



Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

DOTTORATO DI RICERCA IN
GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE
XVII Ciclo (A.A. 2003/2004)

**Ruolo del sistema Ran/importine nel controllo
del fuso mitotico in cellule di mammifero**

Marilena Ciciarello

Docente Guida: Dr. Patrizia Lavia
Istituto di Biologia e Patologia Molecolari, CNR, Roma

Tutore: Prof. Massimo Levrero,
Fondazione A. Cesalpino, Università di Roma, La Sapienza

Direttore della Scuola di Dottorato:

Prof. Irene Bozzoni
Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare
Università di Roma, La Sapienza

Docenti Esaminatori:

Prof. Marco Tripodi
Dipartimento di Biotecnologie cellulari ed Ematologia
Sezione Genetica Molecolare
Università di Roma, La Sapienza

Prof. Giorgio Prantera
Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica,
Università della Tuscia, Viterbo

Prof. Angela Santoni
Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia
Università di Roma, La Sapienza

Marilena Ciciarello

INDICE

INTRODUZIONE	Pag. 5
Il network di Ran: un solo network...ma tante funzioni!	Pag. 5
Il network di Ran: meccanismi biochimici e protagonisti	Pag. 5
I processi cellulari regolati da Ran	Pag. 7
- <i>Il trasporto nucleo-citoplasma</i>	Pag. 7
- <i>Ran controlla il trasporto tra il nucleo e citoplasma...ma ha anche altre funzioni?</i>	Pag. 8
- <i>Ran nel controllo dell'uscita dalla mitosi e nella ricostituzione dell'involucro nucleare</i>	Pag. 11
- <i>Il meccanismo d'azione di Ran nell'assemblaggio del fuso: studi biochimici</i>	Pag. 12
- <i>Altre funzioni mitotiche di Ran e altri fattori regolatori del fuso</i>	Pag. 17
- <i>Ruoli mitotici di Ran in cellule di mammifero</i>	Pag. 18
Diversi pathway di formazione del fuso: i centrosomi come centri di nucleazione dei MT	Pag. 20
- <i>Centrosomi come 'speciali strumenti di divisione'</i>	Pag. 21
- <i>Centrosomi come 'terminal hub'</i>	Pag. 22
- <i>Centrosomi come 'catalizzatori' cellulari</i>	Pag. 23
- <i>Centrosomi come centri di integrazione di segnali cellulari</i>	Pag. 23
Il ruolo del network di Ran nel controllo dei centrosomi e dei poli del fuso	Pag. 24
SCOPO DEL LAVORO	Pag. 28

RISULTATI

Pag. 29

1. L'importina β localizza ai poli del fuso dopo la rottura dell'involucro nucleare
2. L'associazione dell'importina β ai poli del fuso è regolata durante la progressione mitotica
3. La localizzazione dell'importina β ai poli del fuso richiede l'integrità dei MT
4. RanGTP, RanBP1, e le importine α e β colocalizzano ai poli del fuso mitotico
5. L'associazione delle importine α e β ai MT è mediata da proteine-motore
6. La sovraespressione di importina β induce anomalie mitotiche
7. Le anomalie mitotiche indotte dalla sovraespressione di importina β sono recuperate dalla co-espressione di TPX2 e di sequenze NLS generiche
8. L'inattivazione di TPX2 impedisce l'accumulo di importina β ai poli del fuso

DISCUSSIONE

Pag. 62

- 1a. Il sistema Ran/importine: funzioni diverse con un unico meccanismo...
- 1b. ...ma con diverse strategie
2. I complessi SAF/importine si muovono lungo i MT e vengono dissociati ai poli
3. TPX2 e importina β stabiliscono un rapporto di dipendenza reciproca nell'organizzazione dei poli del fuso
4. I partner di Ran si distribuiscono in 'circuiti locali' intorno a specifiche strutture mitotiche
 - 4a. Un circuito locale di Ran ai centrosomi
 - 4b. Un circuito locale di Ran ai cinetocori
 - 4c. Un circuito locale di Ran ai MT
5. Il ruolo dell'importina β nella ricostituzione dell'involucro nucleare alla fine della mitosi
6. Le importine: vecchi cavalli di battaglia e nuove funzioni

METODI

Pag. 76

RINGRAZIAMENTI

Pag. 80

BIBLIOGRAFIA

Pag. 82

INTRODUZIONE

Un gran numero di evidenze in letteratura indica che la formazione del fuso mitotico è un processo altamente regolato, allo scopo di garantire una fedele segregazione dei cromosomi e quindi la corretta trasmissione dell'identità genetica attraverso la divisione cellulare. Studi recenti in diversi sistemi modello hanno messo in luce l'importanza, in questo processo, del network di segnalazione mediato dalla piccola GTPasi Ran. In questa tesi, è stato affrontato lo studio del meccanismo con cui questo network opera nel controllo della mitosi in cellule di mammifero.

Il network di Ran: un solo network....ma tante funzioni!

La piccola GTPasi Ran è stata identificata circa quindici anni fa (si veda il libro 'The small GTPase Ran', 2001) come membro della superfamiglia delle GTPasi. Queste proteine funzionano come una sorta di 'interruttore' nella cellula e regolano diversi processi: organizzazione del citoscheletro, adesione, locomozione, divisione. Ran, e le diverse componenti che ne regolano l'attività, costituiscono un network conservato in tutti gli organismi, dal lievito all'uomo.

Gli studi sulle funzioni di Ran hanno messo in luce una varietà di processi cellulari regolati da questa GTPasi. Tra questi, quello più chiaro dal punto di vista biochimico è il trasporto di macromolecole (RNA, proteine) tra il nucleo e il citoplasma. Ran interviene anche nel controllo del ciclo cellulare, nella ricostituzione del nucleo e dell'involucro nucleare all'uscita dalla mitosi e nell'organizzazione del fuso mitotico. Mentre questa lista si allunga e numerosi target del sistema di Ran vengono identificati, rimangono ancora non del tutto chiariti i meccanismi attraverso i quali Ran media questi differenti processi.

Il network di Ran: meccanismi biochimici e protagonisti

Prima di entrare nel merito dello studio dei processi biologici controllati da Ran è opportuno ricordare il meccanismo biochimico che sta alla base del circuito di segnalazione di questa GTPasi.

Come le altre GTPasi, Ran esiste in due forme alternative, legata al nucleotide GTP o GDP. Ran è dotata di una debole attività intrinseca di idrolisi del nucleotide. Perché avvenga il passaggio dall'una all'altra forma, *in vivo* sono necessarie proteine accessorie (Fig. 1). Il passaggio da RanGTP a RanGDP richiede il fattore d'idrolisi RanGAP1, mentre il fattore di scambio RCC1 ricarica il GTP su Ran. Esiste inoltre una terza

componente non catalitica, RanBP1, che lega selettivamente la forma di Ran legata al GTP (Coutavas et al., 1993). Attraverso questo legame, RanBP1 rende RanGTP accessibile all'idrolisi mediata da RanGAP1: l'effetto netto di questa interazione è di aumentare l'efficienza di idrolisi di GTP su Ran di un ordine di grandezza. Oltre ad agire come co-fattore di RanGAP1 nella reazione di idrolisi, RanBP1 può anche inibire l'attività di scambio di RCC1 *in vitro* (Bishoff et al., 1995), anche se questa attività non è mai stata dimostrata *in vivo*. Per la sua capacità di interagire selettivamente con la forma RanGTP, ma non con RanGDP, e di modificarne lo stato, RanBP1 è considerato il principale effettore di Ran.

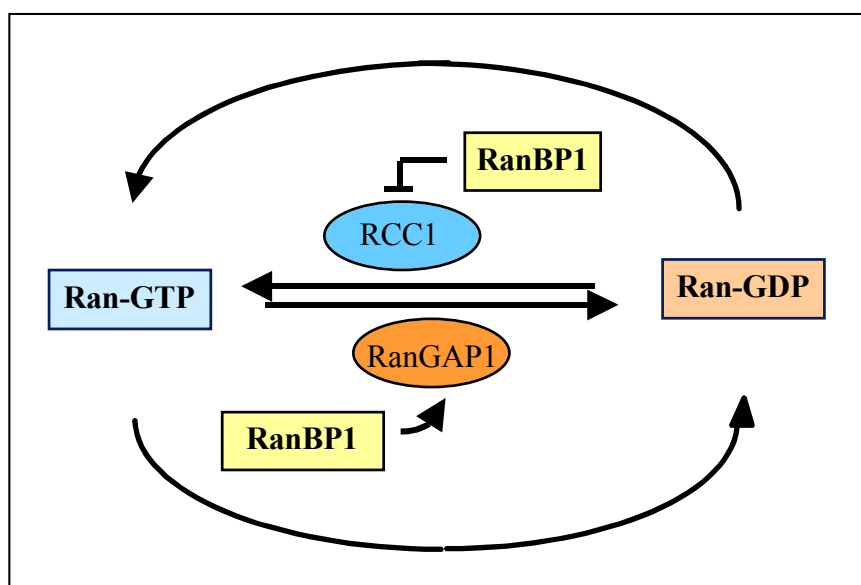


Fig. 1. Il circuito di Ran ed i principali fattori che regolano l'equilibrio fra la forma legata al GTP e quella legata al GDP.

Il fattore di scambio RCC1 è nucleare (Ohtsubo, et al., 1989; Nishitani et al., 1991) ed è in grado di legare direttamente gli istoni H2A e H2B sulla cromatina (Nemergut et al., 2001). RanGAP1 è localizzata piuttosto nel citoplasma ed è particolarmente concentrata attorno all'involucro nucleare (Matunis et al., 1996). RanBP1 ha una localizzazione prevalentemente citoplasmatica (Guarguaglini et al., 2000), determinata da una sequenza aminoacidica responsabile del suo export dal nucleo al citoplasma (Watanabe et al., 1999; Plafker and Macara 2000;

Guarguaglini et al., 2000). La particolare distribuzione dei regolatori di Ran, mostrata in Fig. 2, fa sì che l'idrolisi del GTP avvenga prevalentemente al citoplasma e lo scambio di nucleotide su Ran al nucleo. Questo significa che la maggior parte del Ran nucleare è nella forma legata al GTP, mentre il Ran citoplasmatico è prevalentemente RanGDP. Questa asimmetria è alla base del meccanismo con cui Ran regola la formazione dei complessi macromolecolari che mediano il trasporto ai due lati della membrana (Mattaj and Englmeier, 1998; Goerlich and Kutay, 1999).

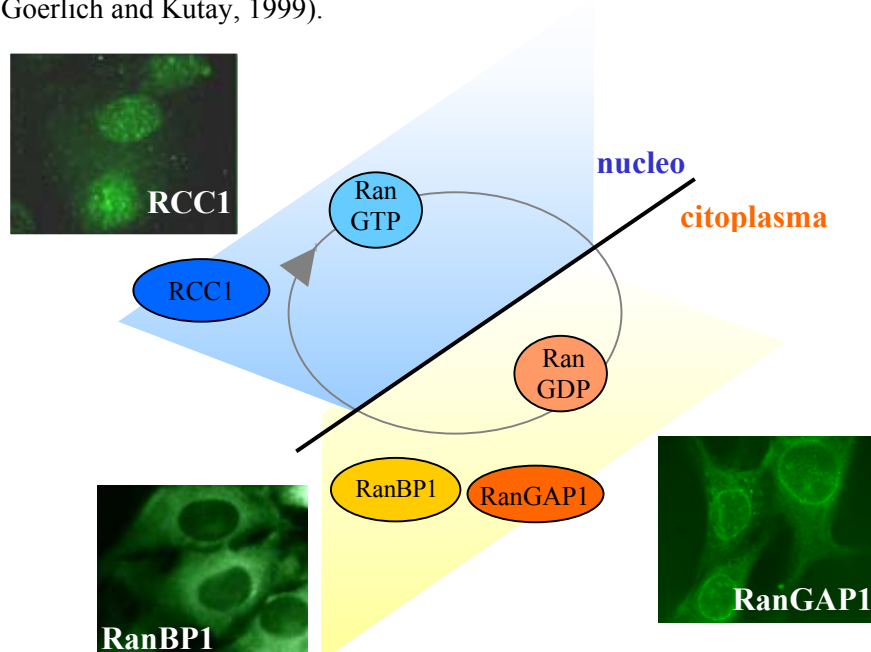


Fig. 2. La distribuzione asimmetrica dei fattori di scambio nucleotidico, e di idrolisi, ai due lati dell'involucro nucleare fa sì che RanGTP sia prevalentemente nucleare e RanGDP citoplasmatico. La compartimentalizzazione è alla base del meccanismo con cui Ran regola il trasporto nucleo-citoplasma (da Mattaj and Englmeier, 1998; Gorlich and Kutay, 1999).

I processi cellulari regolati da Ran

Il trasporto nucleo-citoplasma.

Durante l'interfase, Ran contribuisce alla corretta localizzazione cellulare di una gran varietà di molecole. Alla base di questa attività sta la capacità di Ran, nello stato alternativo di legame al GTP o al GDP, di modulare la formazione o la dissociazione di complessi multiproteici, formati dai vettori

di trasporto e dai loro substrati (d'ora in poi definiti 'carga'). I vettori del trasporto intracellulare costituiscono una famiglia di proteine che interagisce con Ran nella forma legata al GTP. La famiglia comprende membri che agiscono da recettori, sia nel processo di import (dal citoplasma al nucleo) che nell'export (dal nucleo al citoplasma). Molte proteine coinvolte nella replicazione, nel riparo, nella trascrizione ed in altri processi che si verificano nel nucleo, hanno un segnale di localizzazione nucleare (NLS), costituito da brevi sequenze di aminoacidi carichi. Il processo di import di queste proteine al nucleo è diretto da un complesso eterodimerico, costituito dall'importina α , che agisce come il recettore vero e proprio riconoscendo la sequenza NLS sui 'carga', e da una proteina che lega direttamente RanGTP, l'importina β . Nel citoplasma, l'importina β si associa al complesso formato da importina α /NLS-carga e ne facilita il movimento attraverso il poro nucleare (Goerlich e Kutay, 1999, review). RanGTP, prodotto nel nucleo da RCC1, ha un'alta affinità di legame per l'importina β . Una volta che il complesso trimerico formato da importina β /importina α /NLS-carga è traslocato nel nucleo, RanGTP lega l'importina β , determinando così la dissociazione dei complessi. Il risultato è che le proteine NLS sono rilasciate nel compartimento nucleare a cui sono destinate.

Viceversa, nel processo di export, il RanGTP nucleare favorisce il legame tra i vettori di export (collettivamente definiti esportine) con RNA o con proteine dirette al citoplasma. L'esportina Crm1 lega proteine che hanno un segnale di export (NES): questo complesso viene stabilizzato da RanGTP nel nucleo e in questa forma viene trasportato al citoplasma. Qui, l'idrolisi di GTP su Ran causa la dissociazione del complesso, completando quindi il processo di export (per una maggiore trattazione di questo argomento, vedi review Mattaj e Englmeier, 1998; Goerlich e Kutay, 1999). I processi di trasporto tra nucleo e citoplasma mediati da Ran sono schematizzati in Fig. 3.

Ran controlla il trasporto tra il nucleo e citoplasma...ma ha anche altre funzioni?

Ran e i suoi effettori agiscono in diversi processi cellulari. Molte evidenze indicano una funzione di Ran nel controllo del ciclo cellulare: mutazioni di Ran, o alterazioni nell'espressione di RanBP1 e RCC1, influenzano le principali transizioni tra le fasi del ciclo (vedi review Rush et al., 1996; Moore, 2001). Tuttavia, per molto tempo non è stato chiaro se

questi difetti del ciclo cellulare fossero indice di un ruolo diretto di Ran, o se rappresentassero piuttosto aspetti particolari del suo ruolo principale nel trasporto dei regolatori del ciclo tra nucleo e citoplasma.

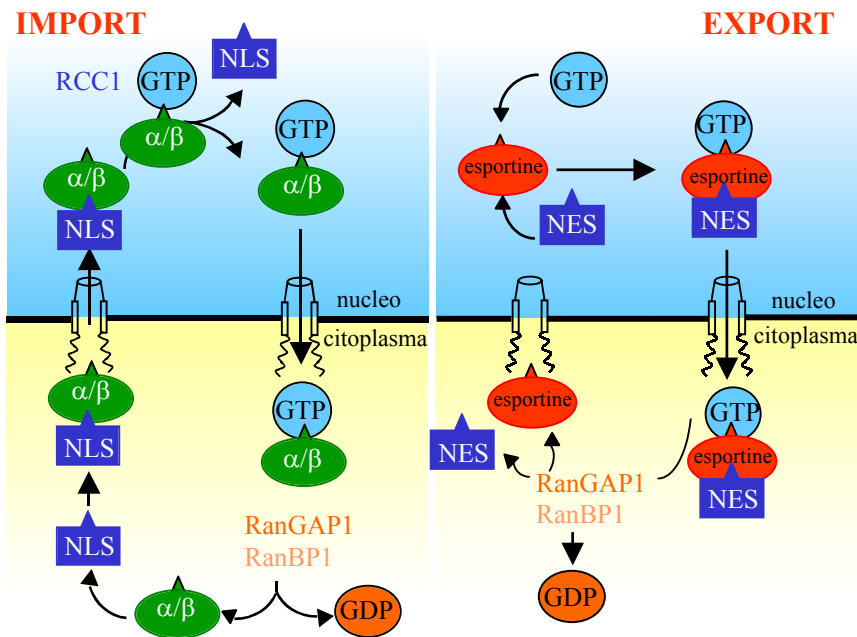


Fig. 3. Rappresentazione schematica del ciclo di *import* ed *export* delle proteine attraverso la membrana nucleare (Rielaborato da Mattaj e Englmeier, 1998). GTP è un'abbreviazione per RanGTP e GDP è un'abbreviazione per RanGDP, NLS rappresenta proteine che contengono un segnale di localizzazione nucleare, NES rappresenta proteine che contengono un segnale di export nucleare; α/β indica il complesso eterodimerico formato dalle importine α e β .

Ad esempio, cellule di hamster *tsBN2*, che hanno un allele termosensibile per RCC1, mostrano, alla temperatura restrittiva, sia un arresto alla transizione G1/S (Nishimoto et al., 1978) sia un fenomeno noto come PCC (Premature Chromatin Condensation), cioè una condensazione cromosomica simile a quella mitotica che avviene però anche quando la fase di sintesi non è stata completata (Nishitani et al., 1991). L'incapacità delle cellule di iniziare la sintesi del DNA potrebbe essere plausibilmente attribuito ad un difetto nell'export di mRNA codificanti per proteine necessarie a questo processo, o, più direttamente, ad un difetto nel loro import al nucleo. Anche la mancata coordinazione

tra la fine della sintesi del DNA e l'inizio della mitosi, potrebbe essere dovuta ad una localizzazione alterata di fattori mitotici. L'inizio della mitosi è, infatti, finemente regolato e richiede un preciso programma di eventi di import e di export dei principali regolatori mitotici: cdc25B, cdc25C e ciclina B1/cdc2; questi eventi culminano con un accumulo di questi fattori al nucleo subito prima della rottura dell'involucro nucleare (vedi review Pines, 1999; Porter e Donoghue, 2003). La stretta correlazione tra controllo del ciclo cellulare e regolazione del trasporto ha generato, quindi, per molto tempo, ambiguità nell'interpretazione delle funzioni di Ran (per una trattazione più ampia vedi review di Sazer e Dasso, 2000; Moore, 2001; Nishijima et al., 2000).

Per quanto riguarda il macchinario implicato nel trasporto, tradizionalmente si riteneva che le importine avessero una funzione esclusivamente interfascica, rimanendo sostanzialmente 'quiescenti' durante la mitosi fino alla ricostituzione della membrana nucleare e al ripristino dei processi di import nell'interfase successiva (Fig. 4).

