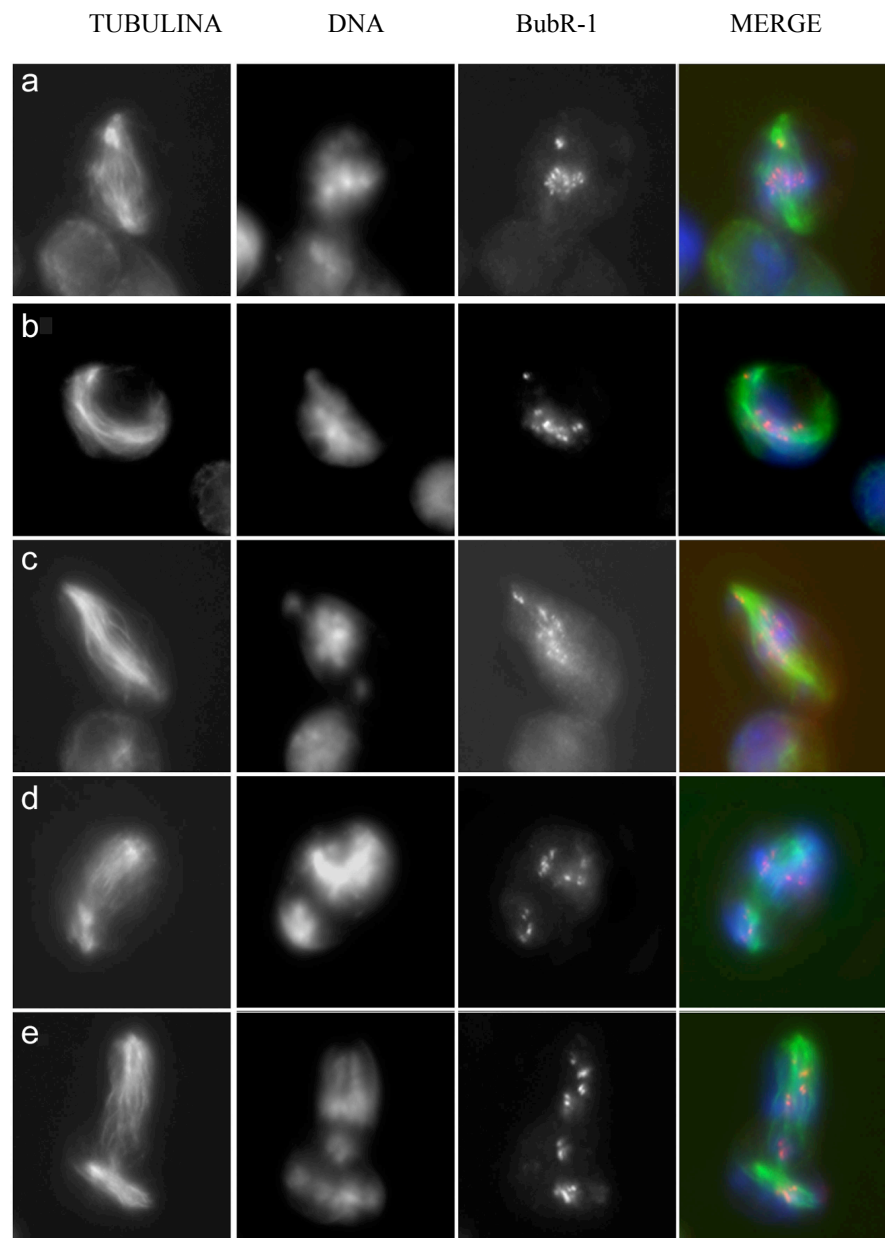


Figura 12. Localizzazione della proteina BubR1 in cellule interferite per *CG6876* e *CG10754*: (a) metafase; (b, c e d) pseudoanafasi; (e) pseudotelofase. Nell'ultima colonna la tubulina è in verde, il DNA in blu e BubR1 in rosso.

La proteina ZW-10, componente del complesso RZZ, si lega al cinetocore durante la prometafase, ma ha un comportamento molto dinamico, in quanto si muove lungo i microtubuli cinetocorici grazie all'azione del complesso dineina-dinactina (v. Introduzione). Questo movimento è chiamato “streaming”. Nelle cellule di controllo (Fig. 13) si può notare che in metafase il segnale della proteina è presente lungo i microtubuli e sul cinetocore per effetto dello “streaming”, in anafase il segnale è visibile solo ai cinetocori, mentre è fortemente ridotto in telofase.

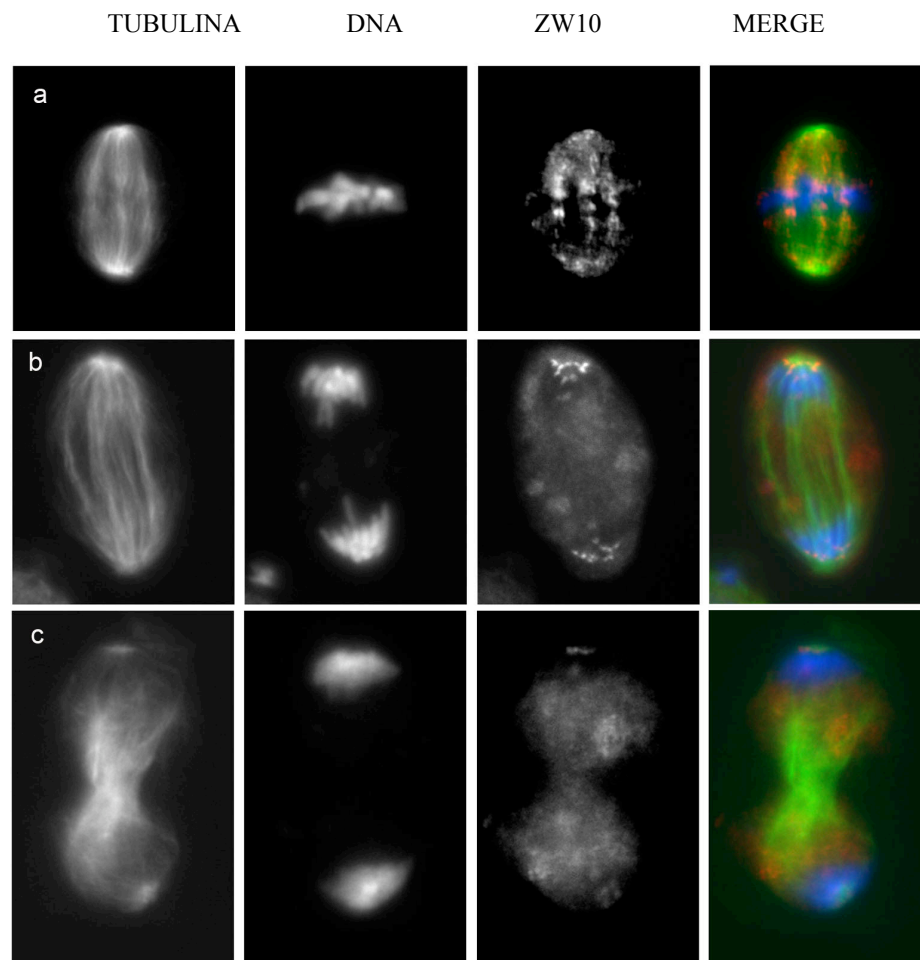


Figura 13. Localizzazione della proteina ZW-10 in cellule di controllo: (a) metafase; (b) anafase; (c) telofase. Nell'ultima colonna la tubulina è in verde, il DNA in blu e ZW10 in rosso.

Nelle cellule interferite non è stato osservato “streaming”: la proteina ZW-10 si localizza e colora solo i cinetocori, senza mai andare sui microtubuli del fuso, come mostrato nella Fig.14. Inoltre, rimane associata al cinetocore nelle pseudo-telofasi. Questi risultati confermano quanto ipotizzato dal comportamento di BubR1: in cellule interferite per *CG6876* e *CG10754* non si ha un corretto attacco dei microtubuli al cinetocore.

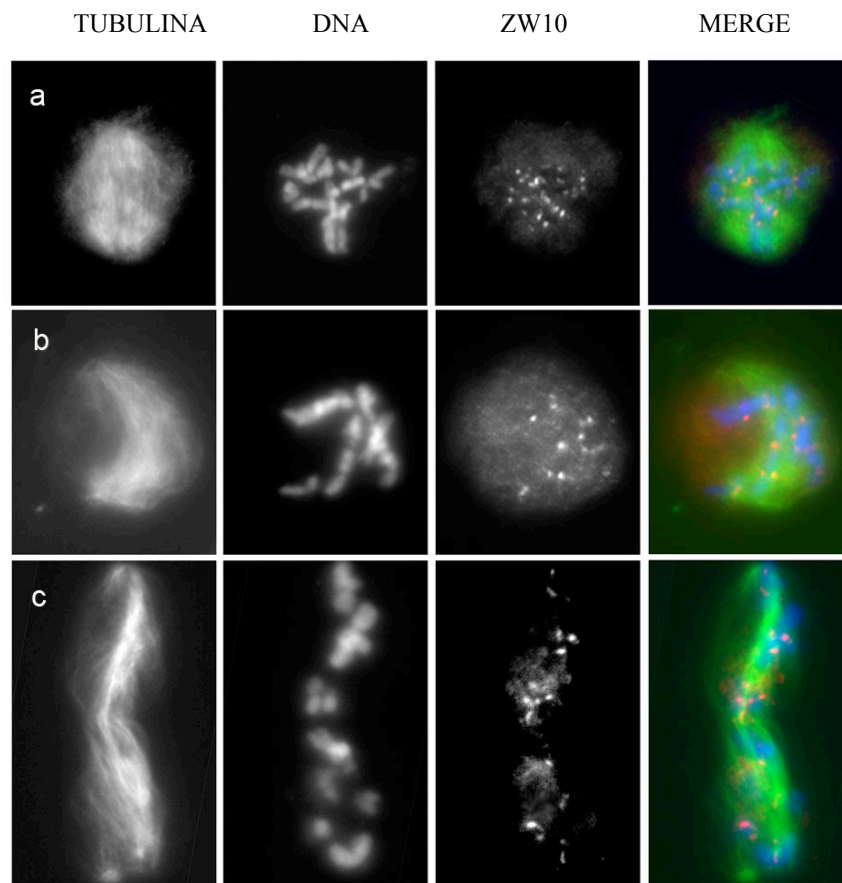


Figura 14. Localizzazione della proteina ZW-10 in cellule interferite per *CG6876* e *CG10754*: (a) metafase; (b) pseudoanafase; (c) pseudotelofase. Nell'ultima colonna la tubulina è in verde, il DNA in blu e ZW10 in rosso.

Cenp-meta (ortologo di *Drosophila* della proteina CENP-E umana) è una chinesina necessaria per il legame dei microtubuli al cinetocore. Cenp-meta in cellule di controllo ha un comportamento simile a quello osservato per altre proteine del “checkpoint” del fuso: è presente sui cinetocori dalla prometafase e viene rimossa all'entrata in anafase (Fig.15).

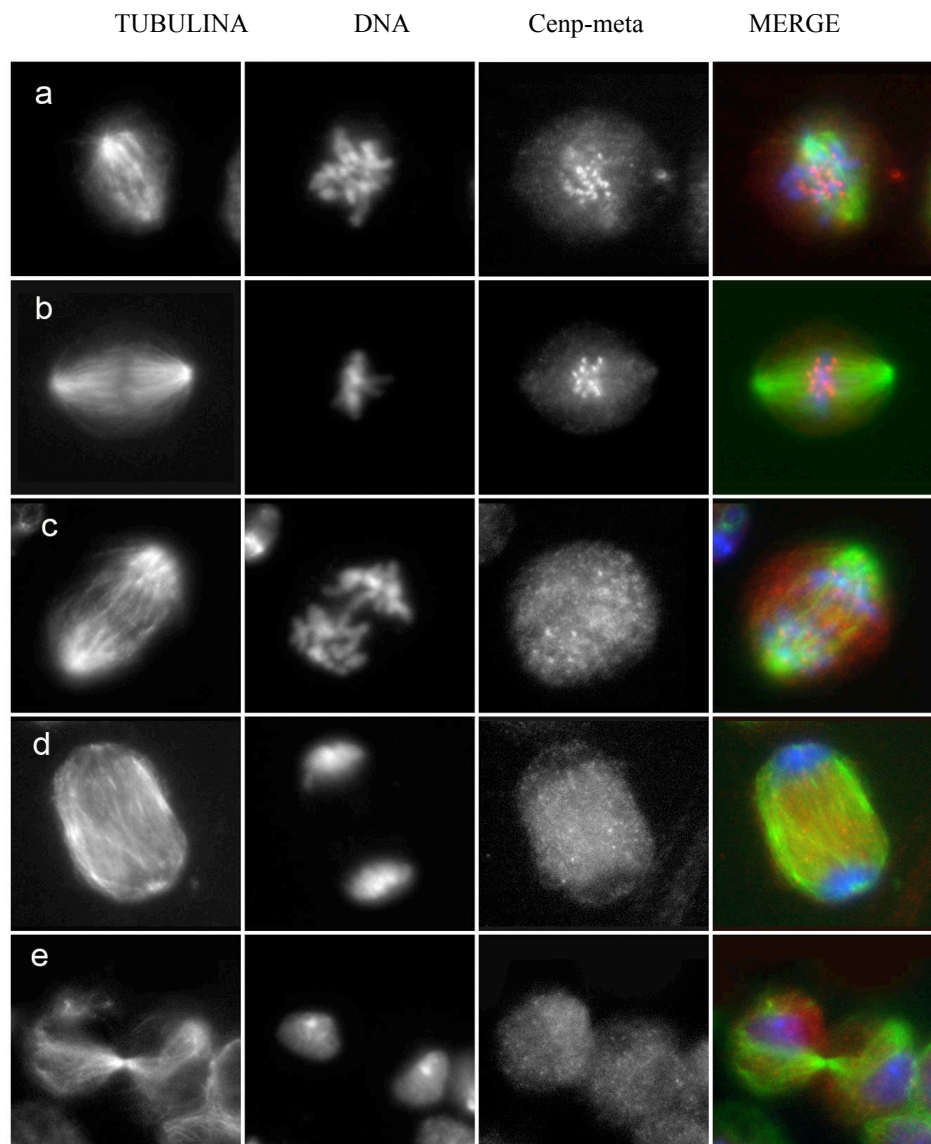


Figura 15. Localizzazione della proteina Cenp-meta in cellule di controllo: (a) prometafase; (b) metafase; (c, d) anafasi; (e) telofase. Nell'ultima colonna la tubulina è in verde, il DNA in blu e Cenp-meta in rosso.

Nelle cellule interferite per i geni da me studiati, la localizzazione di Cenp-meta risulta alterata. Infatti il segnale di immunofluorescenza appare meno forte in profase e in metafase rispetto al segnale osservato nelle cellule di controllo (Fig.16). Cenp-meta è l'unica proteina che mostra difetti nella localizzazione nelle cellule interferite per *CG6876* e *CG10754* ed, essendo necessaria per una corretta interazione microtubuli-cinetocore, conferma l'ipotesi che in queste cellule è proprio tale interazione ad essere difettosa.