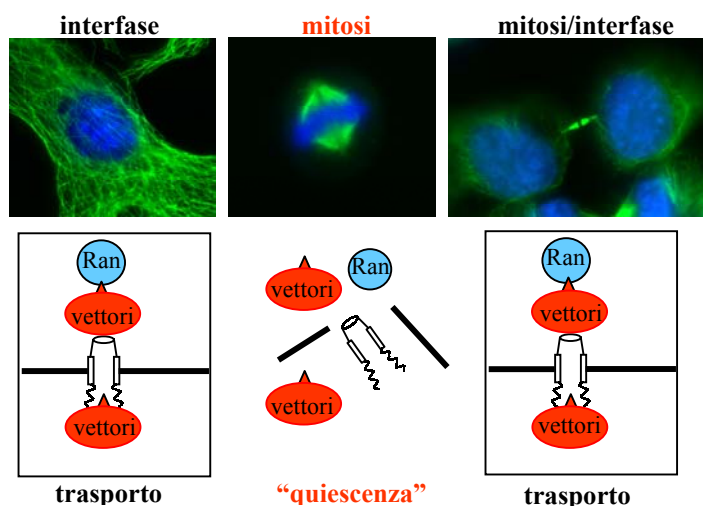


Fig. 4. Rappresentazione schematica della visione 'tradizionale' secondo la quale il sistema Ran/importine svolge una funzione esclusivamente interfascica, rimanendo sostanzialmente 'quiescente' durante la mitosi. Nei pannelli in alto, α -tubulina, verde; DNA, blu.

Negli ultimi anni sono state invece identificate almeno due funzioni di Ran indipendenti dal trasporto: la ricostituzione dell'involucro nucleare all'uscita dalla mitosi e la formazione del fuso mitotico.

Il ruolo di Ran nel controllo dell'uscita dalla mitosi e nella ricostituzione dell'involucro nucleare

In lievito, mutanti in componenti differenti del network di Ran mostrano difetti molto simili all'uscita dalla mitosi, nella condensazione cromosomica e nella ricostituzione dell'involucro nucleare (Sazer and Nurse, 1994; Demeter et al., 1995; Matynia et al., 1996). Il fatto che mutazioni in differenti componenti del sistema, anche con un ruolo biochimico opposto (vedi Fig.1), producessero fenotipi simili aveva suggerito che il corretto equilibrio tra RanGTP e RanGDP fosse essenziale per lo svolgimento di questi processi (review Rush et al., 1996; Sazer e Dasso, 2000). Esperimenti di ricostituzione dell'involucro nucleare *in vitro*, utilizzando un sistema derivato da estratti di oociti di *Xenopus*, hanno confermato questa intuizione: la deplezione di RCC1, o di RanBP1, individualmente, ha un effetto di sostanziale blocco del processo, mentre la deplezione simultanea delle due componenti ha effetti meno drammatici (Pu e Dasso, 1997). Questo risultato, apparentemente paradossale, può essere spiegato solo ammettendo che l'eliminazione di una delle due componenti sbilanci fortemente il network (vedi Fig.1), mentre la loro deplezione simultanea finisce con il ripristinare un equilibrio.

Un ruolo di Ran nell'organizzazione del nucleo interfase e della membrana nucleare era stato dimostrato fin dai primi studi in cellule di mammifero. Cellule di hamster *tsBN2* mostrano, in seguito all'inattivazione dell'allele termosensibile per RCC1 alla temperatura restrittiva, alterazioni nella ricostituzione del nucleo interfase dopo la mitosi (Nishijima et al., 2000). Anche la sovraespressione di RanBP1 in cellule di mammifero induce la formazione di nuclei anomali in cui la cromatina è ipercondensata; questi nuclei sono associati all'espressione di fosfoproteine mitotiche, e sono quindi originati da un difetto nella decondensazione della cromatina all'uscita dalla mitosi (Battistoni et al., 1997; Guarguaglini et al., 2000). Questi nuclei 'ipercondensati' presentano anche una membrana nucleare anomala, con invaginazioni nella cromatina (Di Fiore, 2001).

Esperimenti di ricostituzione dell'involucro nucleare *in vitro* hanno rivelato un ruolo diretto di Ran in questo processo (Clarke e Zhang, 2001, review). In questi saggi, sono state utilizzate biglie magnetiche, la cui superficie è stata saturata con Ran purificato: queste biglie, incubate con un estratto interfascio totale di *Xenopus* o di cellule di mammifero, sono in grado di reclutare tutte le componenti necessarie alla formazione di un involucro funzionale (Zhang e Clarke, 2000; Zhang e Clarke, 2001). Utilizzando lo stesso approccio sperimentale, è stato dimostrato che anche l'importina β riveste un ruolo chiave nel reclutare le componenti necessarie alla ricostituzione dell'involucro nucleare (Zhang et al., 2002). Studi recenti dimostrano che in assenza di RanGTP, il forte legame dell'importina β alle componenti della membrana nucleare esercita un effetto inibitorio in questo processo (Harel et al, 2003; Walther et al, 2003). E' da notare che l'effetto inibitorio dell'importina β è recuperato dall'aggiunta all'estratto di RanGTP. Questo permetterebbe ai fattori di membrana di stabilire le corrette interazioni reciproche (Harel et al., 2003). In base a queste evidenze è stato proposto che, nella ricostituzione dell'involucro, il fattore critico sia il rapporto molare tra RanGTP e importina β : il giusto rapporto tra questi due regolatori fa sì che l'involucro nucleare si formi in una maniera spazialmente corretta, cioè sulla superficie della cromatina e in una quantità proporzionale a ricoprirla (Harel e Forbes, 2004). Questi studi rivestono una grande importanza concettuale, perché mettono in luce un meccanismo diretto (cioè indipendente dall'attività di trasporto) di Ran e dell'importina β in un processo vitale per la vita della cellula, conservato dal lievito all'uomo.

Il meccanismo d'azione di Ran nell'assemblaggio del fuso: studi biochimici

Numerose evidenze, a livello sia biochimico che genetico, suggeriscono un ruolo di Ran nel controllo mitotico. Le prime evidenze sono state ottenute nel lievito *S. cerevisiae*. I geni codificanti le componenti del network di Ran, omologhi a quelli di mammifero, furono originariamente isolati in uno screening per geni che influenzano la stabilità cromosomica (Ouspenski et al., 1995), o come suppressori di mutazioni a carico del gene per l' α -tubulina che, alla temperatura restrittiva, determinano un arresto in mitosi con un eccesso di microtubuli (MT) (Kirkpatrick e Solomon 1994). In generale, inoltre, ceppi di lievito che presentano mutazioni nei geni per le componenti del network di Ran mostrano sensibilità ad agenti depolimerizzanti dei MT, malsegregazione

cromosomica, aneuploidia e letalità (Ouspenski et al., 1995; Fleig et al., 2000; Salus et al., 2002). L'idea che il network di Ran agisca nella regolazione mitotica è sostenuta anche dal fatto che in lievito, molti alleli mostrano interazione genetica con i geni classici del checkpoint mitotico (vedi Tabella 1).

Tabella 1. Interazione genetica tra componenti del network di Ran e geni mitotici in lievito

	Componenti del sistema di Ran	Interazione genetica	Referenze
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Yrb1</i> (RanBP1)	<i>pds1</i> <i>sic1</i>	Baumer et al., 2000
	<i>NTF2</i> (fattore di import per Ran)	<i>Mad2</i>	Quimby et al., 2000
	<i>ATS1</i> (RCC1)	<i>tub1</i> (mut classe1)	Kirkpatrick e Solomon, 1994
		<i>tub1</i> (mut classe2)	Kirkpatrick e Solomon, 1994
<i>S.pombe</i>	<i>Sp1</i> (Ran)	<i>Cut11</i>	Fleig et al., 2000
		<i>Mph1</i>	Fleig et al., 2000
	<i>pim1</i> (RCC1)	<i>Mad2</i>	Salus et al., 2002
		<i>Mph1</i>	Salus et al., 2002

Lo sviluppo della tecnica dell'RNA interference (RNAi) per l'inattivazione di geni ha permesso di ottenere, in sistemi modello come *C. elegans*, nuove evidenze sul ruolo mitotico del network di Ran. Questi esperimenti indicano che l'inattivazione delle componenti del network di Ran induce anomalie nella progressione mitotica e nella segregazione cromosomica (Gonczy et al 2000; Bamba et al., 2002; Askjaer et al., 2002).

Nei vertebrati, la proteina RanBP1, il principale effettore di Ran, si è rivelata la componente del network con il ruolo mitotico più chiaro. Studi svolti nel nostro laboratorio avevano da tempo indicato che l'espressione deregolata di RanBP1 provoca mitosi anomale, ha un effetto sinergico con il nocodazolo (un depolimerizzante del fuso mitotico) e inibisce sostanzialmente il rientro delle cellule nell'interfase successiva (Battistoni et al., 1997; Guarguaglini et al., 2000). Questi studi, che

verranno ripresi in seguito, e gli studi in sistemi modello, hanno dato un impulso alla ricerca del meccanismo biochimico con cui Ran regola fattori mitotici.

Per approfondire le evidenze fornite dalla genetica di lievito e *C. elegans*, e dalla biologia cellulare in mammifero, e chiarire il meccanismo d'azione di Ran nel controllo dell'apparato mitotico, sono stati sviluppati esperimenti *in vitro*. Il sistema dell'oocita di *Xenopus* è considerato il sistema d'elezione per lo studio della formazione del fuso mitotico e l'uso di estratti derivati da questi oociti è particolarmente informativo per saggiare il ruolo di specifici fattori in questo processo (vedi Murray, 1991; Sawin e Mitchison, 1991; review Merdes e Cleveland 1997; Karsenti e Vernos, 2001). Nel 1999, quattro studi pionieristici utilizzando questo sistema hanno dimostrato che la presenza di RanGTP è essenziale per la formazione del fuso mitotico (Ohba et al 1999; Zhang et al 1999; Carazo-Salas et al., 1999; Kalab et al., 1999). L'aggiunta all'estratto di RCC1 o direttamente di una forma mutante di Ran costitutivamente legata al GTP, che non può essere idrolizzato da RanGAP1, induce la formazione spontanea di aster e di strutture simili a fusi, anche in assenza di cromatina o di centrioli. La formazione di queste strutture è invece inibita dall'aggiunta all'estratto di RanGAP1, di RanBP1 o di un mutante di Ran che mima la forma RanGDP. Tuttavia, il RanGTP purificato non è di per sé in grado di stimolare la polimerizzazione di tubulina libera. Inoltre, il riarrangiamento degli aster, indotti dall'aggiunta di RanGTP all'estratto, a formare strutture bipolari, richiede l'azione di proteine-motore (tra cui la dineina), ed anche di fattori che regolano la nucleazione dei MT (tra cui la γ -tubulina) (Wilde e Zheng, 1999). Questi esperimenti indicano quindi che RanGTP non agisce direttamente nella formazione degli aster, ma stimola l'attività di altri fattori a valle.

Nello sforzo di identificare i fattori attraverso i quali Ran regola il fuso, si è pensato di preparare estratti di oociti privati di tutte le proteine in grado di legare RanGTP. A questo scopo gli estratti sono stati passati su una resina satura appunto di RanGTP e poi utilizzati nei saggi di formazione del fuso. I risultati hanno dimostrato che questo tipo di estratto induce la formazione spontanea di aster di MT. Questo approccio ha quindi permesso un salto concettuale, suggerendo che RanGTP agisca eliminando l'effetto di fattori con attività inibitoria nell'estratto, legandoli fisicamente. Inaspettatamente, questi esperimenti hanno rivelato che questi fattori inibitori sono le importine. Infatti, l'aggiunta di importina β esogena all'estratto inibisce la formazione di aster indotta da RanGTP

(Wiese et al., 2001), e una forma tronca dell'importina β priva del dominio di interazione con Ran ha un effetto inibitorio ancora più marcato (Nachury et al., 2001). Inoltre, aggiungendo un eccesso di peptide NLS, che lega l'importina α e dunque la sottrae ai suoi 'carga' naturali, si ripristina la formazione di aster nell'estratto (Gruss et al., 2001). Questi esperimenti dimostrano in maniera elegante e diretta che le importine α e β hanno un ruolo chiave nell'inibire la formazione del fuso e che questa inibizione è rimossa da RanGTP.

Il frazionamento di estratti di oocita per isolare le attività, regolate da RanGTP e importina β , specificamente responsabili della formazione degli aster, ha portato all'isolamento di due fattori: NuMA (Nachury et al., 2001; Wiese et al., 2001) e TPX2 (Gruss et al., 2001). Entrambi erano stati identificati in precedenza per la loro funzione nell'organizzazione dei poli del fuso (Merdes et al., 1996; 2000; Wittmann et al., 1998; 2000). Entrambe le proteine contengono una sequenza NLS e dunque localizzano al nucleo in interfase. NuMA contiene inoltre un dominio C-terminale di interazione con i MT. Questo dominio da solo induce la formazione di aster nell'estratto (Merdes et al., 1996). L'aggiunta all'estratto di TPX2 ha un effetto simile. Inoltre, TPX2 induce anche un certo livello di polimerizzazione spontanea della tubulina libera (Schatz et al., 2003). NuMA e TPX2 legano le importine α/β attraverso le loro sequenze NLS. Nel sistema di *Xenopus*, l'aggiunta di RanGTP, creando un legame ad alta affinità per importina β , come nel processo di import, provoca la dissociazione di questi complessi, rilasciando NuMA e TPX2 in forma libera in cui essi possono interagire produttivamente con i MT (Wiese et al., 2001; Nachury et al., 2001; Gruss et al., 2001). Queste osservazioni convergono quindi in un modello, nel quale RanGTP e importine α/β regolano la formazione del fuso con lo stesso meccanismo con cui regolano il trasporto: RanGTP, legando importina β , dissocia i complessi contenenti importine e determina il rilascio di fattori NLS capaci di promuovere l'organizzazione dei MT in un fuso. Questi fattori sono definiti nel loro insieme SAF (spindle-activating factors).

E' interessante notare che, i SAF, essendo proteine che contengono un NLS, si trovano al nucleo durante l'interfase. Questa localizzazione costituisce quindi un semplice sistema che mantiene i SAF fisicamente separati dai MT in interfase ed impedisce una prematura attivazione dell'apparato mitotico. La rottura dell'involucro nucleare è quindi un passaggio chiave nel modello: infatti, la contiguità fisica tra MT e

complessi importine-SAF dissociati da RanGTP può avere luogo soltanto dopo la rottura dell'involucro in profase, e solo vicino ai cromosomi, dove RanGTP viene continuamente rigenerato dall'azione di RCC1 legato alla cromatina (vedi review Melchior, 2001; Quimby e Dasso, 2003; Weis, 2003). Il modello è graficamente rappresentato in Fig. 5

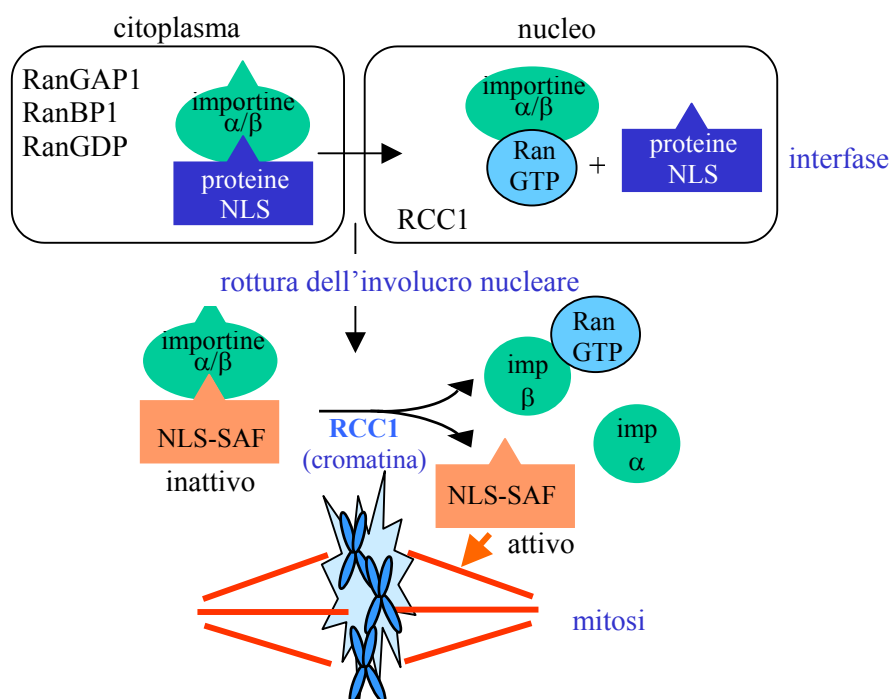


Fig. 5. Modello del meccanismo comune alla base dei processi regolati da Ran, cioè regolazione del trasporto interfascico nucleo-citoplasma e organizzazione del fuso mitotico, elaborato in base ai dati ottenuti nel sistema dell'estratto dell'oocita di *Xenopus*. In interfase le importine α/β (in verde) trasportano fattori con un segnale di localizzazione nucleare NLS (in blu) al nucleo. Qui RanGTP (in azzurro), legando l'importina β , determina il rilascio di questi fattori in forma libera. Alla rottura dell'involucro nucleare, le importine α/β rilasciano i fattori NLS-SAF (*spindle activating factors* con un segnale di localizzazione nucleare) (in arancione) in forma attiva in prossimità dei cromosomi dove è alta la concentrazione di RanGTP, promuovendo così la formazione del fuso (rielaborato da Quimby e Dasso, 2003).

In sintesi, il sistema dell'oocita di anfibio ha permesso di evidenziare un coinvolgimento diretto di Ran nella formazione del fuso. Un limite di questo sistema è che i risultati non sono completamente generalizzabili. Infatti, il fuso meioico e quello mitotico non sono identici: nei sistemi

meiotici, la formazione del fuso è diretta dalla cromatina, mentre, come vedremo più avanti, nelle cellule somatiche, la nucleazione dei MT è diretta dai centrosomi.

Altre funzioni mitotiche di Ran e altri fattori regolatori del fuso

Gli studi *in vitro* suggeriscono che il network di Ran potrebbe intervenire, potenzialmente, anche in altri aspetti della formazione del fuso mitotico. I MT sono polimeri dinamici che vanno incontro a continue transizioni da fasi di polimerizzazione a fasi di depolimerizzazione. Perché il fuso si formi, i MT mitotici devono essere stabilizzati localmente. Diversi fattori contribuiscono a questo risultato (Schroer, 2001; Cassimeris e Spittle, 2001; Kline-Smith e Walczack, 2004). Alcuni studi *in vitro* suggeriscono che RanGTP, aggiunto in forma purificata ad un sistema di MT polimerizzati, regoli direttamente la dinamica dei MT e ne stabilizzi le estremità crescenti, con un effetto misurabile con parametri fisici (Carazo-Salas et al., 2001; Wilde et al., 2001).

Un altro aspetto fondamentale della funzione del fuso mitotico, oltre ai cambiamenti nella dinamica dei MT, è l'azione delle proteine-motore. Le proteine-motore sono enzimi che accoppiano l'idrolisi dell'ATP al movimento direzionale lungo i MT del fuso, contribuendo a determinarne e mantenerne la bipolarità (Wittmann et al., 2001; Heald, 2000). E' stato proposto che Ran agisca anche a questo livello. RanGTP, infatti, regola positivamente la mobilità di Eg5 (Wilde et al., 2001), una proteina-motore della famiglia delle chinesine, che ha un ruolo fondamentale nella separazione dei poli all'inizio della mitosi e quindi nella determinazione della bipolarità del fuso (Walczack et al., 1998).

Lavori recenti hanno dimostrato che Ran può influenzare l'attività di altre due proteine-motore della famiglia delle chinesine: XCTK2 (Ems-McClung et al., 2004) e Kid (Trieselmann et al., 2003). Possedendo una sequenza NLS, possono entrambe legare le importine α e β . Questa interazione è mutualmente esclusiva rispetto al legame con i MT. RanGTP agisce dissociando il complesso con le importine e permettendo quindi l'interazione di questi regolatori con i MT (Ems-McClung et al., 2004; Trieselmann et al., 2003; vedi review Zheng, 2004). Questi due fattori, quindi, si comportano formalmente come SAF, ma non sono coinvolti nella nucleazione dei MT come NuMA e TPX2. Come proteine-motore, sono piuttosto implicate nella definizione della struttura bipolare del fuso. Questa osservazione conferma che il network di Ran modula vari aspetti dell'organizzazione del fuso.

Ruoli mitotici di Ran in cellule di mammifero

Diversi esperimenti in cellule di mammifero contribuiscono ad un quadro di evidenze ben articolato a favore di un ruolo mitotico di Ran. In generale, l'espressione di componenti del network di Ran a livelli anomali non impedisce la proliferazione delle cellule di mammifero (pur provocando alterazioni nelle transizioni tra le fasi), ma genera difetti significativi in mitosi.

La Tabella 2 sintetizza i risultati di diversi lavori nei quali, inducendo uno sbilanciamento del network di Ran, con strategie sperimentali diverse, sono stati osservati fenotipi mitotici anomali. Considerando queste evidenze nel loro insieme, si possono ricavare alcune importanti indicazioni. La prima è che la sovraespressione di Ran wild-type è in generale ben tollerata dalla cellula, mentre la sovraespressione di RanBP1, o la delocalizzazione di RCC1, o l'espressione di forme mutanti di Ran (non idrolizzabili o non ricaricabili con nucleotide), provoca anomalie mitotiche evidenti. I fenotipi osservati più di frequente, anche con strategie molto diverse, sono rappresentati dalla formazione di fusi multipolari e problemi nell'allineamento dei cromosomi sulla piastra metafasica, indicando che questi due processi mitotici sono i più sensibili ad una disfunzione nel network di Ran.

Dai dati in Tabella 2, emerge che la struttura del fuso non risente del livello assoluto di Ran nella cellula, in condizioni in cui i suoi regolatori riescano comunque a garantire un turn-over bilanciato tra le due forme legate al nucleotide, ma risente invece drammaticamente di uno sbilanciamento del network di Ran. Un esempio che ben illustra questa conclusione viene da esperimenti di espressione di mutanti di Ran bloccati in una delle due forme, cioè inibiti nello scambio o nell'idrolisi del nucleotide. Nelle cellule di mammifero, *in vivo*, entrambi questi mutanti inducono la formazione di fusi aberranti (Moore et al., 2002). *In vitro*, nei saggi biochimici nel sistema di *Xenopus*, invece, erano stati osservati effetti esattamente opposti sulla formazione di aster: RanGTP si era dimostrato indispensabile per la formazione degli aster e del fuso, mentre RanGDP aveva mostrato un effetto inibitorio (Carazo-Salas et al., 1999; Kalab et al., 1999). Quindi *in vivo*, il corretto assemblaggio del fuso, e soprattutto lo stabilirsi di un asse bipolare, richiedono un intero ciclo di idrolisi e scambio su Ran (Di Fiore et al., 2004, review).

Più in generale, l'osservazione dei fenotipi *in vivo* indica che i pathway regolativi sono probabilmente più complessi di quanto farebbero

presumere le indicazioni ottenute dagli studi *in vitro*. E' quindi fondamentale, nell'interpretare i risultati *in vitro*, che peraltro hanno un alto valore informativo per l'individuazione di fattori specifici di un dato processo, tenere conto delle restrizioni spaziali e temporali che operano in una cellula.

Tabella 2. Ruoli mitotici del network di Ran in cellule di mammifero

Data	Fenotipo	Referenze
1987-1990	RCC1ts: induce PCC in fase S alla temperatura restrittiva, dovuto a localizzazione prematura di regolatori mitotici nel nucleo (cdc25B, cdc25C, p34/cdk1); mitosi normali	Seki et al., 1992
1997	Sovraespressione di RanBP1: rallentamento nelle transizioni del ciclo; sinergismo con NOC nell'arresto in M; uscita anomala dalla mitosi	Battistoni et al., 1997
2000	Sovraespressione di RanBP1: fusi multipolari e cromosomi maleallineati	Guarguaglini et al., 2000
	Inattivazione di RanBP1 (microiniezione di un anticorpo specifico): MT iperstabilizzati; resistenza a NOC; anafase rallentata; segregazione anomala	Guarguaglini et al., 2000
2002-2004	Sovraespressione di Ran wt: nessuna alterazione mitotica significativa	Moore et al., 2002
	Sovraespressione di mutanti di Ran bloccati in forma GTP o GDP: fusi anomali e cromosomi maleallineati	Moore et al., 2002
	RCC1ts: nessuna alterazione mitotica significativa	Moore et al., 2002; Faruki et al., 2002
	Sovraespressione di RCC1 wt: nessuna alterazione mitotica significativa	Moore et al., 2002
	Delocalizzazione di RCC1: fusi multipolari e cromosomi maleallineati	Moore et al., 2002
	Eccesso di RanBP1: fusi multipolari, splitting dei centrioli nei centrosomi mitotici	Di Fiore et al., 2003
	Inattivazione di RanBP2 (RNAi): difetto nell'organizzazione dei cinetocori	Salina et al., 2003; Joseph et al., 2004

Diversi pathway di formazione del fuso: i centrosomi come centri di nucleazione dei microtubuli

Dato che il modello sul meccanismo di azione di Ran nel controllo dell'organizzazione del fuso si basa su dati ottenuti in sistemi meiotici, è importante a questo punto fare una puntualizzazione.

Nel sistema dell'oocita di *Xenopus* e, in generale, in tutte le cellule della linea germinale femminile, che sono prive di centrosomi, la nucleazione dei MT è indotta dalla cromatina (vedi review Merdes and Cleveland, 1997; Karsenti and Vernos, 2001). I MT vengono nucleati in tutte le direzioni nel citoplasma mitotico, e la loro organizzazione bipolare richiede l'attività di diverse proteine-motore che, muovendosi lungo i MT, li orientano in fasci paralleli (un modello definito 'self-assembly'). Durante questa organizzazione, complessi costituiti da dineina, dinactina e NuMA aggregano le estremità dei MT dirette verso la periferia della cellula (per convenzione, definite estremità meno (-), focalizzano queste estremità e determinano la bipolarità del fuso (review Merdes e Cleveland, 1997) (Fig. 6B).

Nelle cellule somatiche, invece, sono i centrosomi i principali centri di organizzazione dei MT. Ogni centrosoma (schematicamente rappresentato in Fig. 6A) è costituito da una coppia di centrioli immersi in una complessa matrice proteica, il materiale pericentriolare (PCM). La composizione proteica del PCM non è ancora completamente definita, ma contiene certamente la γ -tubulina ed una serie di proteine ad essa associate (γ -TURC). Sono queste proteine ad essere responsabili della nucleazione dei MT. Altre proteine del PCM, caratterizzate in maggioranza da una struttura 'coiled-coil', funzionano come siti di ancoraggio per i MT e come sedi del reclutamento di altre proteine che si associano ai centrosomi in maniera regolata (Andersen, 1999).

Nelle cellule somatiche può tuttavia esistere una 'via alternativa' alla formazione del fuso mitotico. Infatti, la distruzione fisica dei centrosomi in cellule somatiche, ottenuta direzionando su di essi raggi laser nelle fasi S o G2, non impedisce la formazione di un fuso bipolare funzionale (Hinchcliffe et al., 2001; Khodjakov and Rieder, 2001). Questo suggerisce che le cellule possano 'rilevare' l'assenza dei centrosomi ed attivare una sorta di 'scappatoia' per organizzare i MT, forse utilizzando proteine-motore, come avviene fisiologicamente nei sistemi meiotici privi di centrosomi (Compton, 1998; Rieder et al., 2001).

In condizioni normali, la capacità dei centrosomi di nucleare e organizzare i MT fornisce alla cellula un vantaggio che è stato definito cinetico: il fuso viene infatti organizzato più rapidamente dai centrosomi che non per 'self-assembly' e quindi, quando sono presenti, i centrosomi sono sempre dominanti rispetto alla nucleazione spontanea dalla cromatina (Heald et al., 1997).

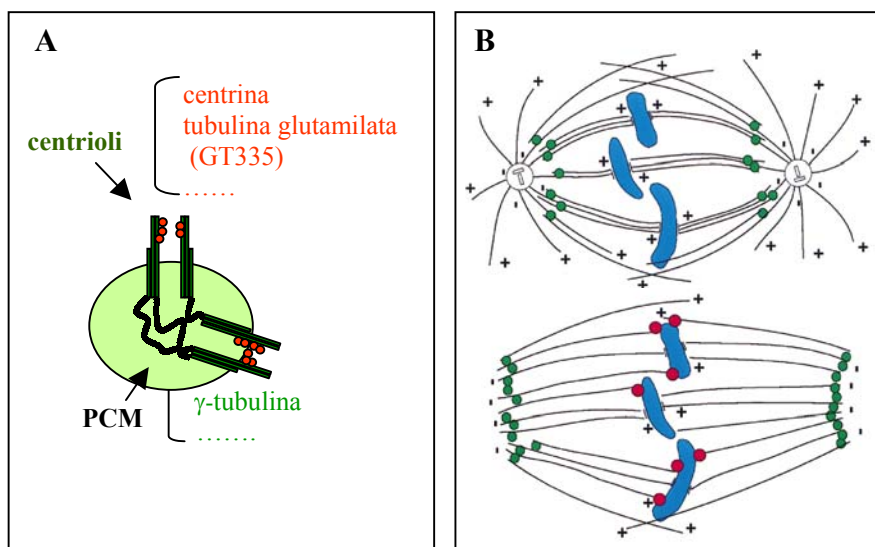


Fig. 6. A. Rappresentazione schematica del centrosoma. Sono indicati i 2 centrioli e la matrice proteica amorfa che li circonda (PCM) che contiene principalmente γ -tubulina e le proteine ad essa associate **B.** Rappresentazione schematica dei pathway di organizzazione del fuso in sistemi con e senza centrosomi. Sono indicate le estremità crescenti (+) e le origini dei MT (-). Nelle cellule somatiche (in alto) i MT sono nucleati a partire dai centrosomi; diverse proteine-motore della famiglia delle chinesine contribuiscono alla separazione dei poli e all'organizzazione della bipolarità del fuso. Nei sistemi meiotici (in basso) la nucleazione dei MT è diretta dalla cromatina. Diverse proteine-motore della famiglia delle chinesine (in rosso) sono implicate nella formazione della struttura bipolare del fuso, mentre complessi dineina/dinactina/NuMA (in verde) determinano e mantengono l'organizzazione dei poli del fuso (da Merdes e Cleveland, 1997).

Centrosomi come 'speciali strumenti di divisione'

Boveri, che fu il primo ad identificare i centrosomi nel 1888, li definì 'uno speciale strumento di divisione'. In effetti, dal momento che nelle cellule somatiche i centrosomi definiscono la struttura bipolare del fuso, essi hanno un compito fondamentale: assicurare la fedeltà della

segregazione cromosomica. L'amplificazione o la frammentazione dei centrosomi sono alla base della formazione di fusi multipolari; mentre la mancata separazione dei centrosomi all'inizio della mitosi crea fusi monopolari. In ogni caso, anomalie nel numero e nella struttura dei centrosomi portano inevitabilmente a malsegregazione cromosomica ed aneuploidie. Già Boveri nel 1914 aveva ipotizzato l'esistenza di un legame tra le anomalie centrosomali, le aneuploidie e la perdita di architettura tissutale tipica dei tumori umani. Oggi sappiamo che un numero alterato di cromosomi e di centrosomi sono le caratteristiche più frequenti nelle cellule tumorali (rev Brinkley, 2001; Doxsey, 2002; Nigg, 2002; D'Assoro et al., 2002). Proteine coinvolte nel controllo del numero di centrosomi e della bipolarità del fuso presentano spesso livelli di espressione alterati in cellule tumorali e trasformate (Meraldi et al., 2002; Raff, 2002; D'Assoro et al., 2002; Dai e Cogswell, 2003; Liu e Erikson, 2003).

Centrosomi come 'terminal hub'

Molte proteine e complessi macromolecolari localizzano al centrosoma. Questa localizzazione avviene con modalità diverse per classi di proteine diverse. Alcune proteine, specialmente quelle con funzione prevalentemente strutturale, hanno alta affinità per il centrosoma e vi si accumulano in maniera indipendente dai MT; altre proteine invece localizzano al centrosoma perché esso costituisce quella che è stata definita una 'stazione centrale' per il sistema di trasporto mediato dai MT (Rieder et al., 2001); in questo caso, le molecole vengono trasportate lungo i MT in complessi con proteine-motore. Per alcune proteine, infine, l'accumulo al centrosoma avviene solo in alcune fasi del ciclo: molte sono reclutate al centrosoma durante la fase G2 e contribuiscono al processo, noto come 'maturazione', che inizia appena i centrosomi vengono duplicati per accrescerne la capacità di nucleare MT e determinare in questi ultimi il cambiamento di dinamica che segna il passaggio dal citoscheletro interfase al fuso mitotico (Meraldi e Nigg, 2002; Palazzo et al., 2000; Blagden e Glover, 2003). Tra le proteine che si accumulano ai centrosomi, si possono annoverare anche NuMA e TPX2 che abbiamo già descritto come SAF, fattori che promuovono la formazione del fuso e la cui attività è dipendente da RanGTP. Entrambi sono fattori essenziali nell'organizzazione dei poli del fuso in cellule di mammifero (Merdes et al., 2000; Garrett et al., 2002).

Centrosomi come 'catalizzatori' cellulari

I centrosomi reclutano anche numerosi enzimi e substrati che non sono necessariamente implicati nel controllo della loro funzionalità (Andersen, 1999; Palazzo et al., 2000). Diverse proteine, tra cui chinasi, fosfatasi, componenti del macchinario proteolitico del proteasoma e proteine-motore, localizzano permanentemente o transitoriamente ai centrosomi (Andersen, 1999; Mayor et al., 1999). Alcune di queste attività potrebbero utilizzare i centrosomi come piattaforma strutturale per la coordinazione di interazioni molecolari complesse. In particolare, nelle cellule mitotiche, in cui la suddivisione tra nucleo e citoplasma viene temporaneamente distrutta, i centrosomi potrebbero essere utilizzati come una sorta di micro-ambiente specializzato per aumentare l'efficienza delle reazioni, per concentrare proteine poco abbondanti o per coordinare l'attività enzimatica con altri eventi del ciclo (Palazzo et al., 2000).

Centrosomi come centri di integrazione di segnali cellulari

E' noto da tempo che esiste un'intima correlazione tra ciclo cellulare e centrosomi. La duplicazione è un processo finemente regolato: ogni centrosoma si duplica solo una volta durante il ciclo cellulare e le due copie segregano nelle cellule figlie in seguito alla divisione mitotica (vedi review Doxsey, 2002; Hinchcliffe e Sluder 2001; Meraldi e Nigg, 2002).

Recenti osservazioni suggeriscono anche un'altra correlazione: i centrosomi devono essere presenti e funzionali perché le cellule possano proliferare. L'ablazione fisica dei centrosomi, o l'inattivazione di componenti centrosomali attraverso la tecnica dell'RNA interference (Gromley et al., 2003), inducono un arresto del ciclo in G1.

La localizzazione al centrosoma di alcune proteine implicate nel controllo del ciclo cellulare suggerisce inoltre che i centrosomi possano funzionare anche come centri di segnalazione per diversi 'checkpoint'. E' stato proposto, ad esempio, che la localizzazione dell'oncosoppressore p53 ai centrosomi mitotici costituisca un segnale di 'via libera' per la proliferazione. Quando l'assemblaggio dell'apparato mitotico è difettivo, ad esempio in presenza di agenti depolimerizzanti, la localizzazione centrosomale di p53 è impedita: questa mancata localizzazione comporta una stabilizzazione e accumulo di p53, che blocca l'ulteriore progressione del ciclo (Ciciarello et al., 2001; Tritarelli et al., 2004). Questo meccanismo permette quindi a p53 di sorvegliare l'integrità dell'apparato

mitotico, e quindi la funzionalità delle condizioni necessarie per la corretta trasmissione del materiale genetico.

In lievito, un meccanismo di controllo diretto dallo 'spindle pole body', l'analogo del centrosoma, impedisce il completamento della citochinesi quando si verificano errori nel posizionamento del fuso (vedi review Hoyt, 2000). Un checkpoint della citochinesi è stato ipotizzato anche per le cellule di mammifero. In alcuni casi, cellule prive di centrosomi falliscono la citochinesi e in alcune linee cellulari il completamento della citochinesi è legato al movimento di uno dei due centrioli a livello del mid-body (Piel et al., 2000).

In sintesi, i centrosomi rivestono nelle cellule di mammifero un ruolo fondamentale, sia come centri di nucleazione dei MT che come centri di integrazione di segnali che regolano diversi aspetti della proliferazione cellulare.

Il ruolo del network di Ran sul controllo dei centrosomi e dei poli del fuso

Nei sistemi meiotici privi di centrosomi, e nelle cellule somatiche, dove i centrosomi sono i principali centri di nucleazione dei MT, meccanismi diversi sovrintendono all'organizzazione del fuso (Fig. 6B). E' allora ragionevole ipotizzare che il controllo esercitato da Ran in mitosi operi con modalità diverse nei due sistemi. Retrospectivamente, queste diverse modalità potrebbero rendere conto delle differenze osservate nella richiesta di Ran in cellule *in vivo* (Tabella 2) e *in vitro* nel sistema di *Xenopus* discusse sopra. A conferma di quest'idea, alcune evidenze recenti indicano che, in cellule somatiche, il network di Ran interviene nella regolazione dei centrosomi e dei poli del fuso a diversi livelli.

E' stata recentemente identificata una piccola frazione di Ran che localizza stabilmente al centrosoma nelle cellule interfasiche. Questa localizzazione dipende dall'interazione con AKAP450 (Keryer et al., 2003), una proteina 'coiled-coil' che recluta diversi fattori al centrosoma (vedi review Andersen, 1999). Questo dato era inatteso, vista l'attività prevalente di 'shuttling' di Ran tra citoplasma e nucleo legata all'attività di trasporto in interfase (Fig. 3). Il complesso formato da Ran e AKAP450 è coinvolto nell'organizzazione e nell'ancoraggio dei MT al centrosoma. Infatti, la delocalizzazione forzata del complesso AKAP450-Ran dal centrosoma induce aster disorganizzati e impedisce la ricrescita dei MT interfascici (Keryer et al., 2003) (Fig. 7 a).

Studi recenti coinvolgono Ran anche nel controllo della duplicazione dei centrosomi. Questa funzione è emersa dopo la recente scoperta che Ran può interagire con oncoproteine codificate da piccoli virus a DNA (E7 di Papilloma, E1A di Adenovirus e large T di SV40) (De Luca et al., 2003). Queste oncoproteine spingono le cellule verso la fase S, sostanzialmente inattivando i regolatori del ciclo cellulare, ed inducono inoltre amplificazione del numero di centrosomi, anomalie mitotiche, aneuploidie e instabilità genomica. Nello studio dell'interazione tra Ran ed E1A, è emerso che la capacità di E1A di indurre amplificazione dei centrosomi dipende dall'interazione fisica con Ran. Infatti, un mutante di E1A, privo del dominio di interazione con Ran, non è in grado di indurre amplificazione dei centrosomi, né può indurla E1A wild-type espresso in linee cellulari mutanti per RCC1, in cui il network di Ran è alterato (De Luca et al., 2003). Questi dati, pur non indicando un ruolo diretto di Ran nella duplicazione dei centrosomi, suggeriscono che E1A, e forse anche le altre oncoproteine virali, debbano inattivare un meccanismo regolativo dipendente da Ran per sovvertire il controllo con cui la cellula limita la duplicazione dei centrosomi ad una sola volta per ciclo cellulare (Fig.7 b). Queste evidenze, rappresentate in Fig. 7a e 7b, mettono in luce nuove e inattese funzioni di Ran al centrosoma in interfase.

I dati più completi riguardano il controllo esercitato dal network di Ran specificamente sul centrosoma mitotico. Come è stato ricordato prima, la sovraespressione di RanBP1 in cellule di mammifero induce fusi multipolari e malsegregazione dei cromosomi (Guarguaglini et al., 2000). Nella ricerca delle cause di queste anomalie, nel nostro laboratorio, abbiamo osservato che anche una frazione di RanBP1 localizza al centrosoma, sia in interfase che in mitosi. La quantità di RanBP1 che si accumula al centrosoma è cruciale, in quanto l'eccesso di RanBP1 induce in mitosi una separazione anomala ('splitting') tra i due centrioli nello stesso centrosoma. Poiché ogni singolo centriolo resta ancorato ad un fascio di MT, la perdita di coesione dà origine a fusi multipolari (Di Fiore et al., 2003). E' interessante sottolineare che, nonostante RanBP1 localizzi al centrosoma durante l'intero ciclo cellulare, lo 'splitting' dei centrioli si manifesta solo in mitosi. Questo suggerisce che l'eccesso di RanBP1 interferisce con fattori che regolano l'integrità strutturale dei centrosomi e che nel fenomeno siano coinvolti fattori-NLS. Durante l'interfase, questi fattori sono verosimilmente trattenuti nel nucleo (vedi Fig. 3) e solo dopo la rottura dell'involucro nucleare raggiungerebbero i centrosomi. Qui, come è stato ricordato, sono localizzati Ran e RanBP1. E' quindi

ipotizzabile che proteine nucleari, rilasciate dal nucleo all'inizio della mitosi, siano sensibili, nella loro funzione di coesione dei poli alle quantità di Ran e di RanBP1 al centrosoma (Di Fiore et al., 2004) (Fig.7c-d).