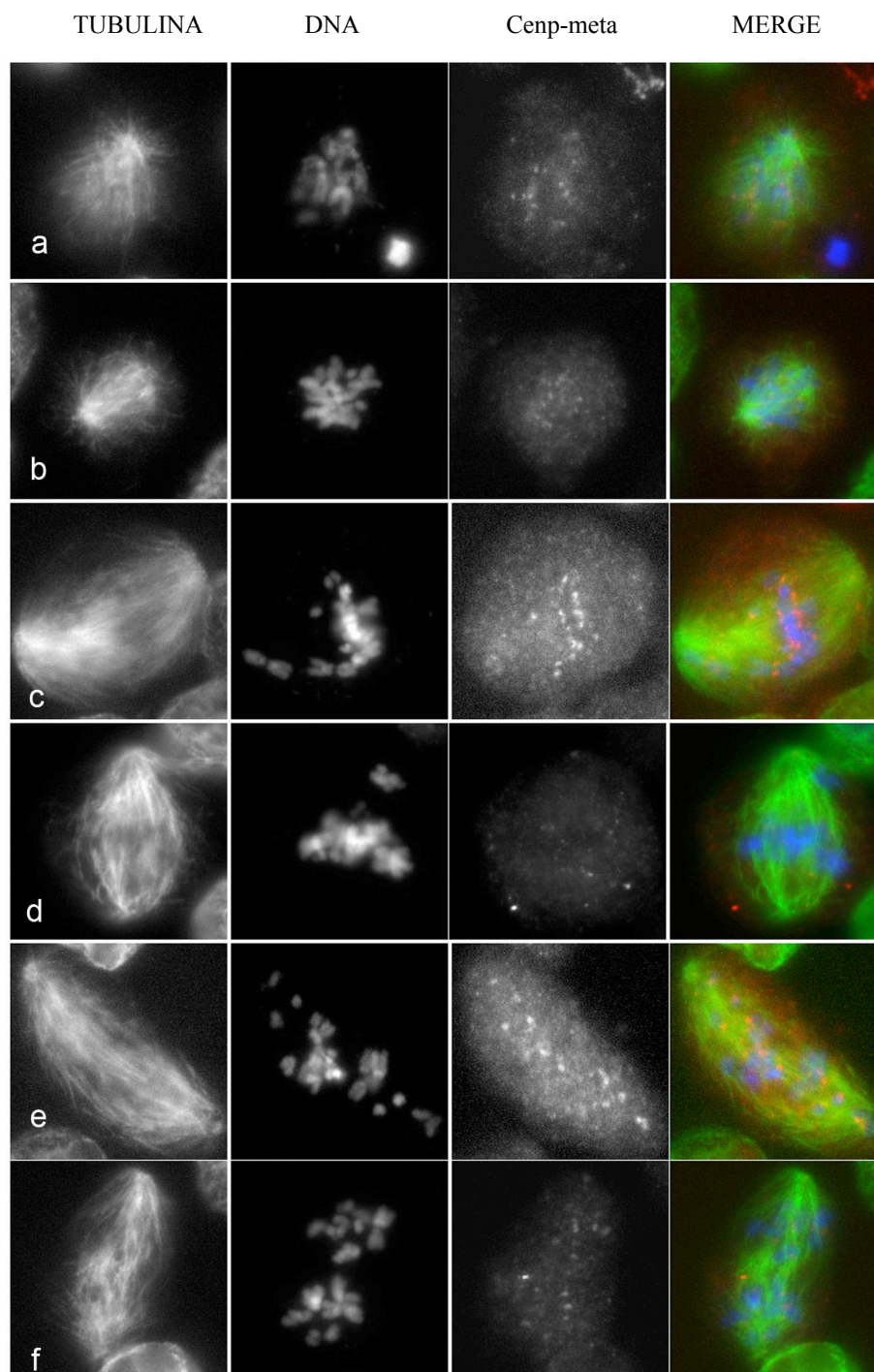


Figura 16. Localizzazione della proteina Cenp-meta in cellule interferite per *CG6876* e *CG10754*: (a, b) prometafase; (c, d) metafase; (e, f) pseudoanafasi. Nell'ultima colonna la tubulina è in verde, il DNA in blu e Cenp-meta in rosso.

Da questi esperimenti di immunolocalizzazione possiamo concludere che, nelle cellule interferite per *CG6876* e *CG10754*, il cinetocore è correttamente assemblato in quanto sono presenti sia le proteine costitutive, come CENP-C, che le proteine del “checkpoint”. La permanenza di BUBR1 sui cromosomi fino alla telofase, l’assenza di “streaming” della proteina ZW-10 e la forte riduzione della proteina Cenp-meta al cinetocore suggeriscono che in cellule prive delle proteine codificate dai geni *CG6876* e *CG10754* sia compromessa la funzione cinetocorica di legare i microtubuli.

Analisi delle caratteristiche strutturali delle proteine codificate dai geni *CG6876* e *CG10754*

L’analisi delle strutture primarie delle proteine codificate dai geni effettuata utilizzando il programma BLAST nel database del National Center for Biotechnology Information (NCBI), che contiene le sequenze dei geni di tutti gli organismi finora sequenziati, ha permesso di ottenere informazioni sulla possibile funzione di questi geni di *Drosophila*. Infatti, i geni di *Drosophila*, che fanno parte del gruppo funzionale da me analizzato, sono altamente conservati in tutti gli organismi, come mostrato in Tabella 3, dove ho indicato il nome delle proteine ortologhe umane di questi geni.

Tabella 3.

Gene di <i>Drosophila</i>	Gene omologo in uomo	Funzione della proteina umana
<i>CG16941</i>	<i>SF3A1 (Sap114)</i>	Subunità del fattore di “splicing” SF3A
<i>U2af50</i>	<i>U2af65</i>	Subunità del fattore di “splicing” U2AF
<i>Dim1</i>	<i>TXN4A</i>	Subunità del complesso U5snRNP
<i>CG6876</i>	<i>PRPF31</i>	Subunità del complesso U4/U6.U5
<i>CG3605</i>	<i>SAP145</i>	Subunità del fattore di “splicing” SF3B
<i>CG6015</i>	<i>Prp17/CDC40</i>	Subunità del fattore di “splicing” C
<i>CG10754</i>	<i>SF3A2</i>	Subunità del fattore di “splicing” SF3A
<i>CG5931</i>	<i>U5snRNP-200kD</i>	RNA elicasi coinvolta nello “splicing”
<i>U2A</i>	<i>U2A (SNRPA1)</i>	Proteina associata con gli sn-RNP U2

Lo “splicing” è un processo complesso e finemente regolato che avviene nel nucleo e che porta alla produzione di mRNA da un trascritto primario di RNA mediante escissione delle sequenze interne non codificanti (v. Discussione). Per tutte le proteine umane ci sono evidenze sperimentali sul ruolo che svolgono nel processo dello “splicing”. In *Drosophila*, solo alcune di queste proteine sono state singolarmente studiate (quelle codificate da *U2AF50*, da *CG16941* e da *CG5931*) ed identificata la loro funzione come fattori di “splicing”. Per tutte le altre, tale funzione è ipotizzata per la presenza di domini già noti per essere caratteristici di proteine coinvolte nel processamento dell’ mRNA e soprattutto per l’alto grado di omologia che presentano con le proteine ortologhe umane.

I 2 geni studiati in dettaglio nel mio lavoro di tesi sono indicati in grassetto.

La proteina codificata dal gene *CG6876* di *Drosophila melanogaster*

L’allineamento della sequenza degli amminoacidi della proteina codificata dal gene *CG6876* di *Drosophila* con la sequenza della proteina PRPF31 umana (“Pre-mRNA Processing Factor 31”), effettuata con il programma CLUSTALW, mostra un’alta percentuale di omologia. (identità 60%, similitudine 96%) lungo tutta la sequenza polipeptidica (Fig. 17).

1. Dmel PRPF31-like vs. Human PRPF31

Dmel PRPF31	1	MSLADELLADLEEDNDNELEEEEDSEMASAEDESLLAEKLAKPAPNLMDVD
Human PRPF31	1	MSLADELLADLEEEAAE---EEEGGSYGEEEEE-----PAIEDVQEETQLD
		***** . *** *.* .*
Dmel PRPF31	51	VTVQSVRELCKLRDSERLKNTLQQIEHYASRQRTAAEMLGSVESDPEYCL
Human PRPF31	43	LSGDSVKTIAKLWDSKMF AEIMMKIEEYISKQAKASEVMGPVEAAPEYRV
		.. **. .*** ** . .** * *. *.*.* ** .*** .
Dmel PRPF31	101	IVDANAIAVDIDNEISIVHKFTKEYQKRFPELD SLIVGEIEYLLAVKEL
Human PRPF31	93	IVDANNLTVEIENELNIHKFIRDKYSKRFPESLVPNALDYIRTVKEL
		***** .*.*.***. *.*** .** *****.*. . .*. .****
Dmel PRPF31	151	GNDLDQVKNEKLQAILTQATIMIVSVTASTTQGTMLTPAEKAKIDEACE
Human PRPF31	143	GNSLDKCKNNENLQQILT NATIMVSVTASTTQGQQLSEEELERLDEACD
		** *. *.*. ***** ** *.***.*****.***** * . * .*****.

Dmel PRPF31	201	MAIELNNFKSKIYEVESRMTFIAPNLSMIVGASTAAKLLGIAGGLSKLS
Human PRPF31	193	MALELNASKHRIYEVESRMSFIAPNLSIIIGASTAAKIMGVAGGLTNLS
		.* ** * .***.******.*.*****.*.*****.* **
Dmel PRPF31	251	KMPACNVQVLGAQKKTLSGFSQTQMLPHTGYVYYSQIVQDTAPDLRRKAA
Human PRPF31	243	KMPACNIMLLGAQRKTLGFSSTSVLPHTGYIYHSDIVQSLPDLRRKAA
		*****.*.*****.******.*.*****.* ** *****
Dmel PRPF31	301	RLVAAKSVLAARVDACHESVHGEIGLRFKEDVEKKLDKLQEPVPVKFIKP
Human PRPF31	293	RLVAAKCTLAARVDSFHSTEGKVGVELKDEIERKFDKWQEPVPVKQVKP
		*****.*.*****.* ** *.* *..*.* ** *****.* **
Dmel PRPF31	351	LPKPIEGSKKKRGKRVKMKERYALTEFRKQANRMNFGDIEEDAYQGD
Human PRPF31	343	LPAPLDGQRKKRGGRYRKMERLGLTEIRKQANRMSFGEIEEDAYQEDL
		** *..* .*****.* ***** ** ***** **.****** **
Dmel PRPF31	401	GYSRGTIGKTGTGRIRLPQVDEKTKVRISKTLHKNLQKQ-QVYGGNTTVK
Human PRPF31	393	GFSLGHLGKSGSGRVRQTQVNEATKARISKTLQRTLQKQSVVYGGKSTIR
		. * .**.*.*.* * ** * ** *****.*..***** ** **.*..
Dmel PRPF31	450	RQISGTASSVAFTPLQGLEIVNPQAAERSQTEANAKYFSNTSGFMSVGQR
Human PRPF31	443	DRSSGTASSVAFTPLQGLEIVNPQAAEKVAEANQKYFSSMAEFLKVKGE
		. *****.******.*.*** ** ** .*. *
Dmel PRPF31	500	TT 501
Human PRPF31	493	KSGLMST 499
		.

Figura 17. Allineamento della sequenza della proteina PRPF31-like di *Drosophila* con la proteina PRPF1 umana. (★= amminoacidi identici; .= aminoacidi simili)

In uomo questo gene codifica per una proteina che interagisce con i piccoli RNA nucleari (“small nuclear RNA”) ed in particolare promuove l’associazione tra U4/U6 snRNP e U5 snRNP. Nel nucleoplasma, l’U4-U6 snRNP, insieme a U5 snRNP, si lega all’U1 e allo snRNPs di U2 per formare lo “spliceosoma”, il principale complesso catalizzatore del processo di “splicing” (v. Discussione). È stato dimostrato che PRPF31 è coinvolta nello “splicing” del pre-mRNA del gene della rodopsina e due mutazioni di questo gene sono considerate la causa di un tipo di Retinite Pigmentosa. La Retinite Pigmentosa, indicata anche con l’acronimo RP, è una malattia genetica dell’occhio in cui le anomalie dei fotorecettori (coni e bastoncelli) o dell’epitelio pigmentoso retinico, o della retina stessa, provocano una progressiva emeralopia, con diminuzione del campo visivo, che in genere evolve lentamente verso la cecità. La proteina codificata dal gene *CG6876* di *Drosophila* è stata da me denominata PRPF31-like.

La proteina codificata dal gene *CG10754* di *Drosophila melanogaster*

Il secondo gene che ho studiato più in dettaglio codifica per una proteina anch'essa fortemente conservata, soprattutto nella parte ammino-terminale, come si può notare dall'allineamento delle sequenze degli amminoacidi della proteina codificata da *CG10754* di *Drosophila* con la proteina umana ortologa (Fig. 18).

1. Dmel SF3A2 vs. Human SF3A2

```

Dmel SF3A2      1 MDFQNRAGGKTGSGGVASWSETNRDRKERLRQLALETIDLNKDPYFMKNH
Human SF3A2     1 MDFQHRPGGKTGSGGVASSSESNRDRRERLRQLALETIDINKDPYFMKNH
                ****.* ***** **.*****.******.******

Dmel SF3A2     51 LGSYECKLCLTLHNNEGSYLAHTQGKKHQDNLARRAAKEAKEAPSSLLAP
Human SF3A2     51 LGSYECKLCLTLHNNEGSYLAHTQGKKHQTNLARRAAKEAKEAP-AQPAP
                *****.******.******.******

Dmel SF3A2    101 EKPRVEPKKFVKIGRPGYRVTKQRELSNGQQSLLFQVDYPEITESIVPRH
Human SF3A2    100 EKVKVEVKKFVKIGRPGYKVTQORDSEMGQSLLFQIDYPEIAEGIMPRH
                **.* *****.******.******.******

Dmel SF3A2    151 RFMSAYEQKIEPPDRKWQYLLFAAEPYETIGFKVPSREVEKSEGKFWTHW
Human SF3A2    150 RFMSAYEQRIEPPDRRWQYLLMAAEPYETIAFKVPSREIDKAEGKFWTHW
                *****.******.******.******

Dmel SF3A2    201 NRDTKQFFLQFAFKFEPKILPP-----PPPNLHRALGP-----
Human SF3A2    200 NRETKQFFLQFHFKMEKPPAPPSLPAGPPGVKRPPLMNLPPRPLPE
                **.****** **.* *****.******.******

Dmel SF3A2    234 -----PGGFMP-----GPP-----
Human SF3A2    250 SLPPPPPGGLPLPMPPTGPAPSGPPGPPQLPPPAPGVHPPAPVVHPPAS
                ***.* *****

Dmel SF3A2    244 -----
Human SF3A2    300 GVHPPAPGVHPPAPGVHPPAPGVHPPTSGVHPPAPGVHPPAPGVHPPAPG

Dmel SF3A2    244 -----RPA
Human SF3A2    350 VHPPAPGVHPPAPGVHPPPSAGVHPQAPGVHPPAAPAVHPQAPGVHPPAPG
                *

Dmel SF3A2    247 MHPMFNGVHP-PP-----PMLSNN
Human SF3A2    400 MHPQAPGVHPQPPGVHPSAPGVHPQPPGVHPSNPGVHPPTMPMPMLRPPL
                *** ***** **.******

Dmel SF3A2    265
Human SF3A2    450 PSEGPGNIPPPPTN 464

```

Figura 18. Allineamento della sequenza della proteina SF3A2-like di *Drosophila* con la proteina SF3A2 umana. (★= amminoacidi identici; .= amminoacidi simili)

Il gene omologo in uomo, *SF3A2*, codifica per un fattore di “splicing” richiesto per la formazione del “pre-spliceosoma” e della subunità 17S degli U2 snRNP (v. Discussione). La proteina codificata dal gene *CG10754* di *Drosophila* è stata da me denominata SF3A2-like.

Produzione di anticorpi contro le proteine PRPF31-like e SF3A2-like di *Drosophila melanogaster*

Per studiare la funzione di queste proteine ho deciso di generare degli anticorpi. A questo scopo ho clonato le regioni terminali di questi due geni in pET200 (Invitrogen), un vettore di espressione in cellule batteriche. Nella Tabella 4 sottostante sono indicate la lunghezza delle sequenze codificanti dei due geni e la regione da me clonata per la produzione di una proteina nei batteri.