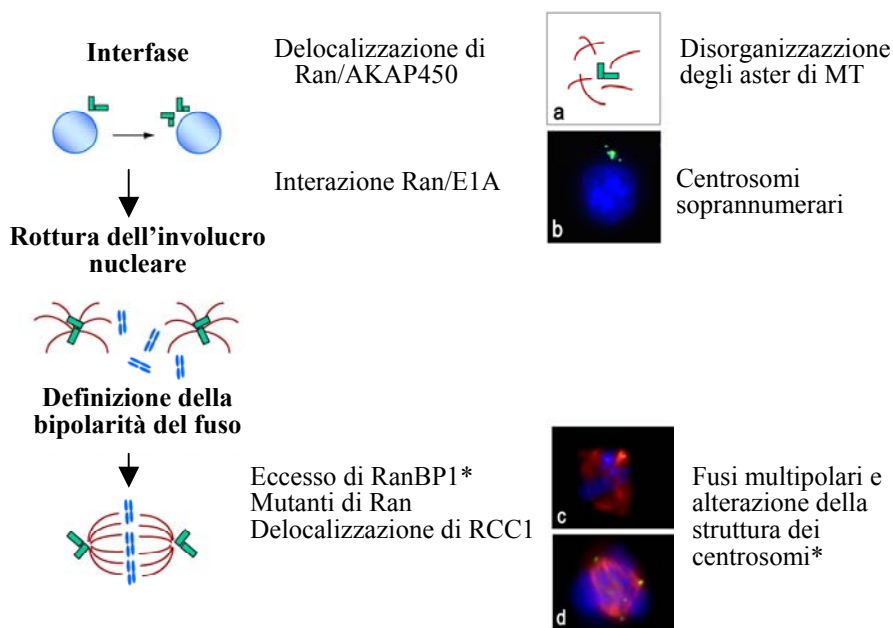


Fig. 7. Un riepilogo delle funzioni del sistema di Ran sul controllo dei centrosomi e dei poli del fuso, così come emerge dallo studio dell'alterazione di singole componenti in cellule di mammifero. Sulla sinistra sono schematizzati gli eventi fondamentali nella formazione del fuso. Nei pannelli a destra sono mostrati esempi dei difetti indotti dall'alterazione del network di Ran. (a) In interfase, Ran ha un ruolo nell'ancoraggio dei MT al centrosoma; (b) Ran è un target delle oncoproteine virali (E1A) nell'induzione di centrosomi soprannumerari; (c-d) L'eccesso di RanBP1, la delocalizzazione di RCC1, la sovraespressione di forme mutanti di Ran inducono fusi multipolari e/o alterazioni nella struttura dei poli. Con l'asterisco è indicata la condizione che in maniera specifica induce anomalie a livello dei centrosomi (rielaborato da Di Fiore et al., 2004).

Il meccanismo ipotizzato sopra è biologicamente rilevante per diverse ragioni:

1. Rende conto dei difetti di polarità del fuso evidenziati in diverse circostanze in cui vengono indotte alterazioni del network di Ran (Tabella 2 e Fig. 7 c-d);

2. Può costituire un punto di partenza per identificare una nuova rete di segnali al centrosoma, in cui è coinvolto Ran;

3. E' utile per identificare nuovi fattori con un significato prognostico o predittivo in alcuni tipi tumorali. Il gene codificante RanBP1 è regolato da fattori del pathway E2F/retinoblastoma (Di Matteo et al., 1995; Di Fiore et al., 1999), che è mutato in circa il 50% dei tumori. In accordo con queste caratteristiche regolative, un numero crescente di studi di 'gene profiling', basati su metodiche di microarray, sta evidenziando livelli aberranti di RanBP1 in diversi tipi di tumore (Guo et al., 2000; Ishida et al., 2001; Troyanskaya et al., 2002; Zhan et al., 2002; Xu et al., 2003; Difilippantonio et al., 2003; Borczuck et al., 2004; Ciciarello et al., 2004). Molti tumori sono inoltre geneticamente instabili, e come è stato ricordato prima, in molti casi questa instabilità è correlata alla presenza di centrosomi in sovrannumero o frammentati.

Per queste ragioni, ci è sembrato importante approfondire lo studio dei meccanismi con cui Ran controlla l'organizzazione e l'integrità dei poli del fuso in mitosi.

SCOPO DEL LAVORO

Gli esperimenti condotti nel sistema dell'estratto dell'oocita di *Xenopus* hanno chiarito che, in questo sistema, Ran controlla l'organizzazione del fuso mitotico favorendo il rilascio, da parte dei vettori di trasporto, di regolatori mitotici definiti 'spindle-assembly factors' (SAF) (vedi Introduzione e review Melchior, 2001; Dasso, 2002; Weis, 2003). In cellule somatiche, numerose evidenze confermano un ruolo diretto di Ran nel controllo di vari aspetti della mitosi (Guarguaglini et al., 2000; Moore et al., 2002; Di Fiore et al., 2003). Tuttavia, non sono stati ancora definiti i meccanismi cellulari di questo controllo ed in particolare non è chiaro se la formazione del fuso sia regolata, anche in questo sistema, da complessi che coinvolgono vettori di trasporto.

A questo proposito, è interessante ricordare che, in cellule di mammifero, esperimenti di microiniezione di un mutante di importina β privo del dominio di interazione con Ran, e quindi virtualmente non regolabile, induce fusi disorganizzati e difetti nell'allineamento dei cromosomi (Nachury et al., 2001). Inoltre l'inattivazione di TPX2, uno dei SAF identificati in *Xenopus*, sebbene non alteri la formazione degli aster all'inizio della mitosi nè il reclutamento di componenti strutturali dei poli del fuso, induce frammentazione dei centrioli e di conseguenza fusi multipolari (Garrett et al., 2002). Il fine di questa tesi è studiare il ruolo del sistema Ran/importine nel controllo della mitosi in cellule di mammifero. A questo scopo: (i) Abbiamo seguito il destino di importina β durante la mitosi; (ii) Abbiamo studiato la localizzazione delle componenti del sistema di Ran in relazione alla localizzazione mitotica di importina β ; (iii) Abbiamo analizzato l'effetto della sovraespressione di importina β sullo svolgimento della mitosi; (iv) Abbiamo approfondito il meccanismo di localizzazione dei complessi importine/SAF ai poli del fuso mitotico.

I nostri risultati forniscono una chiara evidenza che, nelle cellule di mammifero, il sistema Ran/importine regola l'organizzazione e la funzionalità dell'apparato mitotico.

RISULTATI

1. L'importina β localizza ai poli del fuso dopo la rottura dell'involucro nucleare

Il primo passo per approfondire il ruolo del sistema Ran/importine nel controllo della mitosi in cellule di mammifero è stato quello di analizzare la distribuzione spaziale e temporale di importina β in cellule mitotiche. A questo scopo, abbiamo studiato la distribuzione intracellulare di importina β mediante Western blot in estratti proteici di cellule HeLa e, in parallelo, mediante studi di immunofluorescenza in colture cellulari fissate secondo diversi protocolli.

1.1. Inizialmente, per validare i reagenti utilizzati in questo studio, abbiamo analizzato cellule HeLa mediante Western blot confrontando estratti totali o preparati dalla frazione nucleare e citoplasmatica. La purezza delle frazioni è stata verificata analizzando RCC1, il fattore nucleare di scambio per Ran, e RanBP1, il fattore citoplasmatico che regola il turnover di Ran. Importina β è particolarmente abbondante in estratti proteici preparati dalla frazione nucleare rispetto a quella citoplasmatica, come è atteso per un vettore di import (dati non mostrati). Abbiamo poi studiato la distribuzione subcellulare dell'importina β mediante immunofluorescenza (IF).

L'analisi di cellule interfasiche fissate con paraformaldeide (PFA) conferma che il segnale è particolarmente abbondante intorno all'involucro nucleare (Fig. 8, a). In seguito alla rottura dell'involucro nucleare, l'importina β appare completamente esclusa dai cromosomi e diffonde nel citoplasma, senza nessuna associazione evidente con particolari strutture dell'apparato mitotico (Fig. 8, b). Il fissaggio in PFA, infatti, immobilizza le proteine sia solubili che associate a strutture subcellulari, e permette quindi di evidenziare l'intero contenuto cellulare di una proteina. Quando invece le cellule sono sottoposte ad estrazione con il detergente Triton X-100 prima del fissaggio, vengono eliminate le frazioni solubili delle proteine, e si visualizzano selettivamente le popolazioni proteiche che interagiscono con particolari strutture subcellulari. Usando queste condizioni in cellule interfasiche, l'anticorpo diretto contro importina β mette in evidenza una frazione saldamente associata alla membrana nucleare, evidenziata da un segnale 'puntinato'

alla periferia del nucleo, indicativo di una stretta associazione ai pori nucleari (Fig. 8, c). Applicando queste condizioni di pre-estrazione e fissaggio a cellule mitotiche, inaspettatamente, abbiamo visualizzato una frazione discreta di importina β ai poli del fuso (Fig. 8, d).

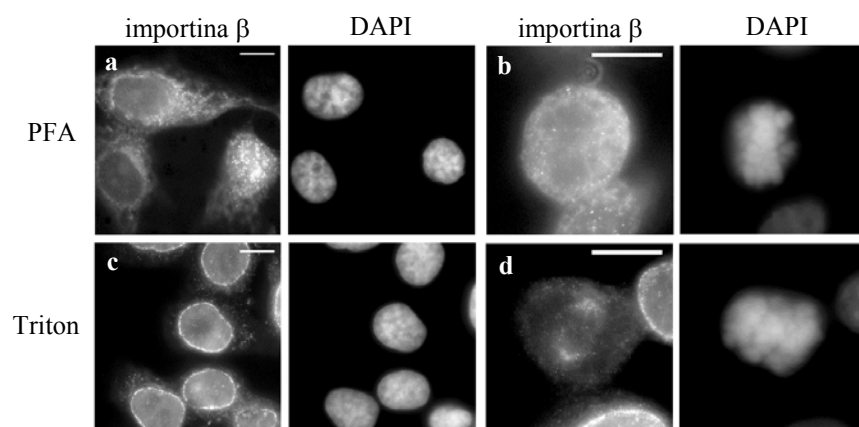


Fig. 8. Localizzazione dell'importina β in cellule interfasiche (a, c) o mitotiche (b, d) in seguito a fissaggio con PFA (a, b) o pre-estrazione con Triton X-100 (c, d); in ogni serie, l'importina β evidenziata mediante IF è mostrata nei pannelli di sinistra e la colorazione con DAPI in quelli di destra. Barre, 10 μ m.

Per confermare il valore generale di questa localizzazione inattesa, abbiamo utilizzato lo stesso protocollo per analizzare cellule murine L929 (epiteliali) e NIH-3T3 (fibroblasti). L'analisi per IF nelle condizioni di pre-estrazione descritte sopra mostra che importina β localizza ai poli del fuso anche in queste linee cellulari (Fig. 9, a-b).

1.2. Per studiare la distribuzione mitotica dell'importina β ad un livello di risoluzione superiore, abbiamo analizzato cellule HeLa in mitosi mediante microscopia confocale. Come si vede in Fig. 10A, in metafase l'importina β localizza chiaramente ai poli del fuso, messi in evidenza dalla colorazione con la γ -tubulina. Il grafico in Fig. 10B mostra che i picchi di intensità dei segnali per importina β (in verde) e γ -tubulina (in rosso) sono perfettamente sovrapposti. La Fig. 11 mostra che questa colocalizzazione viene mantenuta attraverso tutti i piani scansionati. Il segnale per l'importina β è visibile, anche se in misura minore, anche lungo i microtubuli (MT) del fuso mitotico.

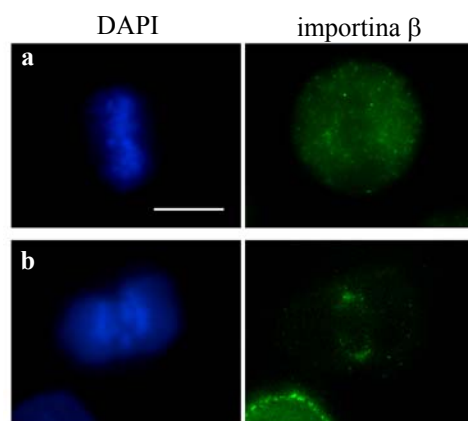


Fig. 9. L'importina β localizza ai poli del fuso anche in cellule murine. Analisi mediante IF di importina β in cellule L929 (a) o NIH-3T3 (b). Il DNA, visualizzato mediante colorazione con DAPI, è mostrato nei pannelli di sinistra, la colorazione per importina β nei pannelli di destra. Barra, 10 μm .

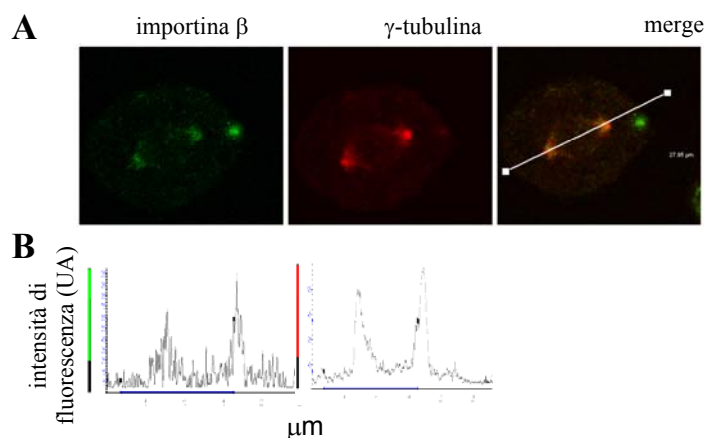


Fig. 10. A. Co-localizzazione mediante analisi al microscopio confocale (TCS-SP2 Leica) di importina β (FITC, verde) e γ -tubulina (rodamina, rosso) ai poli del fuso di una metafase in cellule HeLa. I segnali sovrapposti sono mostrati nel pannello a destra (merge). **B.** I grafici mostrano i picchi di maggiore intensità di fluorescenza nel rosso e nel verde. In ordinata è riportata l'intensità di fluorescenza in unità arbitrarie (UA).

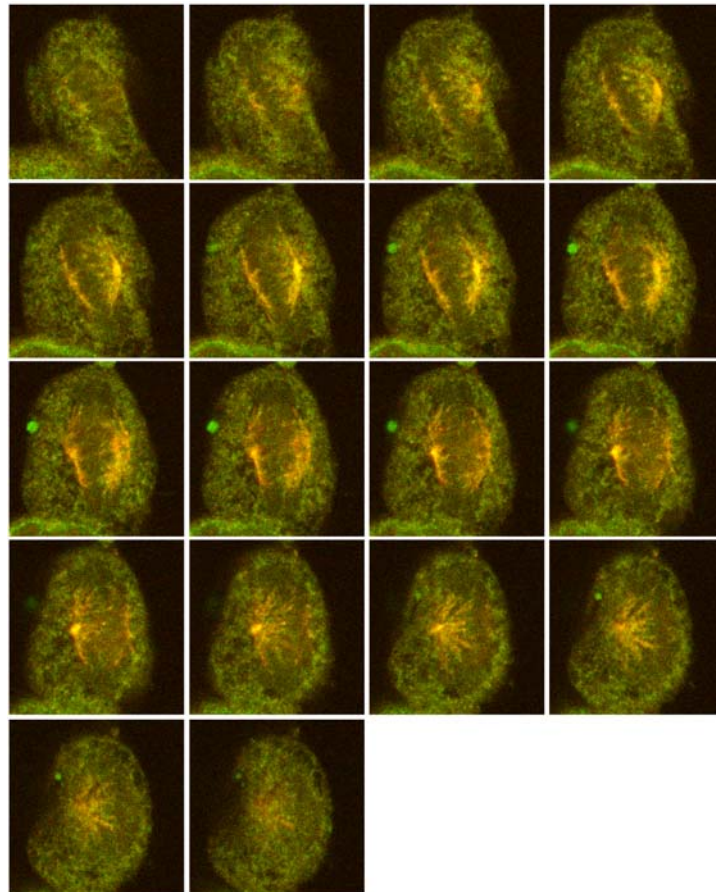


Fig.11. Analisi al microscopio confocale (LSM 510 META, Zeiss) della localizzazione di importina β (verde) e γ -tubulina (rosso) in metafase in cellule HeLa. I segnali ottenuti nei due canali (verde e rosso) e sovrapposti nell'immagine, co-localizzano ai poli in tutte le sezioni della cellula in metafase (sezioni 0,37 μ m).

2. L'associazione dell'importina β ai poli del fuso è regolata durante la progressione mitotica

2.1. Da questo momento e per tutto il resto del lavoro, le condizioni di pre-estrazione/fissaggio, con cui abbiamo messo in evidenza la frazione di importina β associata ai poli del fuso, sono state utilizzate per seguire il suo destino durante la progressione mitotica.

In Fig. 12A, colonna a, è visibile il tipico 'pattern' interfase dell'importina β , con segnali associati all'involucro nucleare, in una cellula che si trova in G2, come si deduce dai due segnali per γ -tubulina, che indicano che la duplicazione dei centrosomi è già avvenuta. Dalla G2 alla prometafase, l'involucro nucleare si dissolve gradualmente; durante questa transizione, il segnale dell'importina β è debole ed è visibile solo in una piccola proporzione di cellule (quantificate nell'istogramma in Fig. 12B); dove è visibile, il segnale colocalizza con l'aster in via di formazione (Fig. 12A, colonna b). Per approfondire il significato di questo risultato, abbiamo voluto escludere che la perdita di segnale, nella finestra di tempo tra la rottura dell'involucro nucleare e la prometafase, fosse dovuta ad una fluttuazione quantitativa del livello di importina β durante il ciclo. Per questo, abbiamo analizzato cellule fissate in PFA allo stesso stadio: l'importina β mostra un segnale intenso in assenza di pre-estrazione (dati non mostrati). Inoltre, abbiamo svolto esperimenti di Western blot in colture di cellule HeLa pre-sincronizzate alla transizione G1/S in presenza di timidina, poi rilasciate in assenza di timidina per farle proseguire nel ciclo cellulare in modo sincrono e raccolte a vari tempi dal rilascio in presenza, o assenza, dell'inibitore della sintesi proteica cicloesimide (CHX). Questi esperimenti dimostrano che i livelli di importina β rimangono stabili per almeno 12 ore successive al rilascio, anche in assenza di sintesi proteica (Fig. 12C), escludendo quindi che i livelli di importina β varino quantitativamente durante la mitosi. La perdita di segnale dalla G2 alla prometafase precoce, quindi, è evidentemente dovuta alla solubilizzazione: l'importina β , rilasciata dall'involucro nucleare che si sta dissolvendo, in questa finestra di tempo non interagisce stabilmente con nessuna struttura cellulare e viene quindi rimossa dall'estrazione con il detergente Triton X-100. In prometafase e in metafase, compaiono segnali nuovamente abbondanti per importina β , chiaramente associati ai poli del fuso e colocalizzanti con la γ -tubulina (Fig. 12A, colonne c-d). In anafase, l'importina β comincia a staccarsi dai poli per poi distribuirsi, mentre inizia la telofase, intorno alla cromatina in via di segregazione (Fig. 12A, colonne e-f).

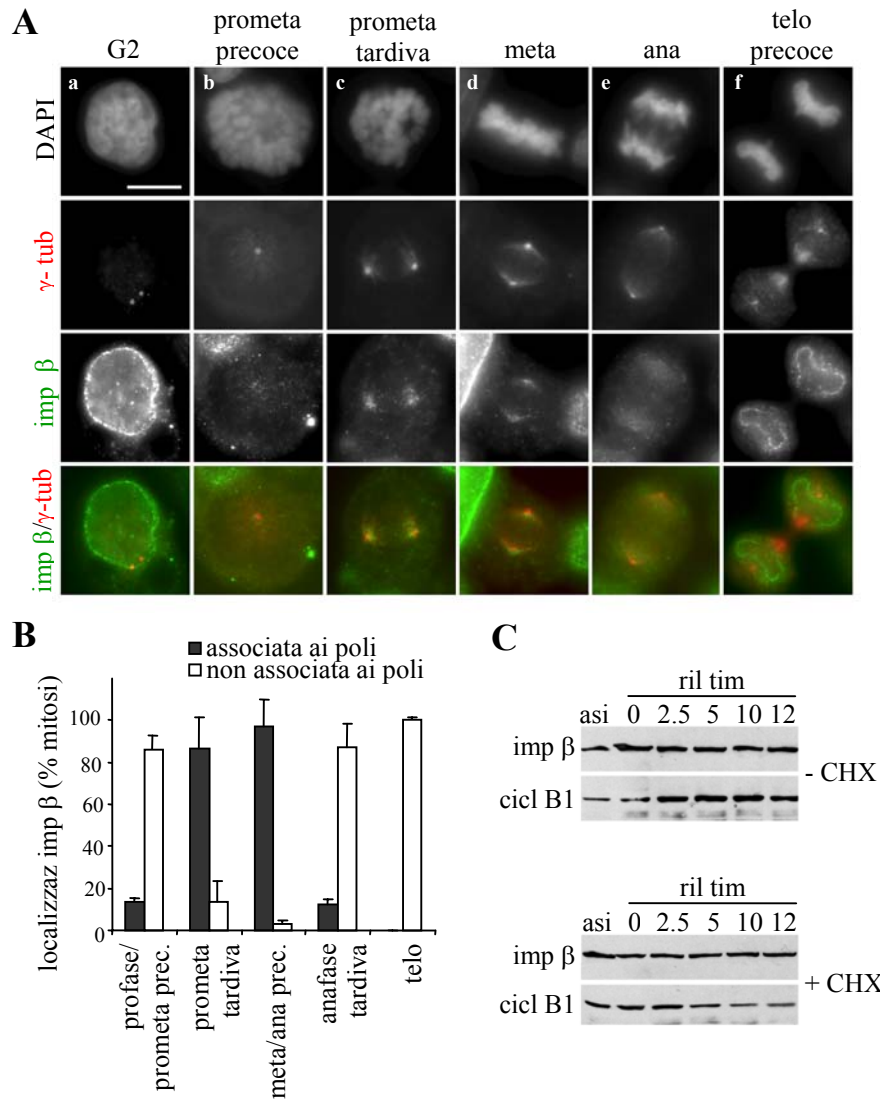


Fig. 12. La localizzazione di importina β ai poli del fuso è regolata temporalmente durante la mitosi. **A.** Le fasi della progressione del ciclo in cui si trovano le cellule fissate analizzate vengono individuate mediante colorazione con DAPI (fila in alto) e dai segnali dei centrosomi, visualizzati mediante colorazione della γ -tubulina (rosso, seconda fila); l'importina β è mostrata in verde (terza fila); la fila in basso mostra la sovrapposizione dei segnali della γ -tubulina e dell'importina β . Barra, 10 μ m.

Fig. 12 B. Frequenza di cellule mitotiche in cui i segnali di importina β sono associati o delocalizzati dai poli del fuso. Sono state analizzate almeno 100 figure mitotiche per stadio in 3 esperimenti indipendenti. **C.** Western blot di importina β in estratti preparati da colture di cellule HeLa asincrone (asi), arrestate alla G1/S mediante blocco in timidina (tempo 0), e raccolte ai tempi indicati dopo il rilascio, in presenza o meno dell'inibitore della sintesi proteica cicloesimide (CHX). Come controllo, i livelli di ciclina B1 presentano un picco tra le 5 e le 10 ore dopo il rilascio dal blocco (progressione dalla G2 alla mitosi) che è dipendente dalla sintesi proteica.

2.2. La specificità dell'associazione dell'importina β ai poli durante la progressione mitotica è stata infine confermata usando un anticorpo secondario indipendente, coniugato con un fluorocromo rosso (Texas red). Nella linea cellulare HC1, derivata dalle cellule HeLa, che esprime stabilmente una chimera centrina 1-GFP e che permette quindi di identificare i centrioli senza la necessità dell'immunofluorescenza (Piel et al., 2000), il segnale dell'importina β circonda la coppia di centrioli a ciascun polo dalla prometafase all'anafase (Fig. 13).

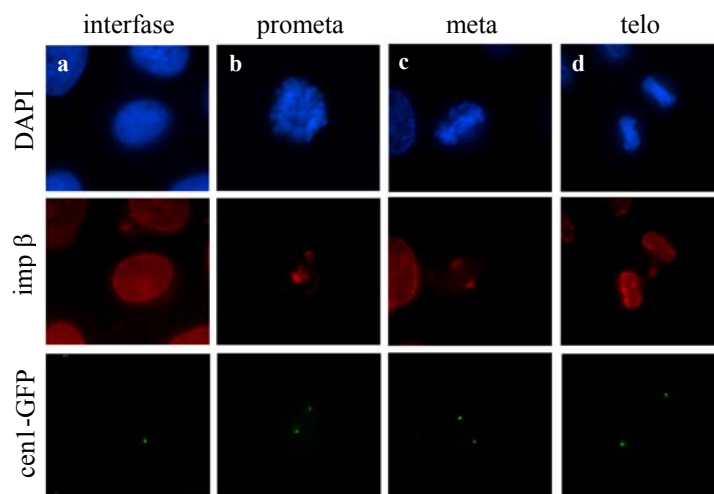


Fig
Fig. 13. Cellule HeLa esprimenti stabilmente una proteina di fusione centrina1-GFP (HC1) (verde, fila inferiore di immagini) sono state colorate per importina β (rosso, fila centrale). Le cellule interfasiche e i diversi stadi della mitosi sono stati identificati mediante colorazione del DNA con DAPI (fila in alto).

3. La localizzazione dell'importina β ai poli del fuso richiede l'integrità dei MT

3.1. Ci siamo chiesti a questo punto se l'accumulo dell'importina β ai poli del fuso mitotico fosse dipendente dai MT. Per arricchire la popolazione cellulare di cellule mitotiche, abbiamo sincronizzato colture di cellule HeLa alla transizione G1/S in presenza di timidina. Le cellule sono state poi rilasciate dal blocco per proseguire fino alla mitosi (Fig 14A, a), oppure esposte a nocodazolo (NOC) durante le ultime ore di rilascio per inibire la polimerizzazione dei MT durante la progressione verso la mitosi. L'efficacia della depolimerizzazione dei MT è stata controllata mediante IF contro l' α -tubulina, il principale costituente dei MT (Fig 14A, b).

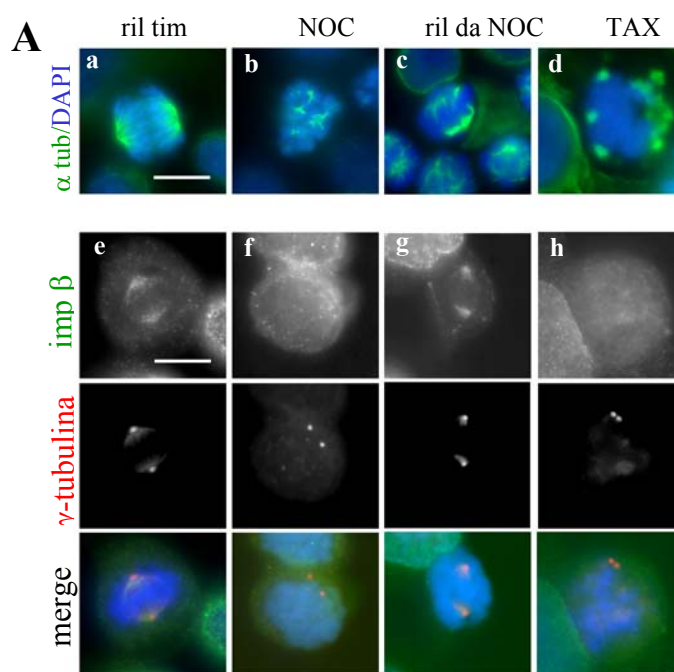


Fig. 14. La localizzazione di importina β agli aster/poli del fuso dipende dall'integrità e dalla dinamica dei MT. **A.** Analisi per IF dei segnali di importina β /FITC (verde) e γ -tubulina/rodamina (rosso) in cellule mitotiche rilasciate da blocco in timidina ed esposte a NOC o TAX o rilasciate da trattamento con NOC. La fila superiore di immagini (α -tubulina, verde; DAPI, blu) mostra l'effetto dei diversi trattamenti sui MT. Barre, 10 μ m.

Dopo la pre-estrazione in Triton X-100, il segnale dell'importina β appare molto debole in cellule trattate con NOC e prive di MT, e il segnale residuo non ha una localizzazione definita (Fig. 14A, f). Quando il NOC viene rimosso, la nucleazione dei MT riprende rapidamente (Fig. 14A, c), e l'importina β localizza nuovamente ai poli del fuso (Fig. 14A, g), indicando che l'integrità dei MT è essenziale per questa localizzazione. Per verificare se la sola presenza dei MT sia sufficiente di per sé, o se questi debbano anche essere capaci di dinamica perché l'importina β localizzi correttamente ai poli, cellule HeLa sincronizzate in timidina e poi rilasciate come descritto sopra sono state trattate con taxolo (TAX) per le ultime 4-6 ore di coltura prima della raccolta: in queste condizioni, i MT mitotici sono iperstabilizzati e completamente riorganizzati in piccoli fasci (Fig. 14A, d). Anche in queste condizioni, è impedito l'accumulo di importina β ai poli, ed il segnale non colocalizza quindi con la γ -tubulina, ma rimane diffuso (Fig. 14A, h). Quindi, veleni del fuso che inibiscono o la polimerizzazione o la dinamica dei MT impediscono la localizzazione dell'importina β ai poli del fuso (Fig. 14B).

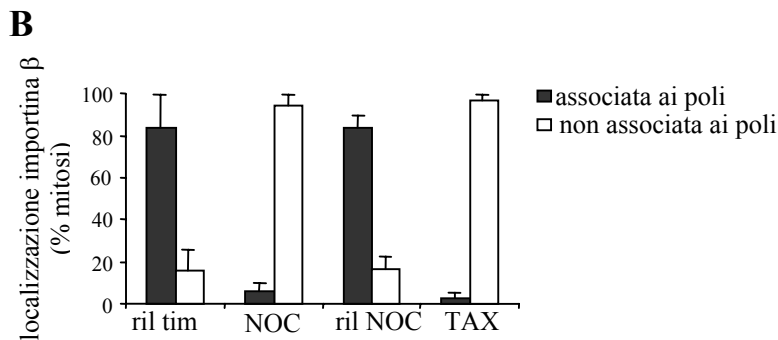


Fig. 14 B. Frequenza delle figure mitotiche in cui importina β localizza con gli aster/poli del fuso in presenza di droghe dirette contro i MT. Sono state analizzate 200 mitosi per condizione in 4 esperimenti indipendenti.

3.2. Dal momento che le droghe che hanno come bersaglio i MT hanno anche l'effetto di bloccare le cellule nelle fasi precoci della mitosi, abbiamo voluto confermare i nostri risultati in popolazioni cellulari che si trovassero a vari stadi della mitosi, ed in cui la funzione dei MT fosse

inibita dopo la completa organizzazione del fuso mitotico. A questo scopo, abbiamo incubato popolazioni cellulari arricchite in figure mitotiche (sempre mediante il protocollo di pre-sincronizzazione in timidina e rilascio) in ghiaccio (0°C) (Fig. 15A, b). In queste condizioni, si possono osservare mitosi nelle quali la depolimerizzazione dei MT è indotta dopo che i cromosomi hanno completato l'allineamento nella piastra metafasica e che mantengono una normale organizzazione dei centrosomi (un esempio è mostrato in Fig. 15A, l). In queste mitosi, l'importina β dà un segnale debole, diffuso e non localizzato ai poli (15A, f). Quando le colture vengono incubate nuovamente a 37°C, la polimerizzazione dei MT riprende nel giro di pochi minuti (Fig. 15A, c-d), ed è accompagnata da un'altrettanto rapida rilocalizzazione dell'importina β ai poli (Fig. 15A, g-h).

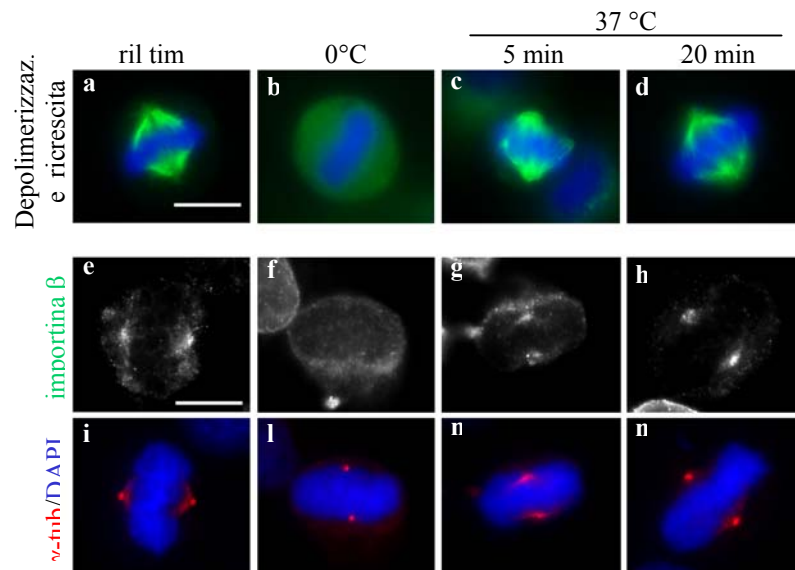


Fig. 15. La localizzazione mitotica dell'importina β è sensibile allo stato di depolimerizzazione (0°C) o di ricrescita (37°C) dei MT dipendenti dalla temperatura. **A.** Controllo della depolimerizzazione e ricrescita dei MT (α -tubulina, verde; DAPI, blu). Vetrini paralleli sono stati colorati per importina β (FITC, verde, pannelli e-h) e γ -tubulina (rodamina, visualizzata insieme alla colorazione del DNA, blu, pannelli i-n). Barre, 10 μ M.

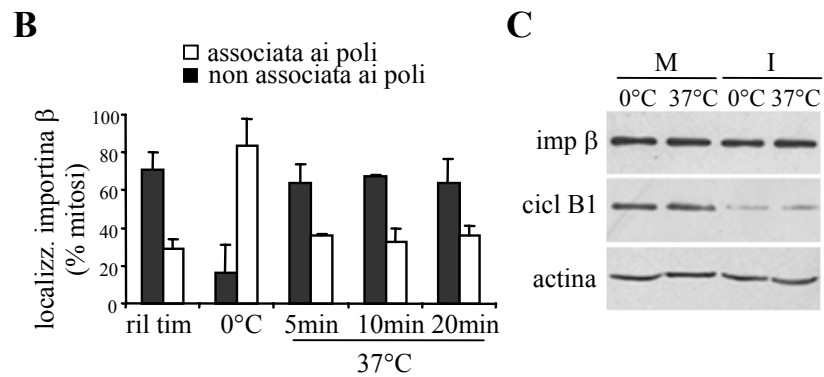


Fig.15 B. Frequenza di mitosi in cui l'importina β è associata o delocalizzata dai poli del fuso nelle condizioni analizzate. Sono state osservate almeno 100 mitosi per ogni condizione in 2 esperimenti indipendenti. **C.** Western blot di importina β in interfase (I) e mitosi (M), in presenza (37°C) o assenza (0°C) di MT polimerizzati.

I risultati di queste osservazioni sono riassunti e quantificati in Fig. 15B. In parallelo, abbiamo analizzato l'abbondanza di importina β mediante Western blot in estratti preparati da popolazioni di cellule mitotiche pure (raccolte per "shake-off" in base alla perdita di adesione caratteristica della mitosi) e da interfasi che rimangono adese, e successivamente incubate in ghiaccio o a temperatura ambiente. Non è stata osservata alcuna variazione nei livelli di importina β in nessuna condizione (Fig. 15C): questo ci permette di concludere che, anche in questo caso, la perdita di segnale osservata nelle mitosi prive di MT polimerizzati è da attribuirsi alla solubilizzazione dell'importina β ed alla sua mancata associazione all'apparato mitotico, piuttosto che a variazioni quantitative durante la mitosi.

Nel loro insieme, quindi, questi risultati indicano che l'importina β si accumula ai poli del fuso mitotico in maniera dipendente dall'integrità e dalla dinamica dei MT.

4. RanGTP, RanBP1 e le importine α e β colocalizzano ai poli del fuso mitotico

Come è stato ricordato in Introduzione, una frazione di RanBP1 e di Ran localizza ai centrosomi per tutta la durata del ciclo cellulare (Keryer et al., 2003; Di Fiore et al., 2003). Inoltre, esperimenti biochimici hanno rilevato la presenza di RanBP1 e Ran, nella forma legata al GTP, nella frazione centrosomale purificata da cellule asincrone, e quindi principalmente interfasiche (Keryer et al., 2003; Di Fiore et al., 2003).

4.1. Dal momento che, in base al modello di *Xenopus*, ci si attende che l'interazione di RanGTP con importina β sia critica per l'attivazione dei SAF che contengono un NLS, ci è sembrato importante verificare se RanGTP e importina β colocalizzassero effettivamente nelle cellule mitotiche. Per rispondere a questa domanda, abbiamo usato un anticorpo (AR-12) che riconosce la particolare conformazione di Ran legato al GTP, e lega quindi preferenzialmente RanGTP nella cellula (Richards et al., 1995). Cellule mitotiche ottenute da colture sincronizzate in timidina e poi rilasciate sono state permeabilizzate per poter far penetrare l'anticorpo; l'incubazione con l'anticorpo AR-12 è poi avvenuta in condizioni native, proprio per preservare le proteine nella loro conformazione originale. Le cellule sono state successivamente fissate per essere analizzate mediante IF. Abbiamo utilizzato due differenti combinazioni di anticorpi secondari per rilevare i segnali dell'importina β e del RanGTP (Fig. 16, a-b). Nelle nostre condizioni, la frazione solubile di RanGTP viene estratta; la frazione che rimane visibile è associata ai poli del fuso e, in misura minore, ai MT. Dalla prometafase all'anafase, quindi importina β colocalizza con RanGTP ai poli del fuso.

4.2. Il modello di attivazione dei fattori NLS-SAF presuppone che, oltre al RanGTP e all'importina β , anche l'importina α , la proteina 'adattatore' che riconosce direttamente le sequenze NLS, si trovi negli stessi siti. Le cellule di mammifero esprimono differenzialmente diverse isoforme di importina α che hanno sottili differenze nella specificità di riconoscimento per diverse sequenze. Nei nostri esperimenti, noi abbiamo analizzato l'importina $\alpha 1$ (Fig. 16B) e $\alpha 2$ (dati non mostrati): in cellule mitotiche fissate in PFA, si osserva un arricchimento della proteina in corrispondenza del fuso mitotico; la pre-estrazione con detergente lascia solo una piccola frazione di importina $\alpha 1$, anch'essa associata ai poli del

fuso. In anafase, l'importina $\alpha 1$ viene reclutata intorno alla membrana dei nuclei in via di formazione, con una cinetica molto simile a quella precedentemente descritta per β . In conclusione, quindi, importina α e β colocalizzano con RanGTP ai poli del fuso dalla prometafase all'anafase.

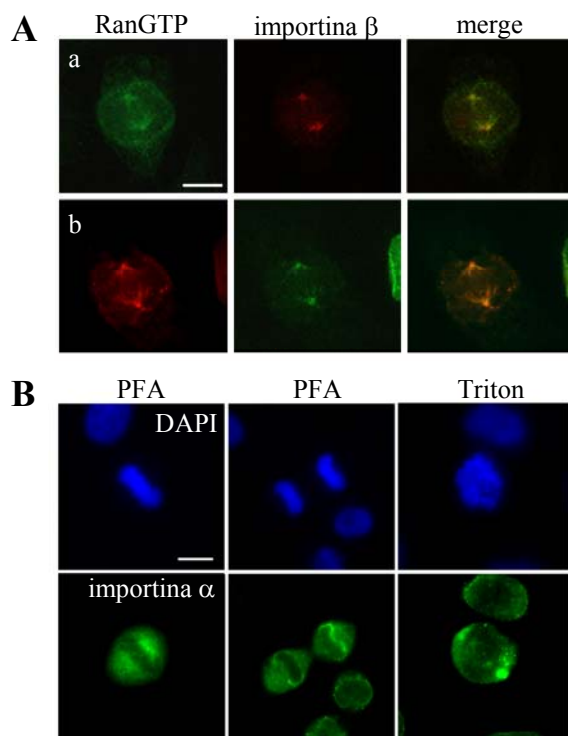


Fig. 16. RanGTP, RanBP1, importina β e α co-localizzano ai poli del fuso. **A.** L'anticorpo AR-12 è stato usato in cellule non fissate per riconoscere RanGTP nella conformazione nativa. Le cellule sono state poi incubate con anticorpi secondari coniugati al fluorocromo FITC (fila a) o rodamina (fila b). L'importina β è stata rilevata utilizzando anticorpi secondari coniugati con il fluorocromo Texas red (fila a) o FITC (fila b) Barra, 10 μm . **B.** Colorazione per importina $\alpha 1$ in metafase (sinistra) ed anafase (pannello centrale) dopo fissaggio con PFA; dopo trattamento con Triton X-100 (pannello a destra) viene evidenziata una frazione associata ai poli del fuso. Barra, 10 μm .