Tabella 4.

Nome del gene	Lunghezza sequenza codificante in paia di basi/aa	PM atteso	Regione clonata per produzione proteina
<i>PRPF31-like</i>	1503 bp/ 501aa	65 kDa	Pos. 750 - pos. 1503
<i>SF3A2-like</i>	798 bp/ 266aa	35 kDa	Pos. 48 - pos. 798

Il vettore pET200, da me usato, contiene a monte del sito di clonaggio un promotore inducibile, il promotore *Lac0*. Questo promotore, in presenza di IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalattopiranoside) un analogo del lattosio, viene attivato ed induce così la trascrizione delle sequenze a valle. Essendo un promotore molto forte, si ottiene una notevole produzione della proteina codificata dalla sequenza clonata. Il vettore pET200 contiene, inoltre, una sequenza codificante per 6 istidine (6-His Tag) che viene clonata nello stesso registro di lettura della proteina che si vuole produrre. In questo modo la proteina sintetizzata avrà un breve regione di 6 istidine che non interferisce con la sua funzione, ma ne permette l'individuazione mediante uno specifico anticorpo anti-6His. Una volta ottenute le proteine parziali codificate dalle regioni dei geni che ho preso in esame, le ho inviate ad una ditta specializzata nella produzione di anticorpi, che le ha iniettate in coniglio. Ho così ottenuto 2 sieri di coniglio contenenti gli anticorpi corrispondenti. Per saggiare la presenza di anticorpi specifici contro le proteine da me prodotte, ho effettuato degli esperimenti di “western

blotting” con estratti di cellule S2 di *Drosophila*. In tutti gli esperimenti ho osservato la comparsa di una banda con un PM apparente corrispondente al PM teorico atteso delle proteine PRPF31-like e SF3A2-like (v. Tabella 4; Fig.20).

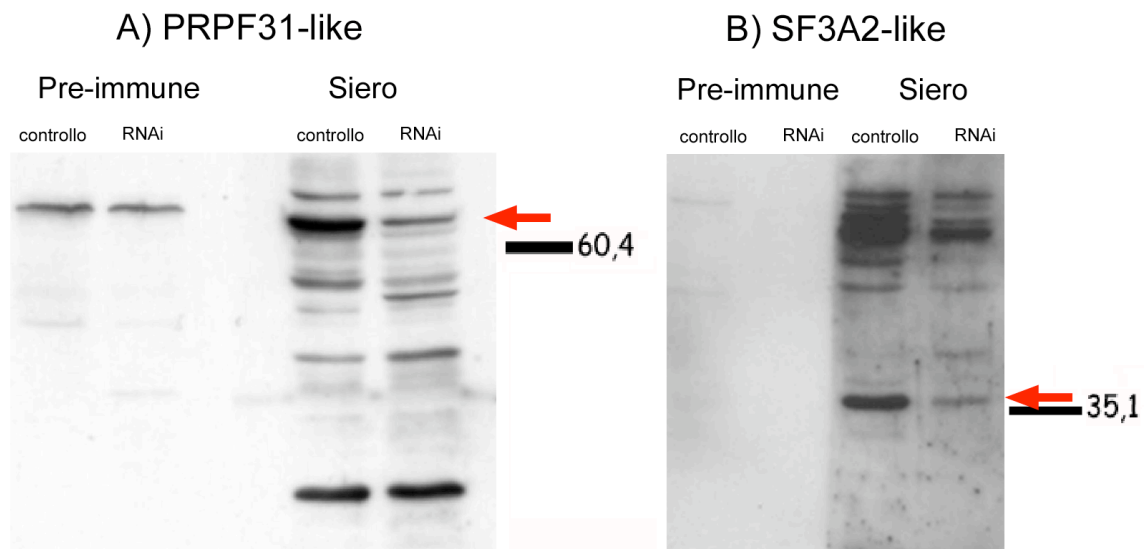


Figura 20. Esperimenti di “western blotting” con sieri di coniglio prima dell’immunizzazione (pre-immune), e sieri di coniglio dopo immunizzazione contro le proteine PRPF31-like (A) e SF3A2-like (B).

La presenza di bande diverse ha suggerito la necessità di purificare gli anticorpi per immunoaffinità (v. Materiale e Metodi). Tali anticorpi purificati sono poi stati nuovamente saggiati per “western blotting” con estratti sia di cellule di controllo che di cellule trattate con dsRNA specifico per ogni gene (Fig. 21). In tutti gli esperimenti si osserva la comparsa di un’unica banda nelle corsie contenenti estratti di cellule di controllo, che scompare nelle corsie contenenti estratti di cellule trattate con dsRNA specifici. Questi risultati confermano che gli anticorpi da me prodotti riconoscono specificamente le proteine PRPF31-like e SF3A2-like di *Drosophila melanogaster*.

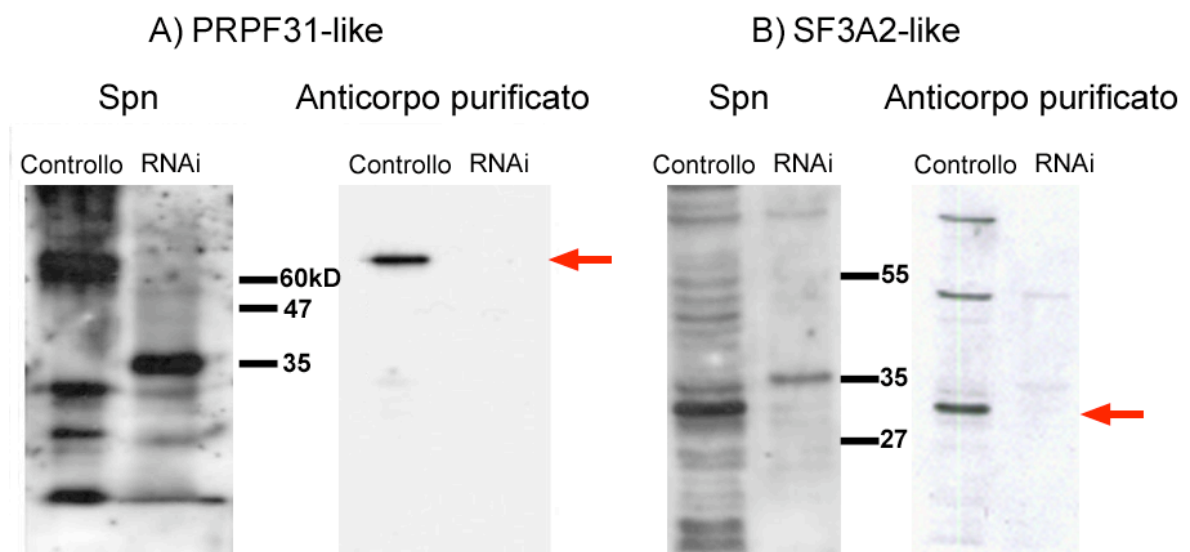


Figura 21. Esperimenti di “western blotting” con anticorpi purificati su estratti di cellule di controllo e di cellule trattate con dsRNA specifico per ogni gene.

Analisi delle interazioni delle proteine PRPF31-like e SF3A2-like

L’analisi delle strutture primarie suggerisce fortemente che le proteine PRPF31-like e SF3A2-like siano coinvolte nel processamento di RNA nucleari. Per saggiare la loro capacità di interazione reciproca ho condotto degli esperimenti di co-immunoprecipitazione (co-IP) con gli anticorpi purificati contro la proteina PRPF31-like e contro la proteina SF3A2-like. In questi esperimenti gli anticorpi anti PRPF31-like e anti SF3A2-like sono stati legati ad una resina ed incubati con estratti di cellule di controllo. Nel caso in cui le proteine PRPF31-like e SF3A2-like facciano parte di un complesso, sarà possibile isolare tutte le proteine del complesso attraverso il legame specifico proteina-anticorpo-resina. Una semplice centrifugazione permetterà di separare la resina con il complesso proteico dalle altre proteine cellulari che non interagendo con PRPF31-like e con SF3A2-like rimarranno in soluzione (tale frazione sarà indicata come supernatante, spn, nelle figure). Il campione così ottenuto sarà poi saggiato per “western blotting” per identificare le proteine che interagiscono con PRPF31-like e con SF3A2-like. Nella Figura 22 A è mostrato il risultato dell’esperimento di co-immunoprecipitazione dove ho usato come sonda l’anticorpo anti PRPF31-like: ho

ottenuto una stessa banda nelle corsie dove erano presenti le resine legate con i due anticorpi da me indotti. Ho così dimostrato che la proteina PRPF31-like interagisce con SF3A2-like.

Inoltre, dato che l'analisi citologica illustrata precedentemente ha suggerito che PRPF31-like e SF3A2-like sono coinvolte nel legame microtubuli-cinetocore, ho voluto saggiare se queste due proteine interagiscono con la proteina Ndc80/Hec1-like. Nella Figura 22 B è mostrato il risultato dell'esperimento di co-immunoprecipitazione dove ho usato come sonda l'anticorpo contro la proteina Ndc80: la presenza di una banda nelle corsie contenenti le resine legate con i due anticorpi anti PRPF31-like e anti SF3A2-like dimostra che Ndc80 interagisce con PRPF31-like e SF3A2-like.

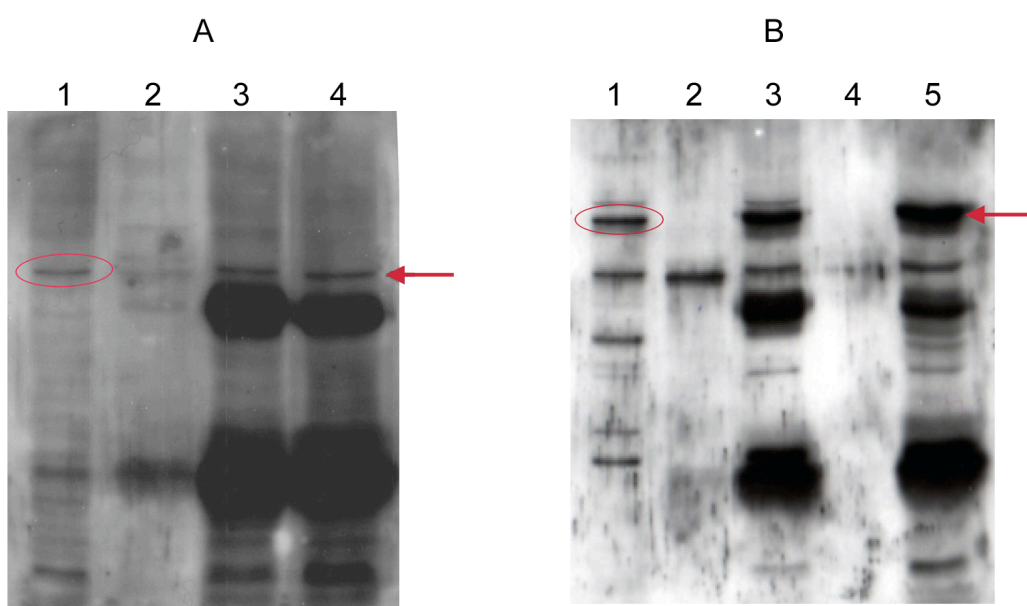


Figura 22. A) Esperimento di co-IP utilizzando come sonda l'anticorpo anti PRPF31-like. (1) estratto totale; (2) supernatante della resina con anticorpo anti SF3A2-like; (3) resina con anticorpo anti SF3A2-like; (4) resina con anticorpo anti PRPF31-like. B) Esperimento di co-IP utilizzando come sonda l'anticorpo anti Ndc80/Hec1-like. (1) estratto totale; (2) supernatante della resina con anticorpo anti PRPF31-like; (3) resina con anticorpo anti PRPF31-like; (4) supernatante della resina con anticorpo anti SF3A2-like; (5) resina con anticorpo anti SF3A2-like.

Analisi della localizzazione intracellulare delle proteine PRPF31-like e SF3A2-like

Ho usato gli anticorpi purificati per esperimenti di immunofluorescenza su cellule in coltura di *Drosophila* ed, in accordo con gli esperimenti di co-IP, ho riscontrato che la localizzazione intracellulare di entrambi le proteine è molto simile.

In interfase i segnali di immunofluorescenza colorano i nuclei delle cellule, suggerendo che le due proteine hanno una localizzazione prettamente nucleare, risultato atteso in base al loro possibile coinvolgimento nello “splicing”. Nei primi stadi della mitosi si osserva una colorazione diffusa, mentre in metafase il segnale è più forte intorno ai cromosomi. In anafase le proteine hanno nuovamente una localizzazione diffusa ed in tarda telofase, il segnale ritorna esclusivamente nucleare (Fig. 23 e Fig. 24).

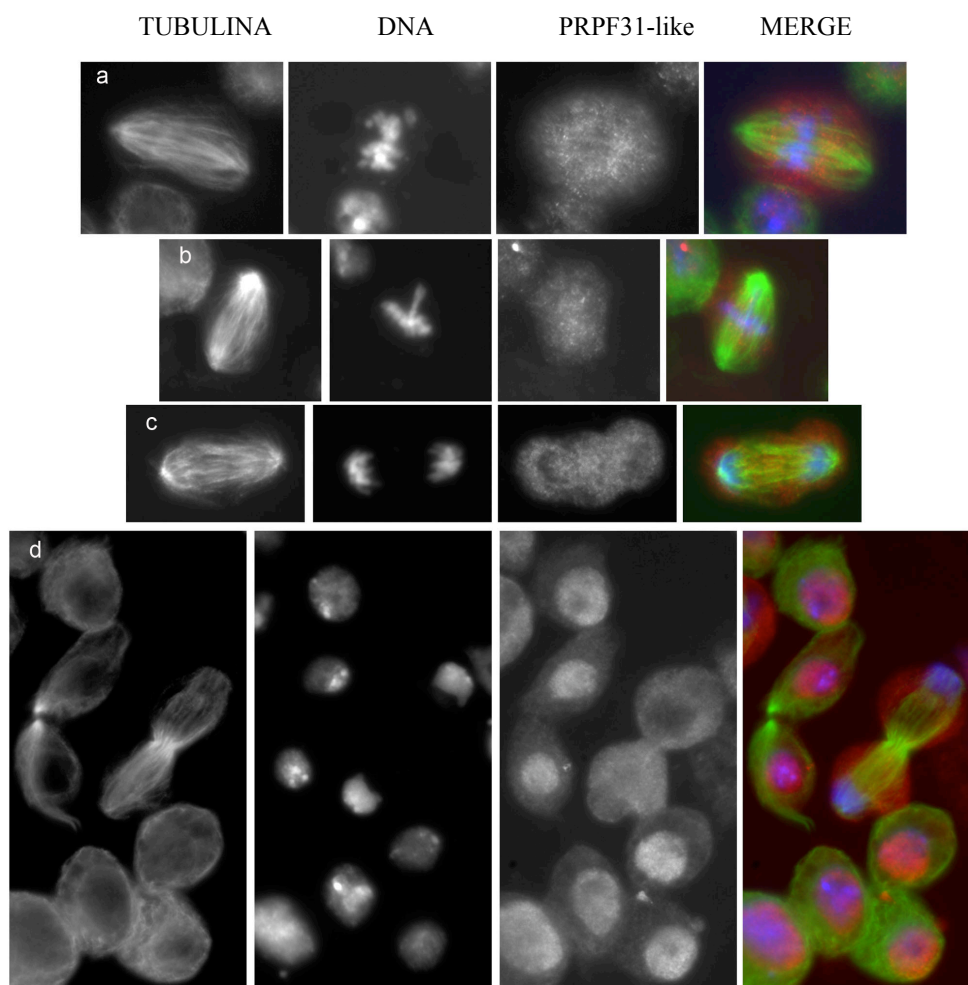


Figura 23. Localizzazione della proteina PRPF31-like in preparati citologici di cellule S2 di *Drosophila*. (a e b) metafase; (c) anafase; (d) telofasi; notare il differente segnale negli stadi terminali della mitosi: nella telofase a destra (telofase precoce) il segnale è ancora diffuso, come in (c) , mentre nella telofase a sinistra (telofase tardiva), il segnale ritorna nucleare. Nell’ultima colonna la tubulina è in verde, il DNA in blu e PRPF31-like in rosso.