4.3. Abbiamo voluto dimostrare, inoltre, che nelle stesse cellule anche RanBP1 colocalizza con l'importina β ai poli del fuso in mitosi. RanBP1, che in presenza di RanGAP1 favorisce l'idrolisi di nucleotide su Ran, in

assenza di altri regolatori ha invece l'effetto opposto e stabilizza la forma di Ran legata al GTP (Bischoff et al., 1995). Esperimenti di doppia IF dimostrano che anche RanBP1 effettivamente co-localizza ai poli con importina β (Fig. 16C). Poiché è stato dimostrato che RanGAP1 localizza al fuso mitotico, ma è specificamente esclusa dai poli (Joseph et al., 2002), la colocalizzazione tra RanGTP e RanBP1 potrebbe essere importante per preservare il RanGTP ai poli fino alla prometafase, quando l'importina β raggiunge i poli.

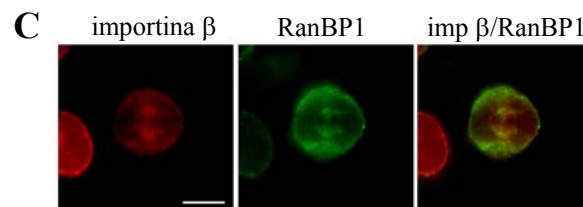


Fig 16 C. L'importina β (rosso) e RanBP1 (verde) co-localizzano ai poli del fuso mitotico. Il pannello a destra mostra la sovrapposizione dei segnali. Barra, 10 μ m.

Lo schema in Fig 17 riassume la localizzazione delle componenti del network di Ran ai poli del fuso mitotico. Riepilogando gli studi precedenti di Keryer et al. (2003) e di Di Fiore et al., (2003) ed i risultati ottenuti in questo lavoro, emerge che Ran e RanBP1 localizzano ai centrosomi sia in interfase che in mitosi, e questa associazione è indipendente dai MT; Ran è reclutato ai centrosomi attraverso AKAP450 ed è, almeno in parte, legato a GTP ai poli del fuso. Le importine α e β , invece, raggiungono i poli del fuso solo dopo la rottura dell'involucro nucleare e la loro localizzazione è dipendente dai MT.

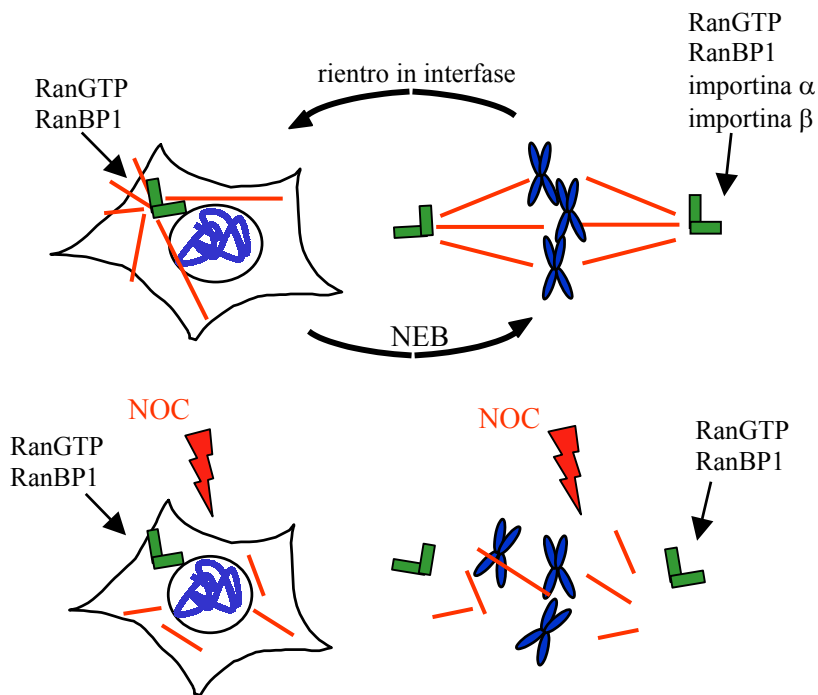


Fig. 17. Riepilogo schematico della localizzazione centrosomale delle componenti del sistema di Ran, nelle diverse fasi del ciclo cellulare (alto) e in dipendenza dalla presenza dei MT (basso). RanGTP e RanBP1 localizzano ai centrosomi (in verde) in tutte le fasi del ciclo, in maniera indipendente dalla presenza dei MT (in rosso); importina α e β localizzano ai poli del fuso solo dopo la rottura dell'involucro nucleare (NEB). Importina β localizza ai poli del fuso in maniera dipendente dai MT.

5. L'associazione delle importine α e β ai MT è mediata da proteine-motore

5.1. Gli esperimenti esposti fino a questo punto suggeriscono che l'accumulo di importina β ai poli del fuso dipenda dall'interazione di questa proteina con i MT mitotici. Per verificare questa possibilità, abbiamo svolto saggi di co-sedimentazione con MT polimerizzati *in vitro*. In questi saggi, sono stati preparati estratti proteici da cellule HeLa in mitosi; all'estratto è stato aggiunto TAX per favorire la polimerizzazione dei MT endogeni; inoltre, sono stati aggiunti alternativamente AMP-PnP,

un analogo non idrolizzabile dell'ATP che favorisce l'associazione stabile delle proteine-motore ai MT, oppure ATP, che destabilizza invece quest'associazione. Gli estratti contenenti MT polimerizzati nelle due condizioni sono stati sedimentati attraverso un cuscino di saccarosio; alla fine della centrifugazione, il pellet contiene proteine associate ai MT in maniera diretta (in presenza di ATP) o in maniera mediata da motori (in presenza di AMP-PnP) mentre il supernatante contiene tutte le proteine non associate. La schematizzazione di questa procedura sperimentale è illustrata nella Fig. 18B. In questi esperimenti, osserviamo che una frazione di importina β cosedimenta con i MT in presenza di AMP-PnP (Fig. 18A). È interessante osservare che l'arricchimento di importina β nel pellet trattato con AMP-PnP è paragonabile a quello della chinasi mitotica p34/cdc2, analizzata per confronto. Nelle stesse condizioni, RCC1, che come abbiamo già ricordato è una proteina nucleare, si trova invece essenzialmente nel supernatante (dati non mostrati). L'aggiunta di tubulina esogena all'estratto non provoca alcun aumento nella quantità di importina β che sedimenta nel pellet: questo suggerisce che i siti di legame forniti dai MT endogeni non siano limitanti, e che, piuttosto, siano necessari altri fattori stabilizzati dall'aggiunta di AMP-PnP per mediare l'associazione dell'importina β con i MT mitotici. Le importine $\alpha 1$ (non mostrato) e $\alpha 2$ (Fig. 18A) mostrano lo stesso pattern di co-sedimentazione visto per la β : sedimentano nel pellet in cui è stata favorita l'associazione delle proteine-motore ai MT ed, in misura minore, nel pellet in cui è stata aggiunta la tubulina esogena. Questi esperimenti quindi suggeriscono che importina α e β interagiscono con i MT mitotici attraverso una qualche proteina-motore.

5.2. Abbiamo voluto a questo punto saggiare il possibile coinvolgimento della principale proteina-motore diretta verso le estremità meno dei MT (in grado quindi di muoversi in direzione dei poli) e notoriamente coinvolta nell'organizzazione dei poli del fuso, la dineina (Merdes et al., 2000). Un approccio per verificare il coinvolgimento di questa proteina è quello di usare un anticorpo monoclonale (m70.1) diretto contro la sua catena intermedia (dynein intermediate chain, DIC): in esperimenti classici, è stato dimostrato che l'incubazione di un estratto mitotico con questo anticorpo causa la dissociazione del complesso dineina/dinactina e sostanzialmente inibisce l'associazione della dineina ai MT (Gaglio et al., 1997; Wittmann et al., 1998).

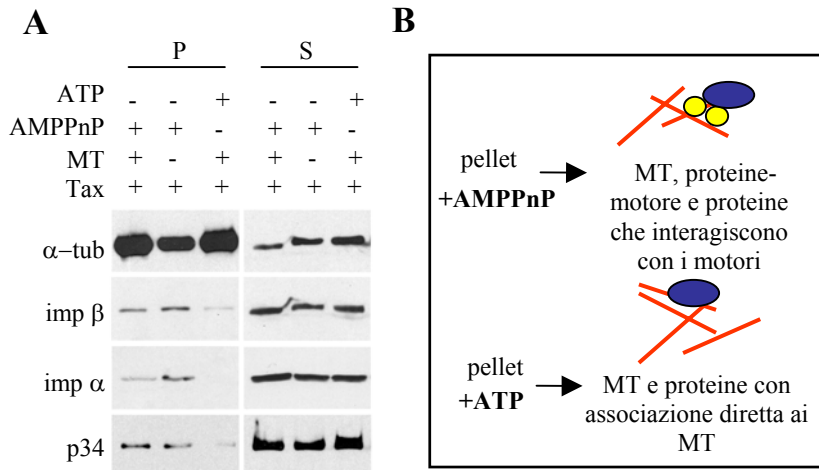


Fig. 18. Importina α e β co-sedimentano con MT mitotici polimerizzati *in vitro*. **A.** Frazioni di importina β e α co-sedimentano con il pellet (P) dei MT polimerizzati in presenza di TAX dopo centrifugazione su saccarosio di estratti di cellule mitotiche HeLa. La co-sedimentazione è arricchita in presenza di AMPPnP, ma non in seguito ad aggiunta di MT esogeni. S, supernatante. **B.** Rappresentazione schematica delle proteine che associano con i MT in presenza di AMPPnP o di ATP (MT in rosso, proteine-motore in giallo, proteine associate direttamente o indirettamente con i MT in blu).

Nelle nostre condizioni, l'incubazione con anticorpo anti-DIC stacca dai MT tutta la dineina, che si trova nel supernatante, come atteso (Fig. 18C, pannello S), mentre in presenza di anticorpo anti-IgM non specifico la dineina co-sedimenta completamente nel pellet di MT (Fig. 18C, pannello P). L'inibizione del legame della dineina indotta dall'anticorpo anti-DIC riduce la co-sedimentazione, nel pellet di MT, delle proteine che sono trasportate ai poli dal complesso dineina/dinactina, quali la dinactina stessa e NuMA (Fig. 18D; cfr. anche Merdes et al., 2000). L'incubazione con l'anticorpo anti-DIC riduce anche l'entità della co-sedimentazione dell'importina α e β , rispetto alla condizione di incubazione con anticorpo non specifico o col solo tampone (Fig. 18D). Questi risultati indicano che la dineina è coinvolta nel trasporto di importina α e β lungo i MT.

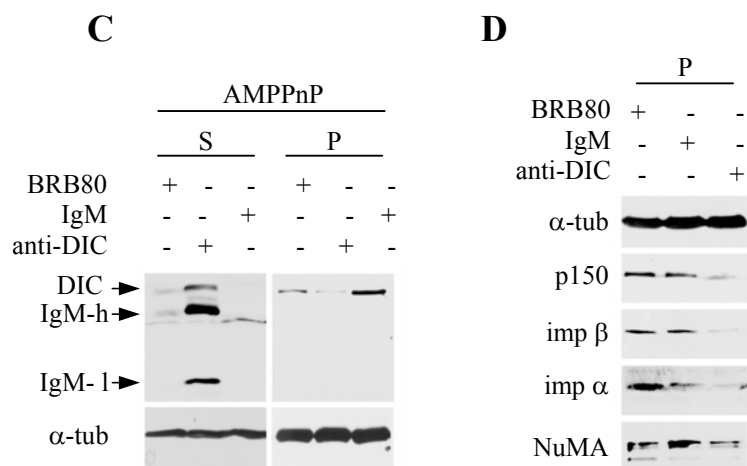


Fig.18 C. L'incubazione dell'estratto mitotico con anticorpo diretto contro la catena intermedia della dineina (anti-DIC) impedisce l'associazione della dineina con la frazione P. Le frecce indicano la posizione della catena intermedia della dineina (DIC), e le catene pesanti (IgM-h) e leggere (IgM-l) dell'anticorpo nel supernatante (S). **D.** Analisi mediante Western blot delle proteine indicate, nel pellet (P) contenente i MT in seguito a pre-incubazione dell'estratto con anticorpo anti-dineina (anti-DIC) o anticorpo non specifico (IgM) o tampone (BRB80).

6. La sovraespressione di importina β induce anomalie mitotiche

6.1. I soli esperimenti in cui sia stata saggiata una funzione mitotica dell'importina β, ad oggi, sono basati sulla microiniezione, in cellule mitotiche di ratto-canguro Ptk1, di un mutante di importina β, privo del dominio di interazione con Ran: questo mutante induce anomalie nell'organizzazione del fuso e nell'allineamento dei cromosomi (Nachury et al., 2001). Questo dato suggerisce che l'importina β svolga un ruolo mitotico in cellule di mammifero in maniera dipendente dalla segnalazione mediata da RanGTP. Noi abbiamo osservato che, dopo la rottura dell'involucro nucleare, importina β localizza ai poli del fuso, i quali rappresenterebbero dunque una sorta di 'piattaforma regolativa' dove è presente RanGTP. Se questa interpretazione è corretta, ed i poli rappresentano veramente il sito mitotico nel quale è spazialmente concentrata la segnalazione Ran/importina β, allora, un eccesso di importina β ai poli, anche in forma wild-type (e quindi sensibile a RanGTP), dovrebbe eccedere la capacità di segnalazione del sistema e quindi perturbare l'organizzazione del fuso mitotico. Per

verificare questa ipotesi, è stato necessario generare un costrutto per importina β la cui localizzazione ai poli fosse facilmente verificabile. A questo scopo, abbiamo clonato la sequenza codificante dell'importina β umana in frame con un tag GFP in un vettore di espressione per cellule di mammifero (pIB-GFP) (Fig. 19A).

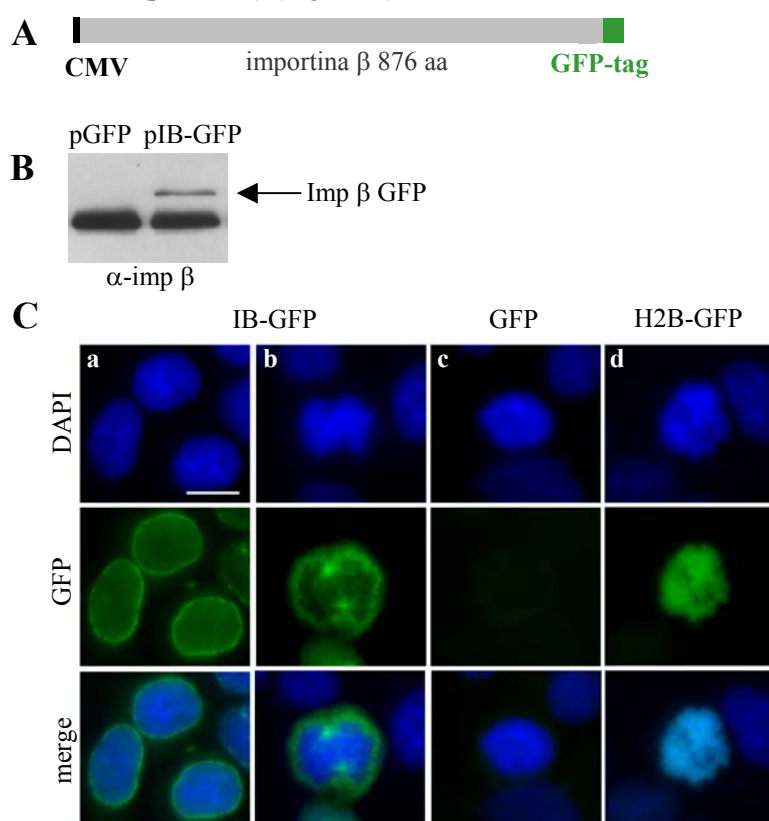


Fig. 19. Importina β -GFP localizza ai poli del fuso in cellule HeLa. **A.** Schematizzazione del costrutto chimero che esprime importina β -GFP. **B.** Western blot dell'importina β endogena e della proteina chimera importina β -GFP (efficienza di trasfezione intorno al 30%). **C.** Localizzazione della proteina esogena importina β -GFP (IB-GFP, verde, riga centrale) in cellule HeLa trasfettate e pre-permeabilizzate con Triton X-100 prima del fissaggio in PFA. La proteina chimera si associa all'involucro nucleare in interfase (a) e ai poli del fuso in mitosi (b). Il DNA (DAPI) è mostrato nei pannelli in alto e la sovrapposizione dei segnali nei pannelli inferiori. Per confronto sono mostrate la localizzazione della sola GFP (c) e della proteina di fusione H2B-GFP (istone H2B, d) in cellule mitotiche.

6.2. Abbiamo svolto una serie di esperimenti per verificare il costrutto pIB-GFP. Per prima cosa, abbiamo controllato per Western blot che questo costrutto si esprimesse in cellule HeLa (Fig. 19B). Abbiamo poi verificato che la proteina chimerica importina β -GFP fosse correttamente localizzata. Gli esperimenti in Fig. 19C mostrano che, nelle condizioni di pre-solubilizzazione in Triton X-100 prima del fissaggio in PFA, la proteina chimerica localizza effettivamente intorno all'involucro nucleare in interfase e ai poli del fuso in mitosi (Fig. 19C, a, b), in maniera simile all'importina β endogena. Per escludere che questa localizzazione sia dovuta in qualche modo alla presenza del tag GFP nella chimera, abbiamo controllato la localizzazione di altre due diverse chimere GFP: nelle stesse condizioni di pre-estrazione e fissaggio, la proteina GFP da sola viene completamente solubilizzata (Fig. 19C, c), mentre la chimera H2B-GFP, costituita dall'istone H2B in frame con il tag GFP, che è incorporata nella cromatina, resiste alla solubilizzazione (Fig. 19C, d). Gli esperimenti quindi indicano che la localizzazione della chimera importina β -GFP riproduce quella della proteina endogena senza nessun artefatto dovuto al tag GFP.

6.3. In un primo set di esperimenti, per verificare gli effetti dell'importina β esogena in cellule HeLa, le colture sono state trasfettate con una quantità di plasmide maggiore di $2\mu\text{g}$ di DNA per 1×10^6 cellule.

La prima caratteristica notevole nella popolazione trasfettata con pIB-GFP, rispetto a quella di controllo, è una forte riduzione dell'indice mitotico, accompagnata da un aumento della percentuale di cellule interfasiche positive per l'espressione di ciclina B1, e quindi nella fase G2 del ciclo cellulare (Fig. 20A). Questo suggerisce che, nelle cellule sovraesprimenti pIB-GFP, l'entrata in mitosi è in qualche modo inibita. Inoltre, quantificando l'intensità dell'emissione della GFP, che è un indice del livello di espressione della chimera nelle singole cellule, si osserva che le cellule trasfettate che raggiungono la mitosi hanno livelli di espressione più bassi rispetto alle cellule interfasiche (Fig. 20B). Quest'ultimo dato conferma quindi l'idea che l'entrata in mitosi è inibita da livelli troppo elevati di importina β nella cellula. Per verificare quindi l'ipotesi originaria, di un legame tra espressione deregolata di importina β ai poli del fuso e comparsa di anomalie mitotiche, siamo andati a saggiare l'effetto di dosi decrescenti di plasmide. Dosi di plasmide pari o minori di $2\mu\text{g}$ di DNA per 1×10^6 cellule non inibiscono l'entrata in mitosi. In questi

esperimenti, l'analisi densitometrica dei livelli di espressione in Western blot, normalizzati per l'efficienza di trasfezione, indica che le cellule trasfettate esprimono la proteina endogena e quella esogena in un rapporto di 1:1. Questo rapporto potrebbe individuare una sorta di dose-soglia al di là della quale è inibita l'entrata in mitosi.