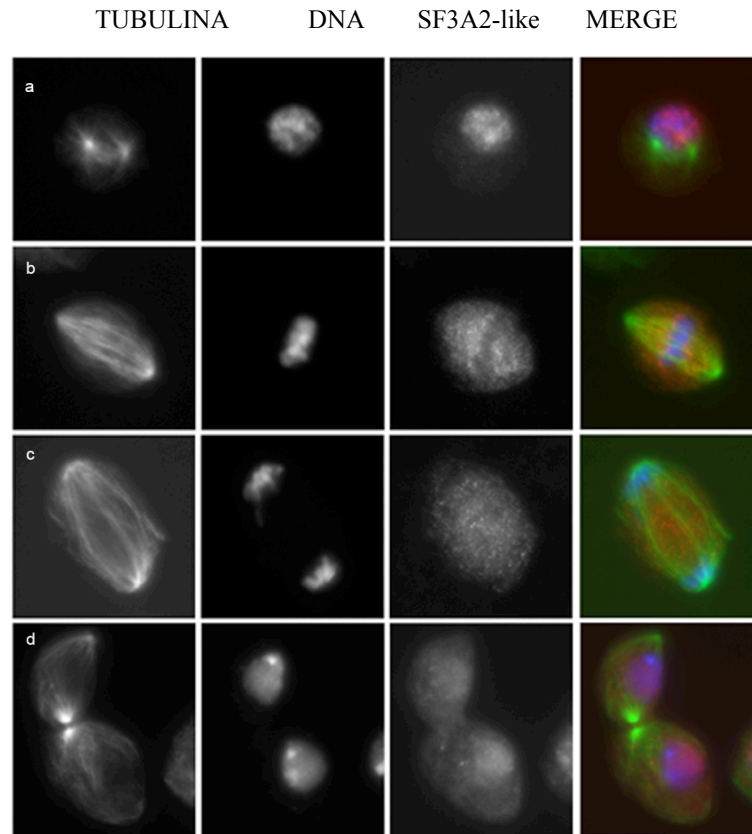


Figura 24. Localizzazione della proteina SF3A2-like in preparati citologici di cellule S2 di *Drosophila*. (a) profase; (b) metafase; (c) anafase; (d) telofase. Nell'ultima colonna la tubulina è in verde, il DNA in blu e SF3A2-like in rosso.

Analisi della localizzazione intracellulare delle proteine PRPF31-like e SF3A2-like *in vivo*

Per studiare il comportamento di queste proteine all'interno della cellula *in vivo*, ho clonato le intere sequenze codificanti di PRPF31-like e SF3A2-like nel vettore pAWR che contiene la sequenza che codifica per una proteina fluorescente, la RFP (“Red Fluorescent Protein”), sotto il controllo di un promotore specifico di *Drosophila*. Mettendo nello stesso registro di

lettura la sequenza di PRPF31-like e SF3A2-like con quella della RFP, è possibile ottenere la sintesi di proteine ibride fluorescenti. Ho trasfettato questi vettori in cellule S2 di *Drosophila* che contengono a loro volta un plasmide codificante per una tubulina marcata con GFP (“Green Fluorescent Protein”). Usando un particolare microscopio a fluorescenza, equipaggiato con un disco che permette il passaggio di raggi di luce sufficienti ad eccitare le proteine fluorescenti ma senza provocare danni alle cellule, ho analizzato il comportamento di PRPF31-like-RFP e SF3A2-like-RFP rispetto alla tubulina-GFP. Le localizzazioni trovate (Fig. 25) sono assolutamente sovrapponibili a quelle ottenute dagli esperimenti di citologia. Dall’analisi *in vivo* si può apprezzare soprattutto il ritorno di queste proteine nel nucleo in tarda telofase.

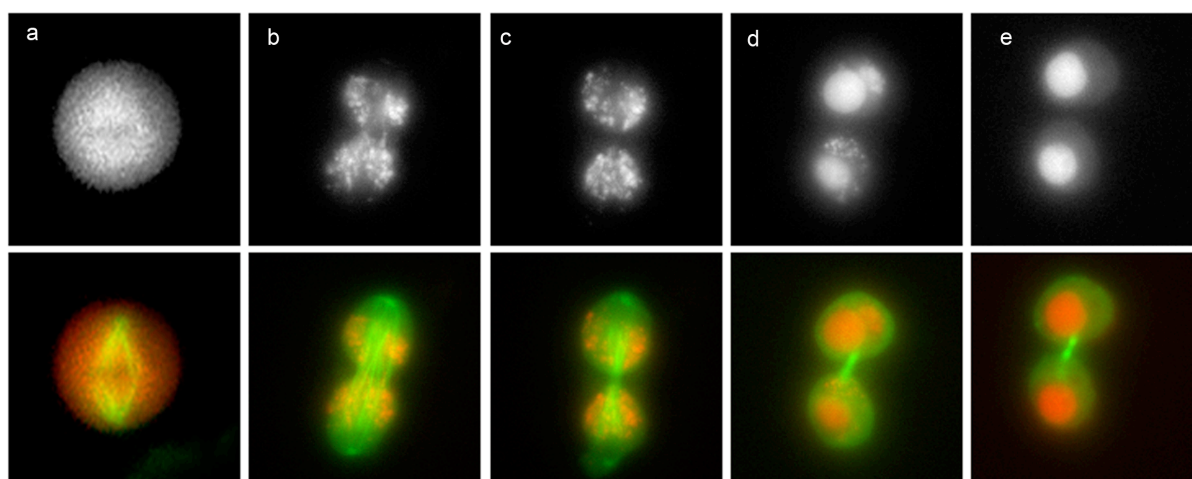


Fig. 25. Una cellula con tubulina-GFP e trasfettata con il vettore pAWR-PRPF31-like-RFP è stata seguita negli stadi finali della mitosi. (a) metafase, (b) anafase, (c) telofase precoce, (d, e) telofase tardiva. La proteina PRPF31-like è in rosso, la tubulina in verde.

Studio del ruolo delle proteine PRPF31-like e SF3A2-like nella formazione del fuso mitotico

Gli esperimenti di immunolocalizzazione di proteine cinetocoriche note illustrati precedentemente, indicano difetti nel legame cinetocore-microtubuli in cellule prive di PRPF31-like e SF3A2-like. Le evidenze sperimentali della localizzazione di queste due proteine intorno ai cromosomi in metafase, confermano che PRPF31-like e SF3A2-like

svolgono un ruolo importante nell'interazione dei microtubuli con il cinetocore, in quanto è proprio in metafase che si stabilisce il corretto legame dei cromosomi con i microtubuli. Per cercare di comprendere quale sia il ruolo svolto da PRPF31-like e SF3A2-like nella organizzazione delle fibre cinetocoriche ho effettuato degli esperimenti di doppia interferenza per il gene *centrosomin* (*cnn*) e per i geni che codificano per PRPF31-like e SF3A2-like.

Il gene *centrosomin* codifica per una componente essenziale del centrosoma, richiesta per la nucleazione dei microtubuli astrali (Megraw et al., 2001). L'inattivazione di questo gene nelle cellule S2 provoca la formazione di fusi bipolari anastrali (Fig. 26). In prometafase si osserva la presenza di una rete di microtubuli intorno alla cromatina. Questi microtubuli in metafase si organizzano in un fuso bipolare e la mitosi procede regolarmente fino alla telofase, dove i fusi bipolari pur non essendo perfettamente focalizzati sono capaci di sostenere la segregazione cromosomica e di formare un fuso centrale regolare. Questo tipo di formazione del fuso mitotico, data l'assenza dei centrosomi è controllato esclusivamente dai cromosomi.

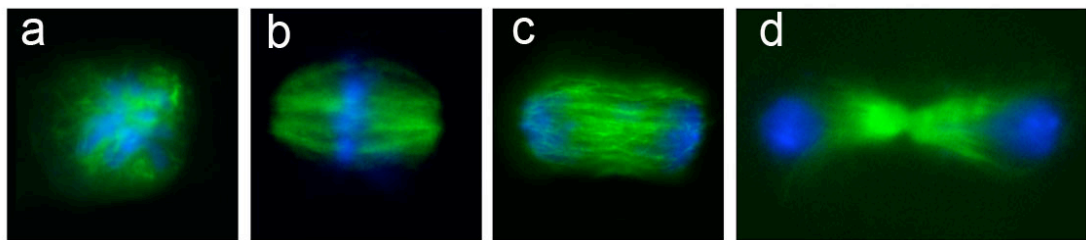


Figura 26. La mitosi in cellule in coltura di *Drosophila* trattate con dsRNA per il gene *centrosomin*. (a) prometafase; (b) metafase; (c) anafase (d) telofase. Nelle immagini la tubulina è in verde e il DNA in blu.

Per studiare il ruolo svolto dal cinetocore nell'assemblaggio di un fuso funzionale in assenza di centrosomi, ho inizialmente effettuato un esperimento di doppia interferenza per *cnn* e *Ndc80/Hec1-like* che, come ampiamente illustrato nell'Introduzione, codifica per una proteina fondamentale per il legame dei microtubuli al cinetocore. I preparati citologici di cellule prive sia di Centrosomin che di Ndc80/Hec1-like mostrano dei fenotipi mitotici completamente diversi da quelli osservati nelle singole interferenze. Infatti, benché in prometafase si osservano dei microtubuli intorno alla cromatina, come nelle cellule senza Centrosomin, nelle fasi successive questi microtubuli rimangono fortemente disorganizzati

non riuscendo mai ad organizzarsi in fusi bipolari (Fig. 27). Ovviamente l'assenza di un fuso regolare impedisce sia la congressione che la segregazione dei cromosomi.

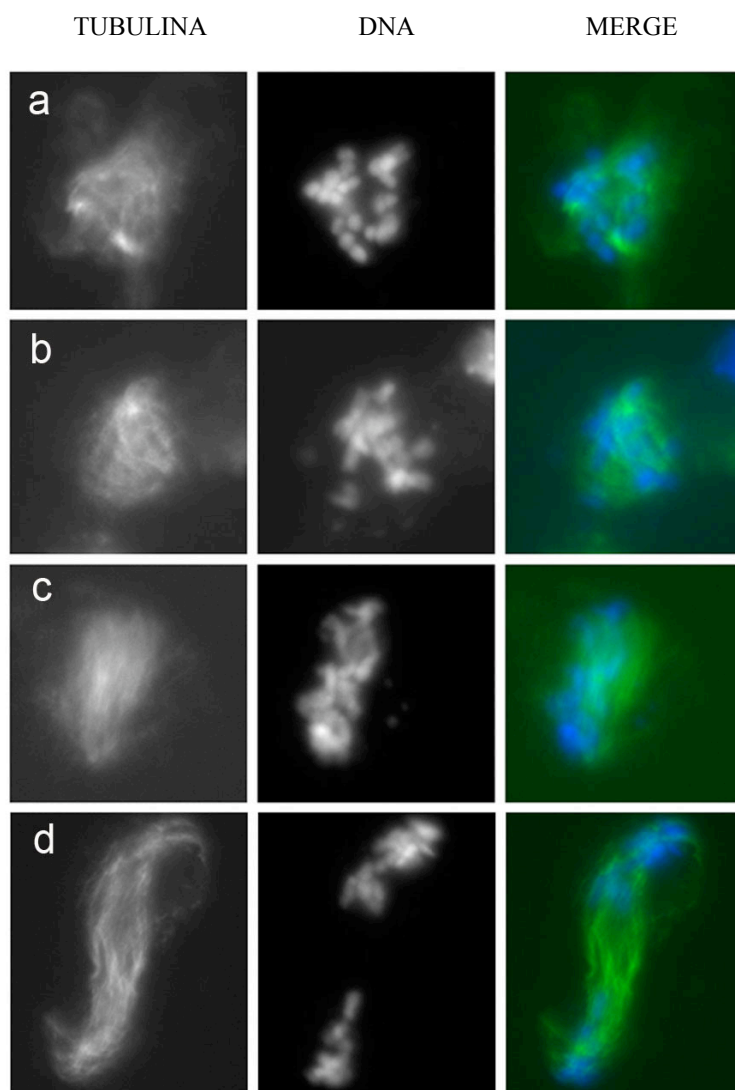


Figura 27. La mitosi in cellule interferite sia per *cnn* che per *Ndc80/Hec1-like*: (a) prometafase; (b) metafase; (c) pseudoanafase; (d) pseudotelofase. Nell'ultima colonna la tubulina è in verde e il DNA in blu.

Ho quindi effettuato degli esperimenti di doppia interferenza con dsRNA del gene della *centrosomina*, insieme ai dsRNA di *PRPF31-like* e *SF3A2-like*, per confermare l'ipotesi di un'analogia funzionale tra le proteine dello "splicing" e le proteine del cinetocore (Fig. 28).

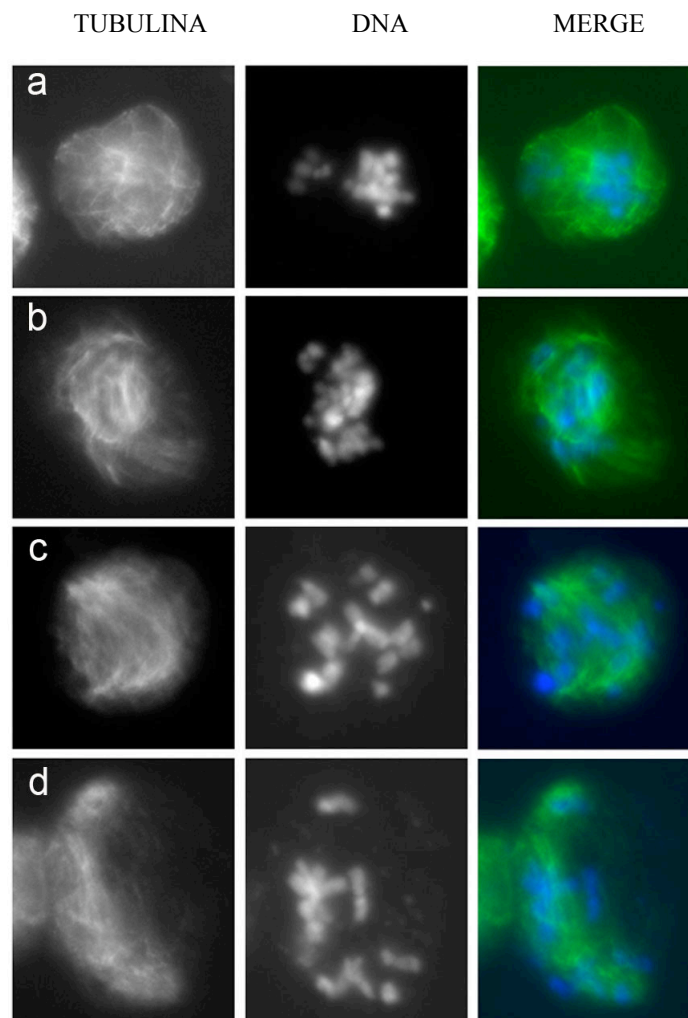


Figura 28. La mitosi in cellule interferite sia per *cnn* che per *SF3A2*: (a) prometafase; (b) metafase; (c) pseudoanafase; (d) pseudotelofase. Nell'ultima colonna la tubulina è in verde e il DNA in blu.