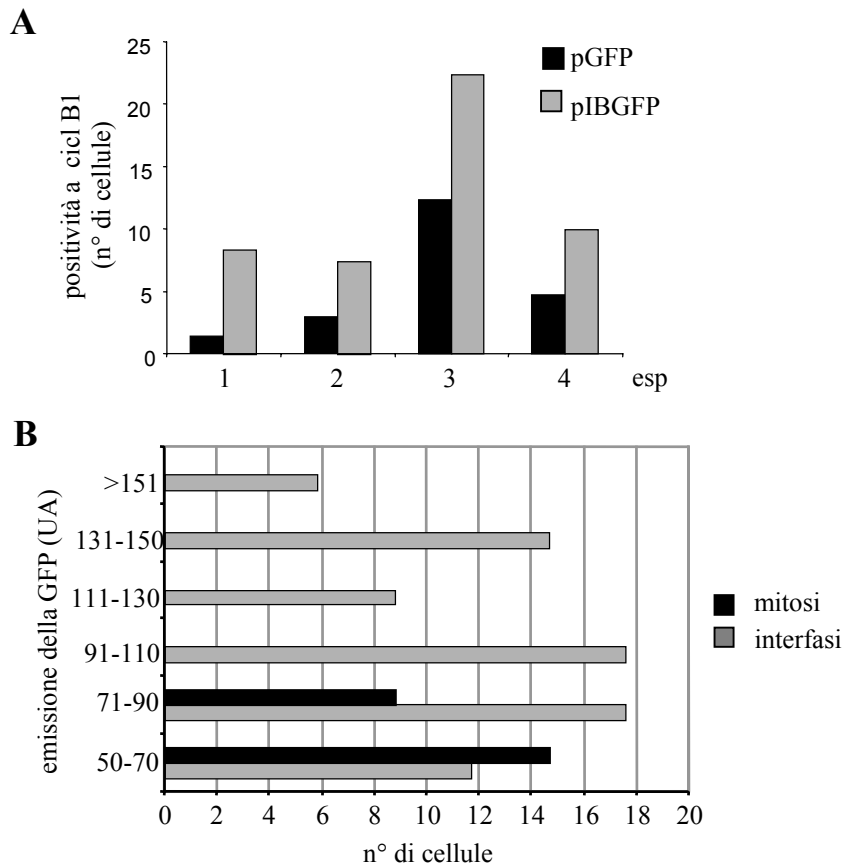


Fig. 20. **A.** Frequenza di cellule positive per l'espressione di ciclina B1 in cellule HeLa trasfettate con importina β -GFP (pIB-GFP) o con il plasmide di controllo pGFP. Le frequenze si riferiscono a 4 esperimenti indipendenti. **B.** Emissione di fluorescenza della GFP in cellule interfasiche e mitotiche trasfettate con importina β -GFP o con il plasmide di controllo pGFP. Le cellule sono raggruppate in classi a seconda dell'emissione di fluorescenza quantificata con il software Photoshop e misurata in unità arbitrarie (UA) (in ordinata). La numerosità di ogni classe è mostrata in ascissa.

6.4. Le condizioni di trasfezione descritte sopra, che abbiamo individuato come permissive per l'entrata in mitosi, sono state utilizzate nei successivi esperimenti di trasfezione in tre linee cellulari diverse: le cellule HeLa, la linea di fibroblasti primari MRC5, e la linea di fibroblasti murini NIH-3T3. In tutte e tre le linee cellulari, l'indice mitotico aumenta nella popolazione che overesprime importina β rispetto alla popolazione di controllo (Fig. 21A); tuttavia, non si osserva ritardo in nessuno specifico stadio della mitosi, indicando che la sovraespressione di importina β genera piuttosto un generale rallentamento della progressione mitotica. In tutte e tre le linee, la sovraespressione di importina β induce un aumento significativo di anomalie in tutte le fasi della mitosi (Fig. 21B). L'IF per l' α -tubulina mostra che, in queste cellule, la maggior parte dei fusi mitotici hanno poli soprannumerari indicati da frecce in Fig. 22; inoltre, i cromosomi sono maleallineati in metafase e si osserva spesso perdita cromosomica in anafase. Questi risultati, quindi, dimostrano che l'espressione di importina β , a livelli che grossolanamente raddoppiano il normale contenuto intracellulare, causa difetti dei poli del fuso e, a livelli superiori, impedisce alla cellula di superare la transizione G2/mitosi.

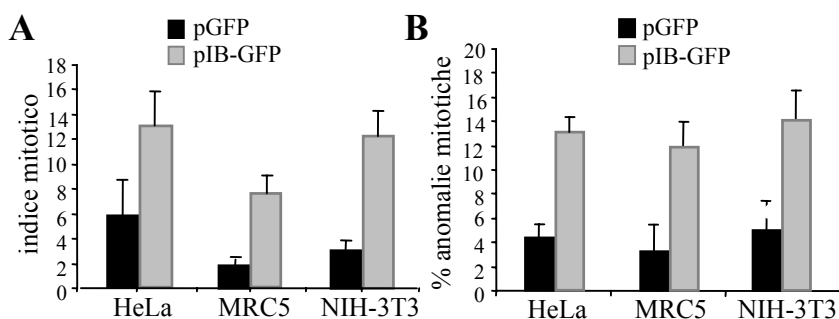


Fig. 21. Indice mitotico (A) e frequenze di anomalie mitotiche (B) in linee cellulari umane e murine sovraesprimenti importina β (pIB-GFP). L'indice mitotico è stato calcolato su 1000 (HeLa), 800 (MRC5) e 1200 (NIH-3T3) cellule trasfettate (3 esperimenti per linea cellulare) e i valori sono stati analizzati utilizzando il test del χ^2 ($p < 0,001$ in tutte le linee cellulari). Le anomalie sono state rilevate su un totale di 500 (HeLa), 250 (MRC5) e 400 (NIH-3T3) mitosi (2 esperimenti indipendenti) e la loro frequenza in popolazioni trasfettate esprimenti importina β o la sola GFP sono state analizzate statisticamente utilizzando il test del χ^2 ($p < 0,001$ in HeLa, $p < 0,02$ in MRC5 e $p < 0,001$ in NIH-3T3).

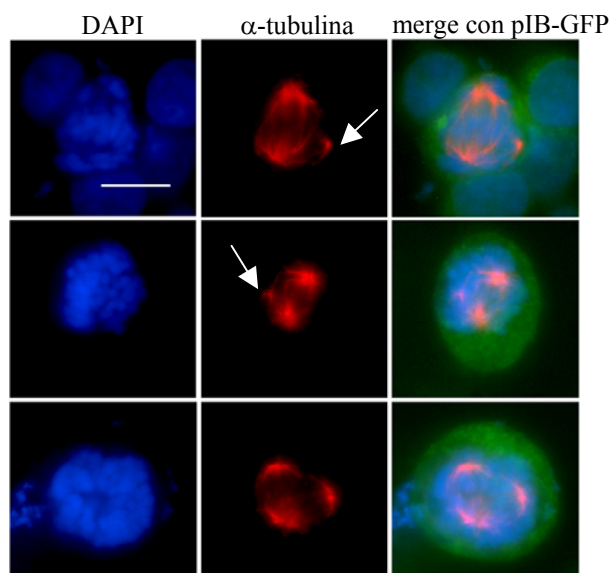


Fig. 22. La sovraespressione di importina β induce anomalie del fuso mitotico. Tipici esempi di fusi anomali (α -tubulina, rosso) in cellule mitotiche esprimenti importina β -GFP (pIB-GFP): da notare i difetti di allineamento dei cromosomi (DAPI, colonna sinistra) e i poli sovranumerari oltre ai due poli principali (α -tubulina, colonna centrale). Le frecce bianche indicano la formazione di piccoli “extrapoli”. Nella colonna di destra sono mostrati entrambi i segnali, sovrapposti al segnale verde dell’importina β -GFP. Barra, 10 μ m.

6.5. Poiché stiamo ipotizzando che i difetti dei fusi multipolari siano legati ad uno squilibrio nella segnalazione locale mediata da importina β /RanGTP sugli stessi aster, o poli, in mitosi, abbiamo voluto per prima cosa escludere che fosse coinvolta una duplicazione anomala (overduplicazione) dei centrosomi durante l’interfase. A questo scopo, usando un anticorpo diretto contro la centrina 2, abbiamo analizzato per IF il numero di centrioli in cellule interfasiche sovraesprimenti importina β . In queste cellule, nella quasi totalità dei casi, i centrioli sono 2 o 4, corrispondenti quindi al numero normale di centrioli in cellule rispettivamente G1 e G2. Abbiamo allora voluto caratterizzare accuratamente i difetti indotti dalla sovraespressione di importina β a livello del fuso. Abbiamo utilizzato a questo scopo diverse combinazioni di marcatori dei centrosomi e dei poli del fuso.

Nelle mitosi multipolari, tutti i poli presentano segnali per la centrina e per la γ -tubulina (Fig. 23 a): questo indica quindi che componenti centrosomali sono associate a tutti i poli e che quelli soprannumerari non sono dovuti ad una focalizzazione aberrante di fasci di MT. Inoltre, tutti i poli sono anche positivi per l'espressione di SAF, come TPX2 e NuMA (Fig. 23, b-c), la cui attivazione nei sistemi *in vitro* è dipendente da RanGTP. Anche la chinasi Aurora-A, che ha un ruolo fondamentale nell'organizzazione del fuso mitotico ed è un target di TPX2 in questo processo, viene reclutata a tutti i poli (Fig. 23, d). Una possibile eccezione potrebbe essere costituita dalla forma fosforilata e attiva di questa chinasi, il cui segnale è meno visibile ai poli delle mitosi sovraesprimenti importina β rispetto alle cellule di controllo (dati non mostrati, ma cfr. Tabella 3).

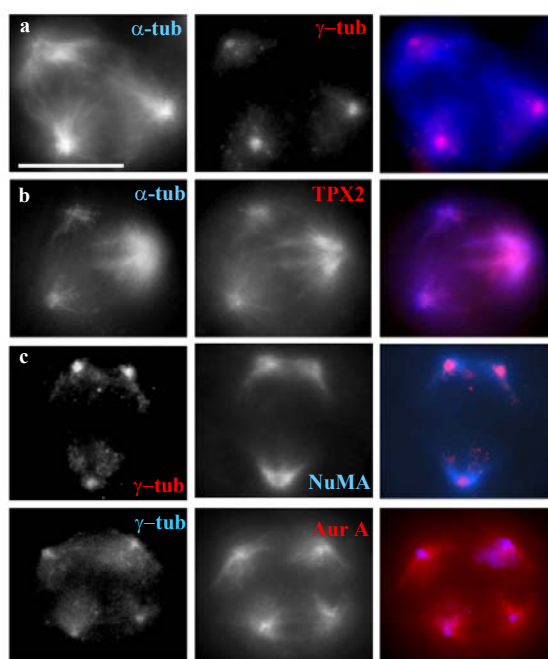


Fig. 23. Localizzazione di regolatori mitotici ai poli di fusi anomali indotti dalla sovraespressione di importina β . I marcatori analizzati e l'emissione del fluorocromo utilizzato per rilevarli (AMCA, nel blu; Cy3 o Texas red, nel rosso) sono indicati all'interno di ciascuna immagine. Le immagini sovrapposte sono mostrate nella colonna destra. Barra, 10 μ m.

I risultati ottenuti dall'analisi per IF di tutte le combinazioni di marcatori utilizzate sono riassunti nella Tabella 3. Nel loro insieme, essi indicano che, nelle mitosi sovraesprimenti importina β , tutti i poli, normali o anomali, reclutano componenti centrosomali sia strutturali che regolative: tutti i poli sono quindi potenzialmente funzionali per trarre a sè i cromatidi in segregazione. Poichè l'evento più frequente (48% di tutte le anomalie) è la formazione di "extra-poli", cioè di piccoli poli sovranumerari rispetto ai due poli principali che definiscono l'asse del fuso, è ragionevole ipotizzare che i fusi multipolari derivino da uno o più eventi di frammentazione di un polo, anche se fusi multipolari in cui tutti i poli sono di dimensioni simili rappresentano una frazione consistente delle anomalie (39%).

Tabella 3. Reclutamento ai poli di marcatori centrosomali o regolatori del fuso in cellule mitotiche sovraesprimenti importina β

Marcatori (IF)	Costrutto	n. esp	Mitosi analizzate (n)	Mitosi analizzate		Regolatori centrosomali o del fuso	
				Mitosi con struttura dei poli anomala	% anomalie nella struttura dei poli	Delocalizzati (n)	% delocalizzati
γ -tub/cen	pGFP	2	47	1	2,13	0	0
	pIB-GFP	2	51	4	7,94	0	0
α -tub/cen	pGFP	1	48	1	2,08	1	2,08
	pIB-GFP	1	53	3	5,66	1	1,88
α -tub/ γ -tub	pGFP	3	105	1	0,95	0	0
	pIB-GFP	3	136	8	5,88	2	1,47
γ -tub/AurA	pGFP	4	245	1	0,41	3	1,22
	pIB-GFP	4	250	12	4,8	1	0,4
α -tub/AurA-P	pGFP	4	362	12	3,31	8	2,21
	pIB-GFP	4	237	22	9,28	11	4,64
α -tub/TPX2	pGFP	2	140	4	2,86	0	0
	pIB-GFP	2	131	7	5,34	0	0
γ -tub/NuMA	pGFP	2	110	4	3,64	0	0
	pIB-GFP	3	162	11	6,79	0	0

7. Le anomalie mitotiche indotte dalla sovraespressione di importina β sono recuperate dalla co-espressione di TPX2 e di sequenze NLS generiche

A questo punto, abbiamo cercato di definire una strategia sperimentale per verificare se i difetti mitotici causati dalla sovraespressione di importina β riflettessero un'alterata attivazione dei SAF durante la mitosi. Se così fosse, allora la coespressione, insieme all'importina β , di SAF specifici o di sequenze NLS generiche, dovrebbe permettere una sorta di neutralizzazione dell'importina β in eccesso. In questa condizione, i SAF potrebbero di nuovo essere resi disponibili e i difetti mitotici, indotti dall'espressione della sola importina β , dovrebbero essere recuperati o parzialmente mitigati. Quest'ipotesi è schematizzata nella Fig. 24.

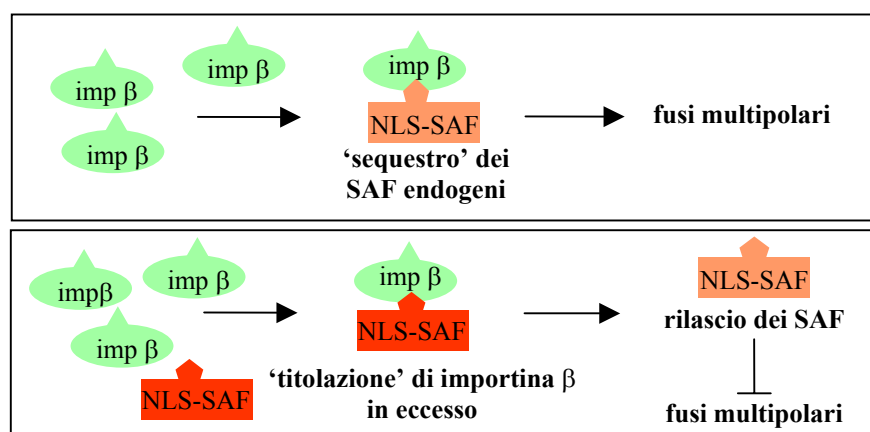


Fig. 24. Schematizzazione del meccanismo proposto per l'induzione di anomalie del fuso in seguito a sovraespressione di importina β . Secondo il modello, i fusi multipolari si formerebbero in seguito al 'sequestro' di SAF (arancione) da parte dell'importina β (verde) in eccesso (riquadro in alto). La co-espressione di sequenze NLS o di SAF (rosso), competendo per il legame con l'importina β in eccesso, dovrebbe ristabilire l'equilibrio nella formazione dei complessi e recuperare i difetti osservati (riquadro in basso).

7.1. Abbiamo deciso di saggiare quest'ipotesi mediante la co-espressione di TPX2, che è sicuramente il più caratterizzato tra i SAF e che, inoltre, è direttamente inibito dal legame ad importina α e β *in vitro* (Schatz et al., 2003; Tsai et al., 2003). In primo luogo, abbiamo verificato

che TPX2 espresso da un costrutto esogeno riproducesse, in mitosi, la localizzazione della proteina endogena ai poli del fuso e lungo i MT (Fig. 25). Abbiamo anche verificato che la sovraespressione del solo TPX2 in cellule HeLa inducesse anomalie dell'apparato mitotico (alcuni esempi rappresentativi sono mostrati in Fig. 26), come descritto in letteratura (Gruss et al., 2002; Garrett et al., 2002). Negli esperimenti di co-espressione, osserviamo che individualmente, la sovraespressione di importina β o di TPX2 induce anomalie mitotiche ai livelli attesi, mentre la coespressione di importina β e TPX2 recupera gran parte di questi difetti (Fig. 27A). Sia l'induzione di anomalie da parte di TPX2 e importina β , sia il recupero nella coespressione, sono statisticamente significativi.

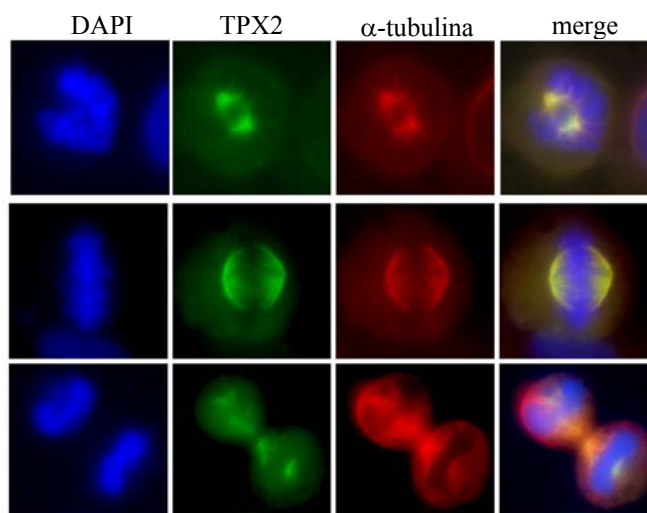


Fig. 25. Localizzazione mitotica della chimera TPX2-GFP (verde) in cellule HeLa. La fase della mitosi in cui si trovano le cellule fissate è stata individuata grazie alla colorazione del DNA col DAPI (in blu) e alla colorazione per l' α -tubulina (in rosso). Il merge dei tre segnali è indicato nella colonna a destra.

7.2. Abbiamo quindi deciso di usare, in esperimenti di coespressione, un costrutto esprimente la sequenza NLS dell'antigene Large T di SV40. Questa sequenza è considerata il prototipo del segnale di localizzazione nucleare (Smith et al., 1985, review) e conferisce la capacità di localizzare al nucleo a qualsiasi proteina a cui venga fuso

(Kalderon et al., 1984): lo abbiamo quindi scelto come segnale riconosciuto dall'apparato di import, cioè dal complesso delle importine α/β . Negli esperimenti di coespressione, abbiamo utilizzato questo costrutto in quantità equimolari, 2 volte superiori o 3 volte superiori rispetto a quelle del costrutto esprimente importina β . I risultati indicano che la coespressione del costrutto NLS recupera le anomalie mitotiche indotte dall'importina β in maniera dipendente dalla dose utilizzata (Fig. 27B). Questo effetto è specifico perché, nelle stesse condizioni, il gene per la luciferasi è ininfluente (dati non mostrati).

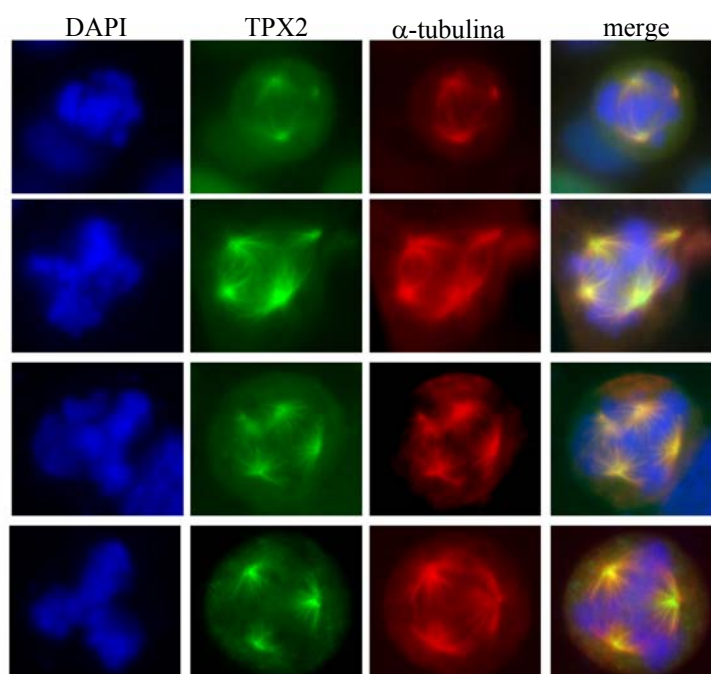


Fig. 26. Esempi di anomalie mitotiche indotte in cellule HeLa dalla sovraespressione di TPX2. Nella colonna di sinistra, la colorazione per i cromosomi (in blu, DAPI) mostra difetti nell'allineamento, la colorazione per α -tubulina (in rosso) mostra le anomalie a livello dell'organizzazione del fuso. La chimera TPX2-GFP (seconda colonna) legandosi ai MT dà un segnale sovrapponibile a quello dell' α -tubulina. Il merge dei tre segnali è mostrato nella colonna a destra.