I risultati di questi esperimenti sono molto simili tra loro ed a quelli ottenuti dalla doppia interferenza per *cnn* e *Ndc80/Hec1-like* (Fig. 28). Infatti, in assenza contemporaneamente dei fattori di splicing da me studiati e di centrosomi, le cellule non sono capaci di formare un fuso mitotico regolare ed i movimenti dei cromosomi durante la mitosi risultano fortemente alterati.

Questi risultati confermano l'ipotesi che questi fattori di “splicing” svolgono un ruolo importante nell'organizzazione e/o nel legame delle fibre cinetocoriche.

DISCUSSIONE

Efficienza dell'RNAi per l'identificazione di geni mitotici

La lista da noi costruita in base ai dati di co-espressione contiene circa 50 geni mitotici noti, per i quali era stato precedentemente definito il fenotipo mitotico causato da inattivazione genica. Nei nostri esperimenti di RNAi per questi geni abbiamo osservato chiari fenotipi mitotici analoghi a quelli presenti nei tessuti delle mosche mutanti. Ciò dimostra che la tecnica dell'RNAi da noi usata ha un'elevata efficienza, e che i 155 geni mitotici da noi identificati costituiscono la maggior parte dei geni mitotici effettivamente presenti nei primi 1000 posti della nostra lista di coespressione. Inoltre, abbiamo osservato che l'inattivazione genica mediante RNAi produce un fenotipo mitotico alterato nella maggioranza delle cellule trattate. La frequenza di cellule con difetti mitotici tipicamente osservata nei nostri esperimenti è quasi sempre superiore all'80%.

Geni che controllano il movimento dei cromosomi nella mitosi

Grazie all'uso della tecnica dell'RNA "interference" su cellule in coltura S2 di *Drosophila*, è stato possibile identificare una particolare classe di geni implicata nella corretta progressione della mitosi: in particolare questi geni sono responsabili della congressione in piastra dei cromosomi e della segregazione dei cromatidi fratelli. Appartengono a questa classe i geni che codificano per diverse componenti del cinetocore, quali Ndc80/Hec1-like, KMN e Nuf-2. Gli altri geni che compongono questa classe non specificano funzioni cinetocoriche note ma, data la similitudine del fenotipo ottenuto per RNAi, si può ipotizzare che siano comunque coinvolti nell'attività del cinetocore. Il dato più interessante di questa analisi è stata la scoperta che molti di questi geni, codificano per proteine altamente conservate e caratterizzate in uomo come fattori di "splicing".

Una dettagliata analisi citologica mi ha permesso di caratterizzare i fenotipi risultanti dall'inattivazione mediante RNAi per questi geni, evidenziandone la loro implicazione nell'interazione cinetocore-microtubulo. Vorrei precisare che, anche se in questa tesi ho mostrato i risultati per due soli geni di questo gruppo, *CG6876* e *CG10754*, ma ho condotto analisi citologiche dello stesso tipo anche su tutti gli altri geni (Somma et al., 2008),

ottenendo risultati molto simili. Ho studiato la localizzazione di CENP-C per capire se il cinetocore fosse correttamente assemblato, ed ho confermato che, nelle cellule interferite per i geni da me analizzati, i cromatidi non si separano, ma permangono uniti fino agli stadi finali della mitosi. Poiché la separazione dei cromatidi fratelli è innescata dall'inattivazione dello "spindle checkpoint", ho studiato il comportamento di BubR1 e ZW10 per capire se questo meccanismo fosse presente ed attivo in queste cellule. I risultati dimostrano che i complessi responsabili dello "spindle checkpoint" sono presenti, ma hanno un comportamento alterato: BubR1 rimane associata al cinetocore fino alle pseudo-telofasi e ZW10 non si muove lungo i microtubuli cinetocorici. La mancata rimozione di BubR1 e ZW10 suggerisce che, in queste cellule, il "checkpoint" del fuso rimanga attivo, e che quindi non possa essere attivato il processo che porta alla degradazione delle coesine e separazione dei cromatidi fratelli. Infatti, queste cellule non entrano mai in anafase, come confermato dalla permanenza di alti livelli di Ciclina B nelle pseudo-anafasi e nelle pseudo-telofasi (Somma et al., 2008). La permanenza di BubR1 e la perdita dello "streaming" di ZW10 suggeriscono che, nelle cellule interferite per questi geni, sia fortemente difettoso l'attacco dei microtubuli ai cinetocori. BubR1, infatti, è considerata una proteina che sente la tensione esercitata sui cinetocori dai microtubuli attaccati e provenienti dai poli opposti del fuso. Quando non c'è un corretto attacco bipolare del cromosoma, la sua presenza serve per segnalare l'assenza di questa tensione. Nelle cellule interferite, non essendoci il legame dei microtubuli, non si stabilisce nessuna tensione e quindi BubR1 rimane associata al cinetocore. Il movimento di ZW10 lungo i microtubuli cinetocorici, ad opera del complesso dineina-dinactina, richiede proprio la presenza di tali microtubuli. Ma nelle cellule interferite tali microtubuli sono assenti, per cui ZW10 non può essere rimosso dal cinetocore e vi rimane associato fino alla fine della mitosi. Infine, anche la proteina Cenp-meta, necessaria per l'interazione laterale dei cinetocori con i microtubuli, viene reclutata, ma non in modo stabile, nelle cellule interferite per i geni da me studiati. Tale osservazione conferma l'ipotesi che in queste cellule è compromessa la funzione del cinetocore di legare i microtubuli del fuso. Posso quindi concludere che, nelle cellule interferite per i geni da me analizzati, non si stabilisce un corretto legame microtubuli-cinetocore, necessario per la congressione dei cromosomi in piastra metafasica. Inoltre, questo mancato legame non "soddisfa" il "checkpoint" del fuso che, rimanendo attivo, impedisce l'entrata della cellula in anafase ed una corretta segregazione cromosomica.

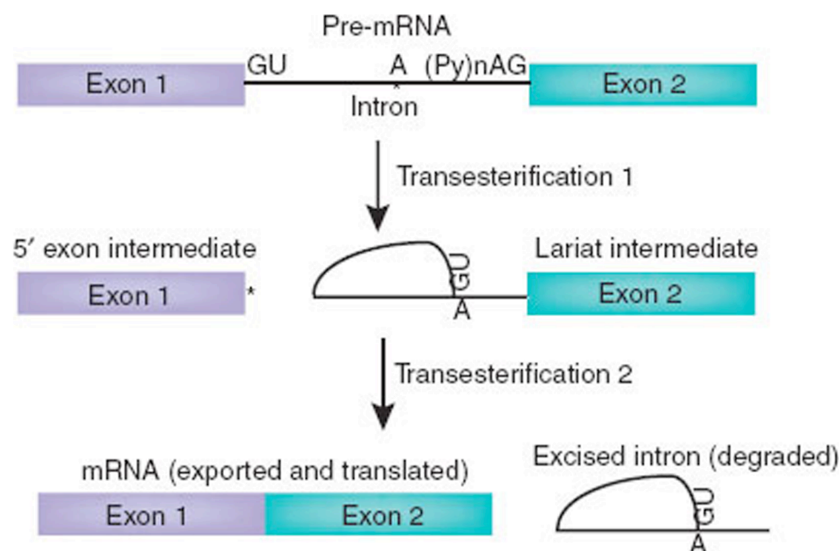
La reazione di “splicing” e la formazione dello “spliceosoma”

La funzione precisa delle proteine codificate da *CG6876* e *CG10754* in *Drosophila melanogaster*, non è mai stata descritta, ma la loro elevata conservazione evolutiva suggerisce fortemente che siano coinvolte nel processo di “splicing”. Nell’uomo, i geni ortologhi codificano per proteine capaci di interagire con le piccole molecole snRNA U1, U2, U4, U5 e U6 indispensabili per lo svolgimento della reazione di “splicing”.

La reazione di “splicing” assicura la rimozione degli introni da un RNA precursore. Nella maggior parte degli introni dei pre-mRNA, i primi nucleotidi della sequenza sono 5'-GU-3' mentre gli ultimi due sono 3'-AG-5': gli introni vengono quindi chiamati “GU-AG” e tutti i membri di questa classe vengono escissi nello stesso modo. Il processo di “splicing” può essere diviso in due tappe.

Nella prima fase avviene una reazione di transesterificazione promossa dal gruppo idrossilico attaccato al carbonio 2' di un'adenosina interna alla sequenza intronica. Il risultato dell'attacco idrossilico è il taglio del legame fosfodiesterico al sito di “splicing” 5', accompagnato dalla formazione di un legame fosfodiesterico 5'-2' tra la guanosina terminale e l'adenosina del sito di ramificazione. L'introne forma, quindi un'ansa su stesso creando una struttura a cappio chiamata “lariat”.

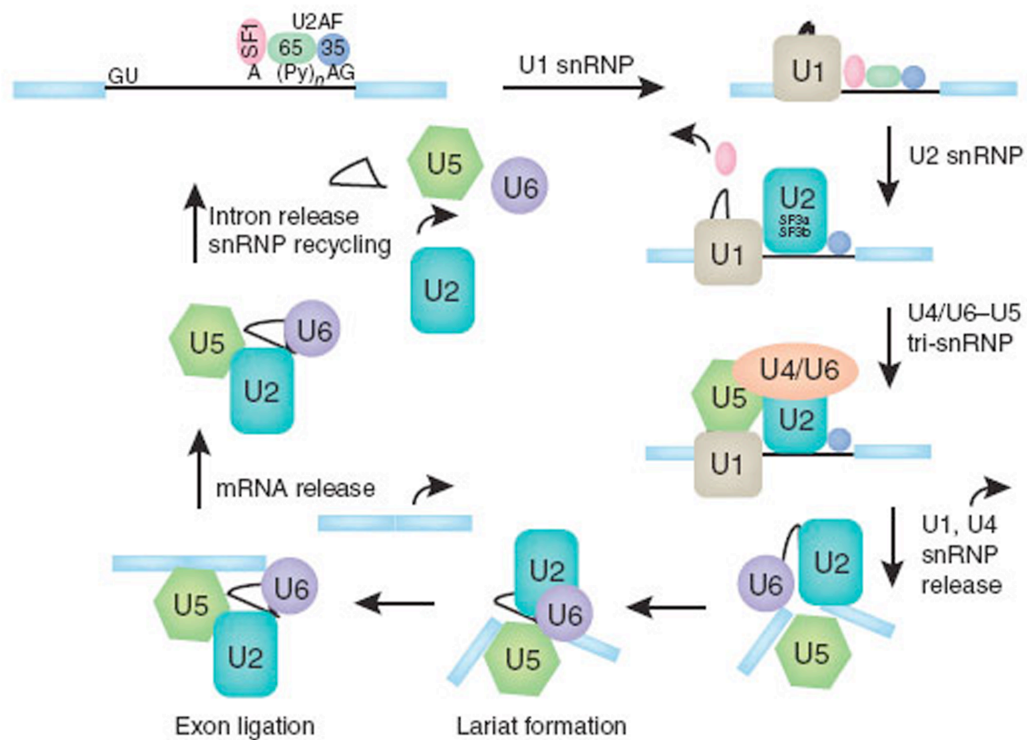
La seconda fase è caratterizzata da un'altra reazione di transesterificazione che consiste nell'attacco del 3'-OH terminale dell'esone a monte, formatosi in seguito al taglio nella sua estremità 3', sul legame fosfodiesterico del sito di “splicing” al 3'. L'introne viene, quindi, tagliato e rilasciato nella sua forma a “lariat”, che viene poi convertita a RNA lineare e degradata. Contemporaneamente, l'estremità 3' dell'esone a monte si unisce all'estremità 5' appena formata dell'esone a valle, completando così il processo di “splicing” (Fig. 29).



da Rymond, Nature Chem. Biol. 2007

Figura 29. Schema della reazione di “splicing”.

Componenti essenziali dell'apparato di “splicing”, che rimuove gli introni di tipo GU-AG, sono gli snRNA (“small nuclear RNA”) U1, U2, U4, U5 e U6. Gli snRNA sono delle piccole molecole, tra 106 (U6) e 185 nucleotidi (U2) nei vertebrati, che si associano con fattori proteici per formare dei complessi ribonucleoproteine nucleari (snRNP, “small nuclear ribonucleoprotein”). Gli snRNA U4 e U6 sono, per buona parte della loro lunghezza, appaiati tra loro ed impacchettati in un'unica particella; le altre snRNP contengono un'unica molecola di snRNA. Le sequenze primarie degli snRNA variano da specie a specie, tuttavia le strutture primarie sono altamente conservate (Patel and Bellini, 2008). L'snRNA U6 rappresenta un'eccezione, infatti la sua sequenza primaria nel lievito è molto simile a quella presente nell'uomo. Gli snRNA sono associati con otto proteine (proteine Sm), comuni a tutte le snRNP. Le snRNP, assieme ad altri fattori proteici, formano una serie di complessi che permettono lo svolgimento dei due passaggi della reazione di “splicing”. La prima fase specifica nella formazione dello “spliceosoma” è rappresentata dal legame della snRNP U1 al pre-mRNA, mediato sia da appaiamento RNA-RNA che da fattori proteici come U2AF35 e U2AF65. Il posizionamento di snRNP U1 al sito di “splicing” al 5' è probabilmente mediato da un'interazione diretta tra le proteine SR (ASF/SF2 in particolare) legate al substrato di “splicing”, e la proteina di 70 KDa della snRNP U1. Si forma così il complesso di determinazione o complesso H (conosciuto anche come complesso E) che dà inizio all'attività di “splicing”.



da Rymond, Nature Chem. Biol. 2007

Figura 30. Schema di formazione dello “spliceosoma”.

Il complesso A di “pre-splicing” si forma in seguito al legame della snRNP U2 con il sito di ramificazione. Questa fase, come tutte le successive fasi della reazione di “splicing” è ATP-dipendente. Al 3' la subunità U2AF35 interagisce con snRNA U2 facilitando il suo ingresso al sito di ramificazione. L'appaiamento di basi tra la regione interna dell'RNA U2 e il sito di ramificazione risulta nella formazione di una corta elica dalla quale viene estroflessa l'adenosina del sito di ramificazione. Si pensa che tale interazione serva per rendere accessibile l'adenosina come sito nucleofilo per la prima tappa della reazione di “splicing”.

Le snRNP U4/U6 ed U5 interagiscono con il complesso A per generare il complesso B. La snRNP U4/U6 si lega alla snRNP U2, mentre la snRNP U5 si lega inizialmente all'esone a valle e poi migra nella regione 3' dell'introne. A questo stadio, l'associazione tra le snRNP U1 e U2 porta il sito di “splicing” al 5' in stretta vicinanza con il sito di ramificazione. La snRNP U1 si dissocia poi dal complesso e viene sostituito nel suo ruolo di legame al sito di “splicing” 5' dalla snRNP U6.

Il complesso B è successivamente convertito nel complesso C cataliticamente attivo. Le reazioni di transesterificazione avvengono velocemente, catalizzate probabilmente dalla snRNP U6. L'introne rimosso rimane associato agli snRNA U2, U5 e U6, mentre l'mRNA

viene rilasciato dallo “spliceosoma” sotto forma di complesso a basso peso molecolare (Fig.30).

Dalla Tabella 3 e da questa breve presentazione del meccanismo dello “splicing”, si può osservare che i geni la cui inattivazione per RNAi causa difetti mitotici codificano per proteine che fanno parte di diversi complessi di “splicing”. Inoltre, vorrei precisare che nei 1000 geni studiati nel mio laboratorio sono presenti circa 60 sequenze codificanti per putativi fattori di “splicing”, ma solo per 13 di questi geni abbiamo osservato, mediante esperimenti di RNAi, difetti nella congressione e segregazione cromosomica. Queste osservazioni suggeriscono quindi che esistono diversi fattori di “splicing” specifici per la mitosi, ma in che modo questo processo così complesso è coinvolto nella progressione mitotica rimane ancora da chiarire.

Possibili funzioni di molecole di RNA in mitosi

Poiché il ruolo dello “splicing” è il processamento di molecole di RNA, si può ipotizzare che durante la mitosi sia richiesta la produzione di RNA con particolari funzioni mitotiche. Negli ultimi anni si sono ottenute diverse evidenze sperimentali sulla presenza di molecole di RNA al cinetocore e sul ruolo svolto da molecole di RNA nella formazione del fuso mitotico (Rieder, 1979; Topp et al., 2004; Blower et al., 2005; Wong et al., 2007; Wong and Blobel, 2008).

Una delle prime dimostrazioni che molecole di RNA sono presenti al centromero/cinetocore è stata fornita da Topp ed i suoi collaboratori (Topp et al., 2004). In questo lavoro è stato osservato che molecole di RNA, derivate dalla trascrizione di sequenze satellite (CentC) e retrotransposoni centromerici (CRM), sono necessarie per la formazione dell’eterocromatina centromerica in mais. Infatti, con esperimenti di ChIP (Chromatin ImmunoPrecipitation), Topp e collaboratori hanno dimostrato che questi trascritti rimangono associati all’istone centromerico H3 (CENH3, ortologo di CENP-A). La trascrizione attiva delle sequenze di DNA centromerico potrebbe iniziare il processo di apertura della cromatina, favorendo così il posizionamento di CENH3 in sostituzione dell’istone H3 e la formazione della caratteristica cromatina centromerica.

Il coinvolgimento di molecole di RNA nella formazione del centromero/cinetocore in cellule umane è stata dimostrata da Wong e collaboratori (Wong et al., 2007). In questo

lavoro, è stato osservato che in saggi di mobilità elettroforetica la proteina cinetocorica CENP-C è capace di legare RNA trascritto dalle sequenze α -satellite. Esperimenti di ChIP hanno confermato l'associazione tra CENP-C e molecole di RNA α -satellite in cellule umane. L'importanza dell'interazione CENP-C/RNA nella formazione del centromero è stata dimostrata in esperimenti in cui, trattando cellule in metafase con una RNasi per RNA a singolo filamento, è stata osservata una parziale delocalizzazione di CENP-C ed una completa delocalizzazione al centromero delle proteine INCENP e Survivin. L'ipotesi suggerita dagli autori è che le molecole di RNA α -satellite in interfase favoriscono l'accumulo nel nucleolo di specifiche proteine centromeriche, come CENPC1, INCENP e survivin, mentre in mitosi ne promuovono la localizzazione al centromero, permettendo così la corretta formazione dei cinetocori.

Studi recenti hanno dimostrato che RNA associati ai microtubuli svolgono un ruolo cruciale nella formazione del fuso mitotico. Sia il gruppo di Heald che di Sitterlin hanno identificato un complesso formato da molecole di RNA e la proteina Rae1 (Blower et al., 2005; Sitterlin, 2005). La proteina Rae1 è una componente del “microtubule aster-promoting activity” (APA- β) direttamente regolata dall'importina β (Babu et al., 2003; Jeganathan et al., 2005). Il gruppo di Heald ha dimostrato che, in estratti di uova di *Xenopus*, la proteina Rae1 è in grado di legare i microtubuli ed è coinvolta nella formazione del fuso. La deplezione di Rae1 in estratti mitotici provoca, infatti, una riduzione del numero di aster, la cui formazione dipende da Ran, e la crescita di lunghi microtubuli non focalizzati. Anche in cellule umane la perdita di funzione di Rae1 provoca difetti di assemblaggio del fuso, di allineamento in piastra dei cromosomi e di segregazione dei cromatidi fratelli.

La formazione degli aster negli estratti mitotici di *Xenopus* viene solo parzialmente recuperata con l'aggiunta di Rae1 purificata, suggerendo che la proteina Rae1 richiede l'associazione con altri fattori per svolgere la sua attività. L'analisi mediante spettrometria di massa ha permesso ad Heald ed i suoi collaboratori di individuare le proteine che si associano a Rae1. Molte delle proteine identificate sono implicate in diversi stadi di biogenesi degli mRNA, come Rap55, Maskin, Fubp2, Vera, CPSF25 e CBTF.

L'associazione di Rae1 con proteine capaci di legare gli mRNA ha portato all'ipotesi che Rae1 potesse far parte di un complesso RNP. Effettivamente Heald ed i suoi collaboratori trovarono associati a Rae1 anche diversi RNA. L'osservazione importante sul ruolo svolto da questi RNA è stata ottenuta trattando estratti mitotici di *Xenopus* con RNAsi: in questo caso veniva completamente inibita la formazione di aster e del fuso dipendente da Ran. Questi

risultati dimostrano che molecole di RNA e RNP sono richieste per la corretta formazione del fuso e degli aster.

Recentemente sono state ottenute nuove evidenze sul ruolo mitotico della proteina Rae1: è stato visto che interagisce anche con altre proteine come Nup98, NuMA, e SMC1 già note per svolgere un ruolo nella formazione di un fuso bipolare durante la mitosi (Wong et al., 2006; Wong et al., 2007; Wong and Blobel, 2008).

In un lavoro più recente, il gruppo di Heald ha dimostrato che molecole di RNA si localizzano sul fuso mitotico sia in *Xenopus* che in uomo (Blower et al., 2007). Gli RNA sono stati identificati grazie ad esperimenti di “microarray” e sono per la maggior parte costituiti da messaggeri che codificano per proteine coinvolte nella mitosi e nel metabolismo del DNA. L’ipotesi è che questi mRNA siano in grado di regolare gli eventi del ciclo cellulare permettendo una traduzione localizzata di specifici regolatori mitotici. In questo contesto appare chiaro come fattori di “splicing” possano essere coinvolti nella progressione mitotica, regolando la produzione di specifiche proteine mitotiche.

In conclusione, in questo lavoro ho dimostrato che geni codificanti per proteine coinvolte nella reazione di “splicing” sono necessari per la corretta congressione in piastra dei cromosomi e per la separazione dei cromatidi fratelli. Saranno, però necessari ulteriori studi per capire come un processo così complesso e generale come lo “splicing” svolga un ruolo così specifico nella funzione del centromero/cinetocore.

MATERIALI E METODI

Culture cellulari e trattamento con dsRNA

Le cellule S2 di *Drosophila* sono state cresciute a 25 °C in terreno Shields e Sang M3 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) arricchito con il 10% di siero di bovino fetale inattivato al calore (FBS) (Sigma-Aldrich). Per gli esperimenti di RNA interference, le cellule sono state risospese in un terreno privo di siero ad una concentrazione di 1×10^6 cellule/ml, e piastrato 1 ml per pozzetto in piastre da sei pozzetti (Nalge Nunc, Naperville, IL). Ad ogni coltura sono stati poi aggiunti 15 mg di dsRNA. Dopo un'ora di incubazione a 25 °C, sono stati aggiunti 2 ml di terreno arricchito con il 15% di siero di bovino fetale. Le colture di controllo sono state preparate allo stesso modo, ma senza l'aggiunta di dsRNA. Sia le cellule trattate con dsRNA che le cellule di controllo sono poi lasciate crescere per 72 h a 25 °C (Somma et al., 2002).

Produzione di dsRNA

Le sequenze dei singoli geni sono state amplificate con la reazione a catena di polimerizzazione (PCR) da un pool di cDNA (DNA complementare o copia) ottenuto da cinque differenti genoteche: quattro genoteche embrionali sono costituite da cDNA proveniente da embrioni di 0-4 h, 4-8 h, 8-12 h e 12-24 h e una libreria di dischi immaginali, tutti gentilmente forniti da Brown (Brown and Kafatos, 1988). I primer usati nelle reazioni di amplificazione sono lunghi 35 nucleotidi e contengono al 5' un sito di legame per la RNA polimerasi T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGG-3'), mentre le restanti basi sono specifiche per ogni gene (Somma et al., 2008).

I prodotti della PCR sono stati purificati mediante precipitazione con etanolo. Per assicurare che la maggior parte dei prodotti RNA sia in forma di doppio filamento (dsRNA), le soluzioni di RNA sono state riscaldate a 65 °C per 30 min e poi raffreddate lentamente a temperatura ambiente. La qualità e la concentrazione dei dsRNA sono state controllate mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1%. I dsRNA sono stati conservati a 20 °C prima di essere utilizzati.

Elettroforesi

Il gel di agarosio viene preparato aggiungendo 0,8 g di agarosio a 100 ml di tampone acetato (TAE: tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M). La soluzione è stata poi riscaldata per sciogliere l'agarosio, è stato aggiunto bromuro di etidio alla concentrazione di 100 ng/ml e poi colata sul vassoio apposito. Nel gel ancora allo stato liquido è stato inserito un pettine per formare i pozzetti dove caricare i campioni da esaminare. Una volta che il gel si è solidificato, si immerge il gel nel tampone e si fa avvenire l'elettroforesi. Prima di caricare il gel, si aggiungono ai campioni un tampone contenente due coloranti con velocità di migrazione nota, in modo da seguire l'andamento dell'elettroforesi. Le bande di DNA sono visualizzate alla luce ultravioletta grazie alla presenza di bromuro di etidio che si intercala tra le basi del DNA ed emette fluorescenza.

Procedure citologiche

Per la preparazione dei fusi delle cellule S2 si prelevano 3 ml da ogni coltura e si centrifuga per 5 min a 1000 rpm. Il pellet viene lavato con 10 ml di PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) e in seguito risospeso in 3 ml di formaldeide al 3.7% in PBS. Si aspettano 5 min e al termine si centrifuga per 5 min a 1000 rpm. Al pellet vengono aggiunti 200-500 ml di PBS, in base alla quantità di cellule presenti. I vetrini vengono puliti con EtOH e montati sugli adattatori della citocentrifuga (Shandon cytocentrifuge). Sono stati caricati 80 µl per campione e centrifugati per 4 min a 900 rpm; poi i vetrini sono stati immersi subito nell'azoto liquido almeno per 4-5 min, trasferiti in PBT (PBS + Triton 0.5%) per 15 min ed in ultimo in PBS contenente BSA (Bovine Serum Albumin) al 3% per 20 min. A questo punto vengono usati gli anticorpi appropriati, tutti diluiti 1:100 in PBS: anti α -tubulina monoclonale (DM1A, Sigma), anti Cenp-C (gentilmente fornito da C. Lehner, Bayreuth), anti ZW10, anti Cenp-meta (entrambi gentilmente forniti da M. Goldberg, Ithaca), anti BubR1 (gentilmente fornito da C. Sunkel, Porto). Gli anticorpi primari vengono incubati per 12 h e il giorno seguente i vetrini vengono sciacquati e lasciati per 1 h a temperatura ambiente con l'anticorpo anti-mouse coniugato FITC (fluorescein-5-isothiocyanate, Invitrogen). Una volta asciugati, i vetrini vengono montati in Vectashield, una sostanza che riduce il decadimento della fluorescenza, contenente DAPI (4,6-diammidino-2-fenilindolo, Vector), una sostanza che

colora il DNA. Tutte le immagini vengono catturate da una CCD (Charge Coupled Device) CoolSnap HQ (Photometrics; Tucson, AZ) connessa ad un microscopio a fluorescenza (Zeiss Axioplan), provvisto di una lampada HBO da 100 W. Le immagini collezionate separatamente vengono convertite nel formato Photoshop e pseudocolorate.

Trasfezione cellule S2

Ho clonato le sequenze complete delle proteine PRPF31-like e SF3A2-like nel vettore Gateway (pAWR) (Drosophila Genomics Resource Center) che contiene la sequenza RFP (Red Fluorescent Protein).

Le cellule S2-GFP, che contengono un plasmide con la sequenza codificante per una tubulina marcata con la GFP (Green Fluorescent Protein), sono state piastrate ad una densità di 800.000 cellule/pozzetto in piastre da 6 pozzetti. Il giorno successivo in una eppendorf sono stati preparati 100 µl di terreno M3 (Sigma) senza siero con l'aggiunta di 7 µl di Cellfectin (Invitrogen), in un'altra eppendorf 100 µl di terreno senza siero con l'aggiunta di 3 µg di DNA da trasfettare (pAWR-PRPF31-RFP e pAWR-SF3A2-RFP). Le due soluzioni sono state mescolate insieme ed incubate a 25 °C per 45-60 min e poi aggiunte alle cellule nel pozzetto. Dopo 5 h, il terreno è stato aspirato e sono stati aggiunti 3 ml/pozzetto di terreno + 10% FBS. Dopo circa 48 h, quando comincia l'espressione del plasmide trasfettato, le cellule sono state raccolte per la visualizzazione al microscopio a fluorescenza fornito di uno "spinning disk". Per l'analisi *in vivo* è stato usato il programma Metamorph (Molecular Devices).

Espressione e purificazione delle proteine

Ho clonato le rispettive parti carbossi-terminali dei geni *Hec-1-like*, *PRPF31-like* e *SF3A2-like* in vettori di espressione pET200-6His (Invitrogen) che vengono inseriti in cellule batteriche (ceppo BL21) di *E. coli* (BL21 Star-DE3; One Shot Chemically Competent; Invitrogen) per indurre l'espressione delle proteine corrispondenti.

È stata inoculata una singola colonia di batteri trasformati in 50 ml di terreno liquido LB (Luria Broth) contenente ampicillina (100 µg/ml). La mattina successiva i 50 ml di ciascuna coltura sono stati inoculati in 500 ml di LB contenente ampicillina (100 µg/ml). I batteri sono

stati cresciuti in agitazione a 37 °C fino ad una densità ottica di $OD_{600} = 0,5$ e quindi l'espressione della proteina è stata indotta con l'aggiunta di IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) 1 mM per 4 h a 37 °C (un'aliquota di batteri non indotti è stata tenuta come controllo). I batteri sono stati poi centrifugati a 4000 rpm per 15 min a 4 °C e risospesi in "Nature Buffer" (Na_2HPO_4 50 mM, NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 500 mM) contenente lisozima e inibitori di proteasi (Complete, Roche). La sospensione è stata lasciata per 30 min in ghiaccio e poi i lisati sono stati sonicati in ghiaccio. Ad ogni campione sono stati aggiunti RNasi (10 mg/ml) e DNasi (10 mg/ml). Dopo 30 min i campioni vengono centrifugati a 13000 rpm per 10 min a 4 °C. I sopranatanti sono stati poi separati dai pellet ed i campioni sono stati denaturati a 100 °C per 5 min e caricati su gel SDS-PAGE.

Tutte le proteine ottenute sono risultate insolubili e quindi sono state purificate per elettroeluizione dal pellet. Il pellet ottenuto alla fine della lisi dei batteri è stato risospeso in un tampone di caricamento 2× (Laemmli Buffer) (Tris HCl 100 mM a pH 6,8; SDS 4%; DL-Dithiothreitol, DTT, 200 mM; blu di bromofenolo 0,2%; glicerolo 20%, H_2O deionizzata), caricato e fatto correre su gel di poliacrilammide per tutta la notte a circa 10 mA. Al termine della corsa elettroforetica, la banda di interesse è stata tagliata e posta in tubi da dialisi contenenti TGS (Tris-Glycine-SDS). Questi tubi sono stati immersi in una cella elettroforetica TGS a cui è stata applicata una corrente di 55 V per 45 min. L'eluato è stato recuperato e conservato a 4 °C.

La quantificazione della proteina è stata ottenuta tramite SDS-PAGE in parallelo con concentrazioni standard di BSA. Utilizzando colonnine Centricon Plus 20 (Millipore), la soluzione è stata portata ad una concentrazione di proteina pari a 500 µg/µl. Le proteine così ottenute sono state spedite alla ditta Agro-Bio (Francia) ed utilizzate per l'immunizzazione di conigli e generare così gli anticorpi corrispondenti.

Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)

Il gel di poliacrilammide-SDS è costituito da una zona di concentrazione a pH 6,8 nella parte superiore, in cui l'acrilammide è al 4%, e da una zona più ampia di separazione a pH 8,8 che costituisce la parte inferiore, in cui la concentrazione dell'acrilammide varia a seconda del peso molecolare delle proteine da analizzare.

Prima del caricamento i campioni, a cui è stato aggiunto il tampone 2× Laemmli Buffer, sono stati denaturati a 100 °C per circa 5 min. L'elettroforesi è stata condotta in un tampone di corsa TGS (SDS 1 g/l, Tris 3 g/l e glicina 14,4 g/l a pH 8,3). Terminata la corsa elettroforetica, il gel è stato colorato in una soluzione di blu di Coomassie (una soluzione acquosa di 0.25% acido acetico al 10%, e metanolo al 50%) e poi decolorato in una soluzione acquosa di acido acetico al 10% e metanolo al 30%.

Western Blot

I campioni sono sottoposti a elettroforesi su gel di poliacrilammide e poi le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (Hybond; Amersham Biosciences) mediante “elettroblotting” in tampone di trasferimento (390 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ e 610 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-2H}_2\text{O}$). Avvenuto il trasferimento, la membrana è stata messa in TBS + 0,1% Tween-20 + 5% latte in polvere per tutta la notte a 4 °C. Il giorno seguente, il filtro è stato incubato per 2 h a temperatura ambiente con gli opportuni anticorpi primari diluiti nello stesso tampone. Successivamente, i filtri sono stati incubati per 40 min con gli opportuni anticorpi secondari coniugati con HRP (Horseradish Peroxidase), diluiti nello stesso tampone. Infine i filtri sono stati lavati per 3 volte per 5 min con TBS-Tween 0,1% e la proteina di interesse è stata visualizzata mediante rilevazione ElettroChemiLuminescente (ECL; Amersham).

Purificazione anticorpi

La proteina di interesse (500-800 ug) viene caricata su gel di poliacrilammide e poi trasferita mediante elettroblotting su membrana PVAF (Hybond; Amersham Biosciences). Una volta avvenuto il trasferimento, il filtro viene colorato con il rosso ponceau per visualizzare la banda di peso corrispondente alla proteina d'interesse. La banda, viene quindi tagliata e lasciata decolorare. In seguito, viene posta per 5 min in 100 mM di glicina/HCl a pH 2,5 e lavata per 2 volte con TBS. Si lascia riposare per 1 h a temperatura ambiente con BSA al 3% e poi risciacquata per 2 volte con TBS. La banda viene incubata con 2 ml di siero e 8 ml di TBS per tutta la notte a 4 °C. Il giorno dopo si recupera il sopranatante e si conserva a -20 °C. La banda, invece viene lavata per 3 volte con 50 mM Tris pH 7,5/500 mM NaCl, poi con 50

mM Tris pH 7,5/100 mM NaCl, ed infine con PBS. In ultimo si aggiunge 1 ml di glicina (50 mM a pH 2,5) o 1 ml di etanolamina, a seconda delle proprietà dell'anticorpo da purificare, per staccare l'anticorpo legato alla membrana. Si lascia in agitazione per 30 min, si recupera il liquido e si aggiunge la giusta quantità di Tris HCl a pH 8,8 o Tris HCl a pH 6,8 per raggiungere una soluzione a pH 7.

Esperimenti di co-immunoprecipitazione (co-IP)

La resina (Protein G Sepharose, Amersham Biosciences), dopo essere stata lavata con PBS, viene incubata con l'anticorpo purificato da saggiare, per tutta la notte a 4 °C. Poi questa miscela viene prima centrifugata a 1000 rpm per 30 s e il sopranatante conservato, poi lavata per 3 volte con il tampone di lisi.

Le cellule S2 vengono raccolte e centrifugate per 5 min a 1000 rpm e poi lavate con 10 ml di PBS. Il pellet viene risospeso nel tampone di lisi (50 mM Hepes, KOH pH 7,6, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1% Triton, 45 mM NaF, 45 mM β -glicerofosfato, 0,2 mM Na_3VO_4 , 1 mM fluoruro di fenilmetansulfonile, PMSF, e inibitore di proteasi) e lasciato 30 min in ghiaccio e poi centrifugato a 13000 rpm. Il supernatante viene incubato per 3 ore a temperatura ambiente con la resina precedentemente coniugata con l'anticorpo d'interesse. Questa miscela viene poi lavata per 3 volte con il tampone di lisi ed una volta con Tris HCl 20 mM a pH 7,5 e poi analizzate per western blotting.

BIBLIOGRAFIA

- Abrieu, A., J.A. Kahana, K.W. Wood, and D.W. Cleveland. 2000. CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint in vitro. *Cell*. 102:817-26.
- Adams, M.D., S.E. Celniker, R.A. Holt, C.A. Evans, J.D. Gocayne, P.G. Amanatides, S.E. Scherer, P.W. Li, R.A. Hoskins, R.F. Galle, R.A. George, S.E. Lewis, S. Richards, M. Ashburner, S.N. Henderson, G.G. Sutton, J.R. Wortman, M.D. Yandell, Q. Zhang, L.X. Chen, R.C. Brandon, Y.H. Rogers, R.G. Blazej, M. Champe, B.D. Pfeiffer, K.H. Wan, C. Doyle, E.G. Baxter, G. Helt, C.R. Nelson, G.L. Gabor, J.F. Abril, A. Agbayani, H.J. An, C. Andrews-Pfannkoch, D. Baldwin, R.M. Ballew, A. Basu, J. Baxendale, L. Bayraktaroglu, E.M. Beasley, K.Y. Beeson, P.V. Benos, B.P. Berman, D. Bhandari, S. Bolshakov, D. Borkova, M.R. Botchan, J. Bouck, P. Brokstein, P. Brottier, K.C. Burtis, D.A. Busam, H. Butler, E. Cadieu, A. Center, I. Chandra, J.M. Cherry, S. Cawley, C. Dahlke, L.B. Davenport, P. Davies, B. de Pablos, A. Delcher, Z. Deng, A.D. Mays, I. Dew, S.M. Dietz, K. Dodson, L.E. Doup, M. Downes, S. Dugan-Rocha, B.C. Dunkov, P. Dunn, K.J. Durbin, C.C. Evangelista, C. Ferraz, S. Ferriera, W. Fleischmann, C. Fosler, A.E. Gabrielian, N.S. Garg, W.M. Gelbart, K. Glasser, A. Glodek, F. Gong, J.H. Gorrell, Z. Gu, P. Guan, M. Harris, N.L. Harris, D. Harvey, T.J. Heiman, J.R. Hernandez, J. Houck, D. Hostin, K.A. Houston, T.J. Howland, M.H. Wei, C. Ibegwam, et al. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287:2185-95.
- Ambros, V. 2001. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*. 107:823-6.
- Andrews, P.D., Y. Ovechkina, N. Morrice, M. Wagenbach, K. Duncan, L. Wordeman, and J.R. Swedlow. 2004. Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cell*. 6:253-68.
- Babu, J.R., K.B. Jeganathan, D.J. Baker, X. Wu, N. Kang-Decker, and J.M. van Deursen. 2003. Rael is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation. *J Cell Biol*. 160:341-53.
- Bastiaens, P., M. Caudron, P. Niethammer, and E. Karsenti. 2006. Gradients in the self-organization of the mitotic spindle. *Trends Cell Biol*. 16:125-34.
- Bernstein, E., A.A. Caudy, S.M. Hammond, and G.J. Hannon. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 409:363-6.
- Biggins, S., and C.E. Walczak. 2003. Captivating capture: how microtubules attach to kinetochores. *Curr Biol*. 13:R449-60.
- Blower, M.D., E. Feric, K. Weis, and R. Heald. 2007. Genome-wide analysis demonstrates conserved localization of messenger RNAs to mitotic microtubules. *J Cell Biol*. 179:1365-73.
- Blower, M.D., and G.H. Karpen. 2001. The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat Cell Biol*. 3:730-9.
- Blower, M.D., M. Nachury, R. Heald, and K. Weis. 2005. A Rael-containing ribonucleoprotein complex is required for mitotic spindle assembly. *Cell*. 121:223-34.
- Bonaccorsi, S., M.G. Giansanti, and M. Gatti. 2000. Spindle assembly in *Drosophila* neuroblasts and ganglion mother cells. *Nat Cell Biol*. 2:54-6.
- Boutros, M., A.A. Kiger, S. Armknecht, K. Kerr, M. Hild, B. Koch, S.A. Haas, R. Paro, and N. Perrimon. 2004. Genome-wide RNAi analysis of growth and viability in *Drosophila* cells. *Science*. 303:832-5.
- Brinkley, B.R., and E. Stubblefield. 1966. The fine structure of the kinetochore of a mammalian cell in vitro. *Chromosoma*. 19:28-43.

- Brown, N.H., and F.C. Kafatos. 1988. Functional cDNA libraries from *Drosophila* embryos. *J Mol Biol.* 203:425-37.
- Brust-Mascher, I., G. Civelekoglu-Scholey, M. Kwon, A. Mogilner, and J.M. Scholey. 2004. Model for anaphase B: role of three mitotic motors in a switch from poleward flux to spindle elongation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:15938-43.
- Burke, D.J., and P.T. Stukenberg. 2008. Linking kinetochore-microtubule binding to the spindle checkpoint. *Dev Cell.* 14:474-9.
- Carazo-Salas, R.E., G. Guarguaglini, O.J. Gruss, A. Segref, E. Karsenti, and I.W. Mattaj. 1999. Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature.* 400:178-81.
- Chan, G.K., S.T. Liu, and T.J. Yen. 2005. Kinetochore structure and function. *Trends Cell Biol.* 15:589-98.
- Chan, G.K., B.T. Schaar, and T.J. Yen. 1998. Characterization of the kinetochore binding domain of CENP-E reveals interactions with the kinetochore proteins CENP-F and hBUBR1. *J Cell Biol.* 143:49-63.
- Charrasse, S., M. Schroeder, C. Gauthier-Rouviere, F. Ango, L. Cassimeris, D.L. Gard, and C. Larroque. 1998. The TOGp protein is a new human microtubule-associated protein homologous to the *Xenopus* XMAP215. *J Cell Sci.* 111 (Pt 10):1371-83.
- Cheeseman, I.M., S. Anderson, M. Jwa, E.M. Green, J. Kang, J.R. Yates, 3rd, C.S. Chan, D.G. Drubin, and G. Barnes. 2002. Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p. *Cell.* 111:163-72.
- Cheeseman, I.M., J.S. Chappie, E.M. Wilson-Kubalek, and A. Desai. 2006. The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell.* 127:983-97.
- Cheeseman, I.M., and A. Desai. 2008. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:33-46.
- Clemens, J.C., C.A. Worby, N. Simonson-Leff, M. Muda, T. Maehama, B.A. Hemmings, and J.E. Dixon. 2000. Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:6499-503.
- Comings, D.E., and T.A. Okada. 1971. Fine structure of kinetochore in Indian muntjac. *Exp Cell Res.* 67:97-110.
- Cooke, C.A., D.P. Bazett-Jones, W.C. Earnshaw, and J.B. Rattner. 1993. Mapping DNA within the mammalian kinetochore. *J Cell Biol.* 120:1083-91.
- DeLuca, J.G., W.E. Gall, C. Ciferri, D. Cimini, A. Musacchio, and E.D. Salmon. 2006. Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. *Cell.* 127:969-82.
- DeLuca, J.G., B. Moree, J.M. Hickey, J.V. Kilmartin, and E.D. Salmon. 2002. hNuf2 inhibition blocks stable kinetochore-microtubule attachment and induces mitotic cell death in HeLa cells. *J Cell Biol.* 159:549-55.
- Desai, A., S. Rybina, T. Muller-Reichert, A. Shevchenko, A. Shevchenko, A. Hyman, and K. Oegema. 2003. KNL-1 directs assembly of the microtubule-binding interface of the kinetochore in *C. elegans*. *Genes Dev.* 17:2421-35.
- Ditchfield, C., V.L. Johnson, A. Tighe, R. Ellston, C. Haworth, T. Johnson, A. Mortlock, N. Keen, and S.S. Taylor. 2003. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol.* 161:267-80.
- Djinovic Carugo, K., S. Banuelos, and M. Saraste. 1997. Crystal structure of a calponin homology domain. *Nat Struct Biol.* 4:175-9.
- Echard, A., G.R. Hickson, E. Foley, and P.H. O'Farrell. 2004. Terminal cytokinesis events uncovered after an RNAi screen. *Curr Biol.* 14:1685-93.

- Eggert, U.S., A.A. Kiger, C. Richter, Z.E. Perlman, N. Perrimon, T.J. Mitchison, and C.M. Field. 2004. Parallel chemical genetic and genome-wide RNAi screens identify cytokinesis inhibitors and targets. *PLoS Biol.* 2:e379.
- Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15:188-200.
- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391:806-11.
- Foltz, D.R., L.E. Jansen, B.E. Black, A.O. Bailey, J.R. Yates, 3rd, and D.W. Cleveland. 2006. The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat Cell Biol.* 8:458-69.
- Fraser, A.G., R.S. Kamath, P. Zipperlen, M. Martinez-Campos, M. Sohrmann, and J. Ahringer. 2000. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature.* 408:325-30.
- Giansanti, M.G., M. Gatti, and S. Bonaccorsi. 2001. The role of centrosomes and astral microtubules during asymmetric division of *Drosophila* neuroblasts. *Development.* 128:1137-45.
- Goldstein, L.S. 2001. Kinesin molecular motors: transport pathways, receptors, and human disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:6999-7003.
- Gonczy, P., C. Echeverri, K. Oegema, A. Coulson, S.J. Jones, R.R. Copley, J. Duperon, J. Oegema, M. Brehm, E. Cassin, E. Hannak, M. Kirkham, S. Pichler, K. Flohrs, A. Goessen, S. Leidel, A.M. Alleaume, C. Martin, N. Ozlu, P. Bork, and A.A. Hyman. 2000. Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature.* 408:331-6.
- Goshima, G., and R.D. Vale. 2003. The roles of microtubule-based motor proteins in mitosis: comprehensive RNAi analysis in the *Drosophila* S2 cell line. *J Cell Biol.* 162:1003-16.
- Goshima, G., R. Wollman, S.S. Goodwin, N. Zhang, J.M. Scholey, R.D. Vale, and N. Stuurman. 2007. Genes required for mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells. *Science.* 316:417-21.
- Guo, S., and K.J. Kemphues. 1995. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell.* 81:611-20.
- Hall, I.M., K. Noma, and S.I. Grewal. 2003. RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:193-8.
- Hamilton, A.J., and D.C. Baulcombe. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.* 286:950-2.
- Hammond, S.M., E. Bernstein, D. Beach, and G.J. Hannon. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* 404:293-6.
- Hayashi, I., and M. Ikura. 2003. Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1). *J Biol Chem.* 278:36430-4.
- Hirokawa, N., Y. Noda, and Y. Okada. 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr Opin Cell Biol.* 10:60-73.
- Howell, B.J., B.F. McEwen, J.C. Canman, D.B. Hoffman, E.M. Farrar, C.L. Rieder, and E.D. Salmon. 2001. Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J Cell Biol.* 155:1159-72.
- Howell, B.J., B. Moree, E.M. Farrar, S. Stewart, G. Fang, and E.D. Salmon. 2004. Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Curr Biol.* 14:953-64.

- Howman, E.V., K.J. Fowler, A.J. Newson, S. Redward, A.C. MacDonald, P. Kalitsis, and K.H. Choo. 2000. Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:1148-53.
- Hoyt, M.A., L. Totis, and B.T. Roberts. 1991. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell*. 66:507-17.
- Hutvagner, G., and P.D. Zamore. 2002. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 297:2056-60.
- Inoue, Y.H., M. do Carmo Avides, M. Shiraki, P. Deak, M. Yamaguchi, Y. Nishimoto, A. Matsukage, and D.M. Glover. 2000. Orbit, a novel microtubule-associated protein essential for mitosis in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol*. 149:153-66.
- Jeganathan, K.B., L. Malureanu, and J.M. van Deursen. 2005. The Rael-Nup98 complex prevents aneuploidy by inhibiting securin degradation. *Nature*. 438:1036-9.
- Kamath, R.S., A.G. Fraser, Y. Dong, G. Poulin, R. Durbin, M. Gotta, A. Kanapin, N. Le Bot, S. Moreno, M. Sohrmann, D.P. Welchman, P. Zipperlen, and J. Ahringer. 2003. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*. 421:231-7.
- Kapoor, T.M., M.A. Lampson, P. Hergert, L. Cameron, D. Cimini, E.D. Salmon, B.F. McEwen, and A. Khodjakov. 2006. Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation. *Science*. 311:388-91.
- Karess, R. 2005. Rod-Zw10-Zwilch: a key player in the spindle checkpoint. *Trends Cell Biol*. 15:386-92.
- Karsenti, E., and I. Vernos. 2001. The mitotic spindle: a self-made machine. *Science*. 294:543-7.
- Kennerdell, J.R., and R.W. Carthew. 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*. 95:1017-26.
- Khodjakov, A., R.W. Cole, B.R. Oakley, and C.L. Rieder. 2000. Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr Biol*. 10:59-67.
- Kiger, A.A., B. Baum, S. Jones, M.R. Jones, A. Coulson, C. Echeverri, and N. Perrimon. 2003. A functional genomic analysis of cell morphology using RNA interference. *J Biol*. 2:27.
- Kiyomitsu, T., C. Obuse, and M. Yanagida. 2007. Human Blinkin/AF15q14 is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1. *Dev Cell*. 13:663-76.
- Kline-Smith, S.L., and C.E. Walczak. 2004. Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics. *Mol Cell*. 15:317-27.
- Lampson, M.A., and T.M. Kapoor. 2005. The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. *Nat Cell Biol*. 7:93-8.
- Lan, W., X. Zhang, S.L. Kline-Smith, S.E. Rosasco, G.A. Barrett-Wilt, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, C.E. Walczak, and P.T. Stukenberg. 2004. Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr Biol*. 14:273-86.
- Liao, H., G. Li, and T.J. Yen. 1994. Mitotic regulation of microtubule cross-linking activity of CENP-E kinetochore protein. *Science*. 265:394-8.
- Liu, S.T., J.C. Hittle, S.A. Jablonski, M.S. Campbell, K. Yoda, and T.J. Yen. 2003. Human CENP-I specifies localization of CENP-F, MAD1 and MAD2 to kinetochores and is essential for mitosis. *Nat Cell Biol*. 5:341-5.
- Liu, S.T., J.B. Rattner, S.A. Jablonski, and T.J. Yen. 2006. Mapping the assembly pathways that specify formation of the trilaminar kinetochore plates in human cells. *J Cell Biol*. 175:41-53.

- Luders, J., U.K. Patel, and T. Stearns. 2006. GCP-WD is a gamma-tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation. *Nat Cell Biol.* 8:137-47.
- Maiato, H., J. DeLuca, E.D. Salmon, and W.C. Earnshaw. 2004. The dynamic kinetochore-microtubule interface. *J Cell Sci.* 117:5461-77.
- Maiato, H., P. Sampaio, C.L. Lemos, J. Findlay, M. Carmena, W.C. Earnshaw, and C.E. Sunkel. 2002. MAST/Orbit has a role in microtubule-kinetochore attachment and is essential for chromosome alignment and maintenance of spindle bipolarity. *J Cell Biol.* 157:749-60.
- Maiato, H., C.E. Sunkel, and W.C. Earnshaw. 2003. Dissecting mitosis by RNAi in *Drosophila* tissue culture cells. *Biol Proced Online.* 5:153-161.
- McClelland, S.E., S. Borusu, A.C. Amaro, J.R. Winter, M. Belwal, A.D. McAinsh, and P. Meraldi. 2007. The CENP-A NAC/CAD kinetochore complex controls chromosome congression and spindle bipolarity. *Embo J.* 26:5033-47.
- McEwen, B.F., J.T. Arena, J. Frank, and C.L. Rieder. 1993. Structure of the colcemid-treated PtK1 kinetochore outer plate as determined by high voltage electron microscopic tomography. *J Cell Biol.* 120:301-12.
- Megraw, T.L., L.R. Kao, and T.C. Kaufman. 2001. Zygotic development without functional mitotic centrosomes. *Curr Biol.* 11:116-20.
- Meluh, P.B., P. Yang, L. Glowczewski, D. Koshland, and M.M. Smith. 1998. Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell.* 94:607-13.
- Mitchison, T.J., and E.D. Salmon. 2001. Mitosis: a history of division. *Nat Cell Biol.* 3:E17-21.
- Moroi, Y., A.L. Hartman, P.K. Nakane, and E.M. Tan. 1981. Distribution of kinetochore (centromere) antigen in mammalian cell nuclei. *J Cell Biol.* 90:254-9.
- Murray, J.M., A.M. Carr, A.R. Lehmann, and F.Z. Watts. 1991. Cloning and characterisation of the rad9 DNA repair gene from *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* 19:3525-31.
- Musacchio, A., and E.D. Salmon. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:379-93.
- Obuse, C., O. Iwasaki, T. Kiyomitsu, G. Goshima, Y. Toyoda, and M. Yanagida. 2004. A conserved Mis12 centromere complex is linked to heterochromatic HP1 and outer kinetochore protein Zwint-1. *Nat Cell Biol.* 6:1135-41.
- Oegema, K., A. Desai, S. Rybina, M. Kirkham, and A.A. Hyman. 2001. Functional analysis of kinetochore assembly in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol.* 153:1209-26.
- Pal-Bhadra, M., B.A. Leibovitch, S.G. Gandhi, M. Rao, U. Bhadra, J.A. Birchler, and S.C. Elgin. 2004. Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery. *Science.* 303:669-72.
- Patel, S.B., and M. Bellini. 2008. The assembly of a spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nucleic Acids Res.* 36:6482-93.
- Peters, J.M. 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:644-56.
- Pines, J. 2006. Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time. *Trends Cell Biol.* 16:55-63.
- Przewlaka, M.R., W. Zhang, P. Costa, V. Archambault, P.P. D'Avino, K.S. Lilley, E.D. Laue, A.D. McAinsh, and D.M. Glover. 2007. Molecular analysis of core kinetochore composition and assembly in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE.* 2:e478.
- Rattner, J.B., and C.C. Lin. 1987. The higher order structure of the centromere. *Genome.* 29:588-93.

- Rieder, C.L. 1979. Ribonucleoprotein staining of centrioles and kinetochores in newt lung cell spindles. *J Cell Biol.* 80:1-9.
- Ris, H., and P.L. Witt. 1981. Structure of the mammalian kinetochore. *Chromosoma.* 82:153-70.
- Rogers, S.L., U. Wiedemann, N. Stuurman, and R.D. Vale. 2003. Molecular requirements for actin-based lamella formation in *Drosophila* S2 cells. *J Cell Biol.* 162:1079-88.
- Rubin, G.M., M.D. Yandell, J.R. Wortman, G.L. Gabor Miklos, C.R. Nelson, I.K. Hariharan, M.E. Fortini, P.W. Li, R. Apweiler, W. Fleischmann, J.M. Cherry, S. Henikoff, M.P. Skupski, S. Misra, M. Ashburner, E. Birney, M.S. Boguski, T. Brody, P. Brokstein, S.E. Celniker, S.A. Chervitz, D. Coates, A. Cravchik, A. Gabrielian, R.F. Galle, W.M. Gelbart, R.A. George, L.S. Goldstein, F. Gong, P. Guan, N.L. Harris, B.A. Hay, R.A. Hoskins, J. Li, Z. Li, R.O. Hynes, S.J. Jones, P.M. Kuehl, B. Lemaitre, J.T. Littleton, D.K. Morrison, C. Mungall, P.H. O'Farrell, O.K. Pickeral, C. Shue, L.B. Vossall, J. Zhang, Q. Zhao, X.H. Zheng, and S. Lewis. 2000. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science.* 287:2204-15.
- Sandall, S., F. Severin, I.X. McLeod, J.R. Yates, 3rd, K. Oegema, A. Hyman, and A. Desai. 2006. A Birl-Sli15 complex connects centromeres to microtubules and is required to sense kinetochore tension. *Cell.* 127:1179-91.
- Schittenhelm, R.B., S. Heeger, F. Althoff, A. Walter, S. Heidmann, K. Mechtler, and C.F. Lehner. 2007. Spatial organization of a ubiquitous eukaryotic kinetochore protein network in *Drosophila* chromosomes. *Chromosoma.* 116:385-402.
- Schneider, I. 1972. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol.* 27:353-65.
- Schuyler, S.C., and D. Pellman. 2001. Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning. *Cell.* 105:421-4.
- Sharp, D.J. 2002. Cell division: MAST sails through mitosis. *Curr Biol.* 12:R585-7.
- Sharp, D.J., G.C. Rogers, and J.M. Scholey. 2000. Microtubule motors in mitosis. *Nature.* 407:41-7.
- Sitterlin, D. 2005. Aster lights on RNA. *Nat Struct Mol Biol.* 12:479-80.
- Somma, M.P., F. Ceprani, E. Bucciarelli, V. Naim, V. De Arcangelis, R. Piergentili, A. Palena, L. Ciapponi, M.G. Giansanti, C. Pellacani, R. Petrucci, G. Cenci, F. Verni, B. Fasulo, M.L. Goldberg, F. Di Cunto, and M. Gatti. 2008. Identification of *Drosophila* mitotic genes by combining co-expression analysis and RNA interference. *PLoS Genet.* 4:e1000126.
- Somma, M.P., B. Fasulo, G. Cenci, E. Cundari, and M. Gatti. 2002. Molecular dissection of cytokinesis by RNA interference in *Drosophila* cultured cells. *Mol Biol Cell.* 13:2448-60.
- Spellman, P.T., and G.M. Rubin. 2002. Evidence for large domains of similarly expressed genes in the *Drosophila* genome. *J Biol.* 1:5.
- Stucke, V.M., C. Baumann, and E.A. Nigg. 2004. Kinetochore localization and microtubule interaction of the human spindle checkpoint kinase Mps1. *Chromosoma.* 113:1-15.
- Sullivan, M., and D.O. Morgan. 2007. Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:894-903.
- Tanaka, T.U., N. Rachidi, C. Janke, G. Pereira, M. Galova, E. Schiebel, M.J. Stark, and K. Nasmyth. 2002. Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell.* 108:317-29.
- Tomkiel, J., C.A. Cooke, H. Saitoh, R.L. Bernat, and W.C. Earnshaw. 1994. CENP-C is required for maintaining proper kinetochore size and for a timely transition to anaphase. *J Cell Biol.* 125:531-45.

- Topp, C.N., C.X. Zhong, and R.K. Dawe. 2004. Centromere-encoded RNAs are integral components of the maize kinetochore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:15986-91.
- Vale, R.D. 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*. 112:467-80.
- Vale, R.D., T.S. Reese, and M.P. Sheetz. 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell*. 42:39-50.
- Van Hooser, A.A., and R. Heald. 2001. Kinetochore function: the complications of becoming attached. *Curr Biol*. 11:R855-7.
- Venter, J.C., M.D. Adams, E.W. Myers, P.W. Li, R.J. Mural, G.G. Sutton, H.O. Smith, M. Yandell, C.A. Evans, R.A. Holt, J.D. Gocayne, P. Amanatides, R.M. Ballew, D.H. Huson, J.R. Wortman, Q. Zhang, C.D. Kodira, X.H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P.D. Thomas, J. Zhang, G.L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A.G. Clark, J. Nadeau, V.A. McKusick, N. Zinder, A.J. Levine, R.J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A.E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T.J. Heiman, M.E. Higgins, R.R. Ji, Z. Ke, K.A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G.V. Merkulov, N. Milshina, H.M. Moore, A.K. Naik, V.A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D.B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science*. 291:1304-51.
- Verdel, A., S. Jia, S. Gerber, T. Sugiyama, S. Gygi, S.I. Grewal, and D. Moazed. 2004. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*. 303:672-6.
- Vergnolle, M.A., and S.S. Taylor. 2007. Cenp-F links kinetochores to Ndc11/Ndc1/Lis1/dynein microtubule motor complexes. *Curr Biol*. 17:1173-9.
- Verni, F., R. Gandhi, M.L. Goldberg, and M. Gatti. 2000. Genetic and molecular analysis of wings apart-like (wapl), a gene controlling heterochromatin organization in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 154:1693-710.
- Volpe, T.A., C. Kidner, I.M. Hall, G. Teng, S.I. Grewal, and R.A. Martienssen. 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*. 297:1833-7.
- Warburton, P.E., C.A. Cooke, S. Bourassa, O. Vafa, B.A. Sullivan, G. Stetten, G. Gimelli, D. Warburton, C. Tyler-Smith, K.F. Sullivan, G.G. Poirier, and W.C. Earnshaw. 1997. Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres. *Curr Biol*. 7:901-4.
- Wei, R.R., J. Al-Bassam, and S.C. Harrison. 2007. The Ndc80/HEC1 complex is a contact point for kinetochore-microtubule attachment. *Nat Struct Mol Biol*. 14:54-9.
- Wigge, P.A., and J.V. Kilmartin. 2001. The Ndc80p complex from *Saccharomyces cerevisiae* contains conserved centromere components and has a function in chromosome segregation. *J Cell Biol*. 152:349-60.
- Wong, L.H., K.H. Brettingham-Moore, L. Chan, J.M. Quach, M.A. Anderson, E.L. Northrop, R. Hannan, R. Saffery, M.L. Shaw, E. Williams, and K.H. Choo. 2007. Centromere RNA is a key component for the assembly of nucleoproteins at the nucleolus and centromere. *Genome Res*. 17:1146-60.
- Wong, R.W., and G. Blobel. 2008. Cohesin subunit SMC1 associates with mitotic microtubules at the spindle pole. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:15441-5.
- Wong, R.W., G. Blobel, and E. Coutavas. 2006. Rae1 interaction with NuMA is required for bipolar spindle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:19783-7.

- Wordeman, L., W.C. Earnshaw, and R.L. Bernat. 1996. Disruption of CENP antigen function perturbs dynein anchoring to the mitotic kinetochore. *Chromosoma*. 104:551-60.
- Zamore, P.D., T. Tuschl, P.A. Sharp, and D.P. Bartel. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 101:25-33.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare innanzitutto il Prof. Maurizio Gatti del Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare Charles Darwin dell'Università degli Studi di Roma La Sapienza, per avermi dato la possibilità di inserirmi in questo interessante progetto di ricerca.

Desidero ringraziare la Dott. Maria Patrizia Somma dell'Istituto Biologia e Patologia Molecolari del CNR di Roma per i preziosi insegnamenti e per avermi seguito con dedizione in ogni fase di questo progetto. Un ringraziamento speciale alle Dott. Elisabetta Bucciarelli, Antonella Palena e alla Prof. Laura Ciapponi per la generosa collaborazione e per l'aiuto offerto negli esperimenti.