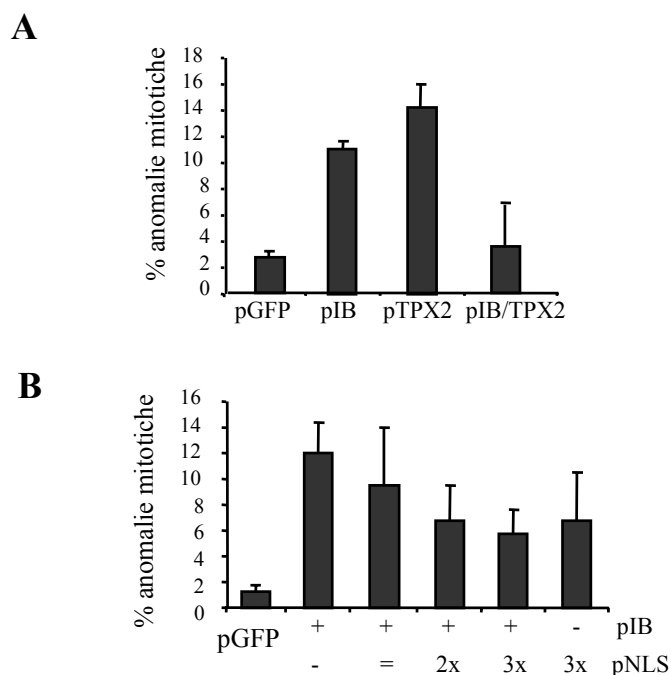


Fig. 27. La co-espressione di TPX2, o di costrutti codificanti sequenze NLS, mitiga le anomalie mitotiche indotte dalla sovraespressione di importina β . **A.** Frequenza di anomalie mitotiche in cellule HeLa trasfettate con costrutti esprimenti importina β (pIB) o TPX2, da soli o in cotransfezione (sono state analizzate da 150 a 250 mitosi per ogni campione in 2 esperimenti indipendenti). Usando il campione trasfettato con pGFP come riferimento, $p < 0.01$ per pTPX2 e pIB da soli, e non significativo per pTPX2 più pIB. Usando il campione trasfettato con pIB come riferimento, p è non significativo per pTPX2 da solo, e < 0.02 per pTPX2 più pIB. **B.** Frequenze di anomalie mitotiche in cellule HeLa trasfettate con importina β (+) o costrutti NLS; i simboli indicano i rapporti molari tra i costrutti di sequenze NLS e di importina β usati in trasfezione (sono state analizzate tra le 170 e le 260 mitosi per ogni campione in 2 esperimenti indipendenti). Usando pGFP come riferimento, $p < 0.001$ per pIB; < 0.01 per la coespressione di pIB equimolare a pNLS; < 0.05 o al limite della significatività per quantità maggiori di pNLS.

8. L'inattivazione di TPX2 impedisce l'accumulo di importina β ai poli del fuso

TPX2 localizza ai poli del fuso mediante un meccanismo di trasporto lungo i MT mediato da dineina (Wittmann et al., 1998 e 2000; Brunet et al., 2004). Quest'osservazione, insieme alle evidenze da noi ottenute sul coinvolgimento della dineina nell'interazione delle importine

α e β con i MT, suggerisce la possibilità che TPX2 sia trasportato ai poli, via dineina, in complesso con le importine α e β , e cioè con i suoi inibitori. Se questo è il caso, allora l'eliminazione di TPX2 potrebbe impedire la formazione del complesso e dunque la localizzazione di importina β ai poli. Quest'ipotesi è schematizzata in Fig. 28.

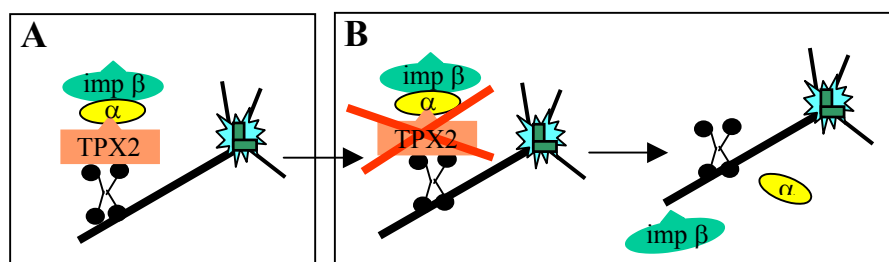


Fig. 28. Rappresentazione schematica del modello proposto per la localizzazione di importina β ai poli del fuso. Se importina β e TPX2 si muovessero lungo i MT verso i poli in un unico complesso trasportato da dineina/dinactina (in nero), e il legame di β a dineina/dinactina fosse mediato da TPX2 (rappresentato nel pannello A), l'inattivazione di TPX2 dovrebbe impedire la formazione del complesso ed impedire la localizzazione di importina β ai poli (pannello B).

8.1. Per verificare la validità di questo modello, abbiamo analizzato la localizzazione di importina β in seguito all'inattivazione di TPX2 mediante la strategia dell'RNA interference (RNAi). Abbiamo trasfettato, in cellule HeLa, un oligo a RNA a doppio filamento (small interfering RNA, siRNA) corrispondente alle basi 144-162 della sequenza codificante del gene umano per TPX2 (Fig. 29A). Dopo 40 h dalla trasfezione, i livelli di TPX2 sono appena rilevabili in Western blot, indicando che l'espressione di TPX2 è inibita in maniera efficiente dallo specifico siRNA, mentre i livelli di importina β sono inalterati (Fig. 29B).

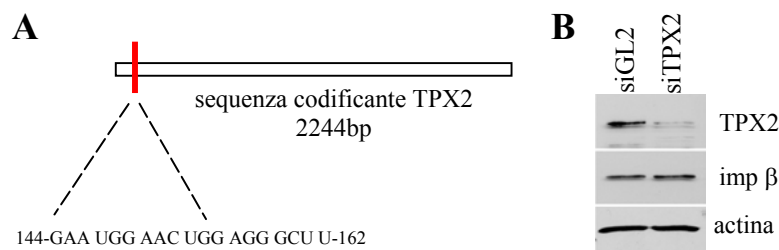


Fig. 29. **A.** Posizione dell'oligo RNA a doppio filamento specifico per la regione 144-162 nella sequenza codificante del gene umano per TPX2. **B.** Western blot di cellule trasfettate con l'oligo a RNA specifico per TPX2 (siTPX2) o per controllo, con l'oligo a RNA specifico diretto contro il gene per la luciferasi (siGL2). I livelli di espressione di TPX2 sono appena rilevabili dopo 40h di 'interference', mentre i livelli di importina β rimangono invariati. E' mostrato il livello di actina per indicare che le quantità di estratto proteico analizzate nei due campioni sono paragonabili.

8.2. L'analisi per IF mostra che l'importina β è completamente delocalizzata dall'apparato mitotico in cellule in cui TPX2 è stato inattivato (Fig. 30A, b-c, e istogramma in Fig. 30B). Questo effetto è specifico: infatti, la localizzazione di NuMA ai poli, che dipende in gran parte da dineina, ma è totalmente indipendente da TPX2, continua ad avvenire normalmente, anche in cellule prive di TPX2 (Fig. 30C e istogramma in Fig. 30D). Questo indica che l'inattivazione di TPX2 non altera in maniera generalizzata il trasporto dipendente da dineina.

8. 3. L'osservazione che importina β non si accumula ai poli del fuso in cellule prive di TPX2 ha profonde implicazioni per la comprensione dei complessi macromolecolari che regolano l'apparato mitotico, ed abbiamo quindi voluto sottoporla a stringenti verifiche sperimentali. Una prima verifica si è resa necessaria per il fatto che cellule in cui TPX2 è inattivo progrediscono con difficoltà attraverso la mitosi e la maggior parte restano bloccate in prometafase, mentre la popolazione cellulare di controllo (trattata con un oligo diretto contro il gene per la luciferasi, assente nei mammiferi) contiene ovviamente stadi anche più avanzati della mitosi. Abbiamo quindi voluto ripetere lo studio della localizzazione di importina β restringendo l'analisi alle sole cellule in prometafase (identificate mediante colorazione del DNA con DAPI), sia nella popolazione di controllo che in quella trattata con l'oligo specifico per TPX2. In questo esperimento, i poli del fuso sono stati identificati con la γ -tubulina. Abbiamo analizzato la localizzazione di importina β in tutte le prometafasi, tenendo conto del fatto che, nelle nostre condizioni sperimentali di RNA interference, TPX2 è inattivato nel 70% delle cellule circa. I risultati indicano che, nelle colture in cui l'espressione di TPX2 è stata interferita, importina β è delocalizzata rispetto al segnale per la γ -tubulina nella maggior parte delle prometafasi, mentre invece localizza correttamente in cellule che, nella coltura trattata con l'oligo di controllo, si trovano nella stessa fase (Fig. 31A).

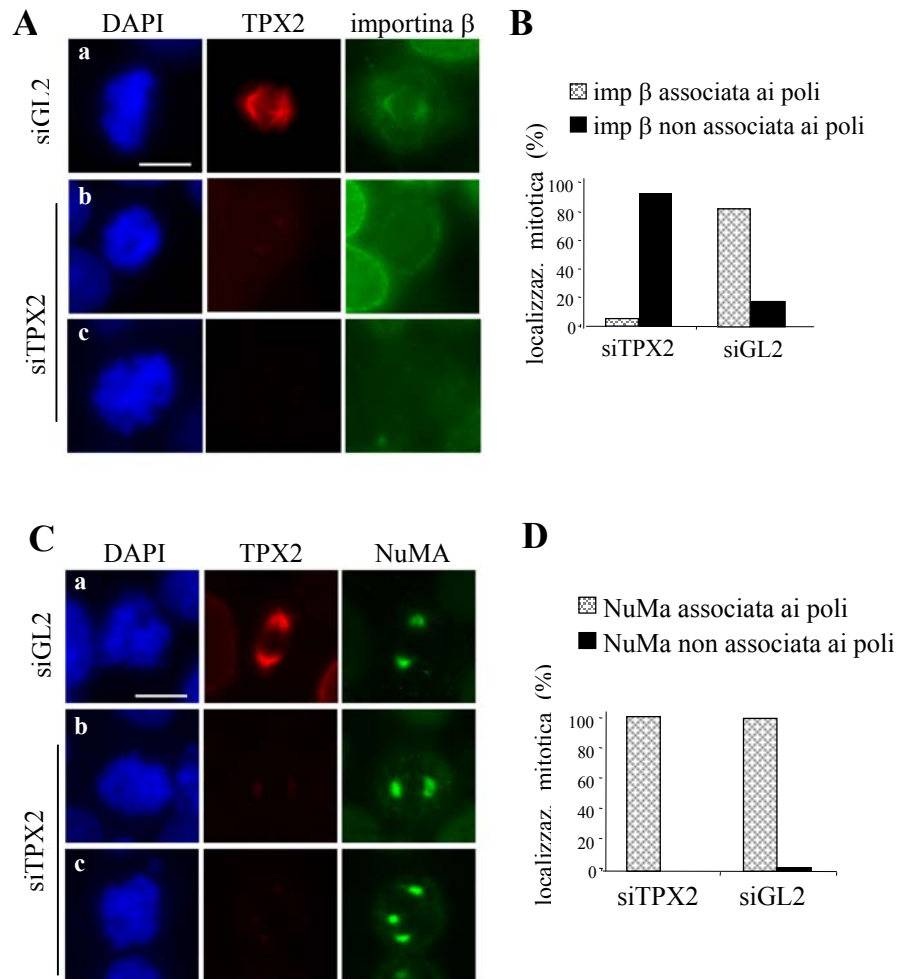


Fig. 30 La localizzazione dell'importina β ai poli del fuso è dipendente da TPX2. **A.** Analisi per IF del segnale dell'importina β (in verde) in cellule mitotiche (il DNA è colorato con DAPI in blu) in colture di cellule trattate con l'oligo a RNA di controllo (siGL2) (a) o specifico per TPX2 (siTPX2) (b-c); il segnale per TPX2 è mostrato in rosso e tutte le immagini sono state riprese nelle stesse condizioni di esposizione. Barra, 10 μ m. **B.** Frequenza di cellule mitotiche che mostrano segnali di importina β ai poli (sono state analizzate 150 mitosi). **C.** Reclutamento di NuMA (in verde) ai poli del fuso in cellule trattate con l'oligo a RNA di controllo (siGL2) (a) o con l'oligo a RNA diretto contro TPX2 (siTPX2) (b-c). Barra, 10 μ m. **D.** Frequenza di cellule mitotiche in cui NuMA è localizzata ai poli.

Come già riportato in letteratura, l'inattivazione di TPX2 mediante RNAi induce anomalie nella bipolarità del fuso e nell'allineamento cromosomico, ed anche frammentazione dei poli (Garrett et al., 2002; Gruss et al., 2002). Per questa ragione, abbiamo voluto escludere che la mancata localizzazione di importina β ai poli fosse una conseguenza indiretta della struttura anomala dei poli stessi, causata dall'inattivazione di TPX2. Per questo abbiamo deciso di visualizzare la struttura dei poli con maggiore accuratezza nelle cellule prive di TPX2: l'uso di un'anticorpo diretto contro la centrina 2 (un costituente dei centrioli) ci ha permesso di distinguere le mitosi con una configurazione normale dei centrioli (2 coppie, 1 a ciascun polo) da quelle con centrioli divisi o frammentati. Abbiamo quindi analizzato la localizzazione di importina β in relazione alla struttura dei poli. Abbiamo così dimostrato che, in colture in cui TPX2 è inattivo, importina β non si accumula ai poli del fuso mitotico, indipendentemente dalla struttura dei poli (Fig. 31B).

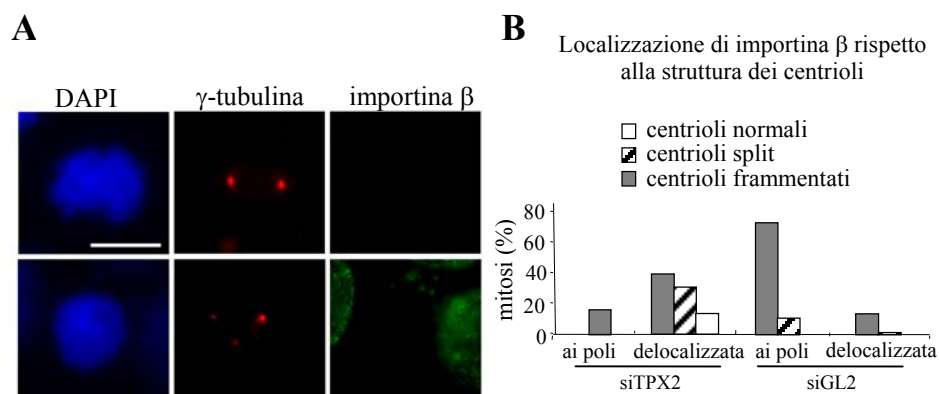


Fig. 31. A. Analisi per IF della localizzazione di importina β (in verde) rispetto ai poli del fuso, rivelati dalla γ -tubulina (in rosso) in colture di cellule trattate con l'oligo a RNA diretto contro TPX2 (siTPX2). Barra, 10 μ m. **B.** Frequenza di prometafasi (identificate dalla colorazione DAPI) in cui i segnali di importina β sono associati o non associati, ai poli con struttura normale o anomala, visualizzati dal segnale per la centrina 2 (sono state analizzate 100 mitosi in ogni gruppo).

DISCUSSIONE

In questa tesi, abbiamo dimostrato che, in cellule di mammifero, il sistema Ran/importine che controlla il traffico cellulare tra nucleo e citoplasma in interfase, ha una seconda funzione durante la mitosi: regola l'organizzazione e la funzionalità dell'apparato mitotico, assicurandosi che i regolatori mitotici siano trasportati nel loro sito di azione e qui correttamente attivati.

1.a Il sistema Ran/importine: funzioni diverse con un unico meccanismo ...

Come già ricordato in Introduzione, nel sistema modello di *Xenopus*, RanGTP e importina β agiscono nell'organizzazione del fuso con lo stesso meccanismo con cui regolano il trasporto: RanGTP dissocia i complessi tra importine e fattori-NLS capaci di promuovere la formazione del fuso.

Ogni regolazione mediata da Ran sembra quindi basarsi sulla capacità di RanGTP di legare importina β , determinando il rilascio di qualunque molecola possa essere associata ad importina β stessa. La realizzazione di questo meccanismo è subordinata al verificarsi di certe condizioni. Durante l'interfase, l'attività di trasporto è assicurata dalla compartimentalizzazione dei regolatori di Ran: il fattore di scambio RCC1 localizza nel nucleo, mentre i fattori di idrolisi RanGAP1 e RanBP1 sono nel citoplasma. Questo genera, attraverso la membrana nucleare, un gradiente tra le forme di Ran legate al nucleotide: RanGDP è prevalentemente citoplasmatico, mentre il RanGTP è concentrato al nucleo ed è qui che lega importina β e regola la sua dissociazione dalle proteine-cargo. In questo processo, dunque, la distribuzione fisica delle componenti (vedi Introduzione Fig. 3) e il meccanismo funzionale, sono perfettamente concordi. Le proteine che contengono un segnale NLS vengono rilasciate nel giusto compartimento, dove devono svolgere la loro azione biologica.

1.b....ma con diverse strategie

La rottura dell'involucro nucleare, all'inizio della mitosi, determina un effetto di diluizione dell'elevata concentrazione del RanGTP nucleare (Smith et al., 2002; Plafker e Macara, 2002). Poiché la localizzazione del sistema Ran/importine è, come abbiamo ricordato, essenziale per la sua funzione nel trasporto, è interessante studiare come queste componenti si

riorganizzano durante la mitosi e come questa redistribuzione si riflette sul loro meccanismo d'azione. Negli oociti di *Xenopus*, esperimenti di FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) basati sull'uso di biosensori che evidenziano il legame di RanGTP ai suoi partner, hanno fornito il primo supporto sperimentale all'esistenza di un gradiente di RanGTP nel citoplasma mitotico (Kalab et al., 2002). RCC1, che rimane legato alla cromatina anche in mitosi, crea un'elevata concentrazione di RanGTP localmente, proprio in corrispondenza dei cromosomi, mentre nel citoplasma mitotico, RanGAP1 e RanBP1 favoriscono la formazione di RanGDP (Kalab et al., 2002). Anche in questo caso, come nel trasporto nucleo-citoplasma in interfase, la distribuzione delle componenti è conforme al meccanismo d'azione. Infatti, nell'oocita di *Xenopus*, un sistema meiotico privo di centrosomi, i MT sono nucleati a partire dalla cromatina (Karsenti et al., 1984; Heald et al., 1996) ed è qui che RanGTP favorisce il rilascio dei SAF da parte di importina β .

Nelle cellule somatiche, tuttavia, altri meccanismi devono presiedere all'organizzazione del fuso mitotico dipendente da Ran. Come già abbiamo ricordato in Introduzione, in queste cellule, i centrosomi hanno un ruolo preponderante nella nucleazione dei MT ed essi si trovano alla periferia della cellula, lontani quindi rispetto all'equatore dove si allineano i cromosomi e dove è alta la concentrazione del RanGTP. Non è chiaro se in mitosi, in cellule somatiche, le forme di Ran legate al nucleotide siano distribuite secondo un gradiente come in interfase e come in mitosi negli oociti di *Xenopus*. I dati ottenuti in proposito da esperimenti di FRET (Kalab et al., 2002) e da simulazioni computazionali (Li et al., 2003a), fornirebbero evidenze indirette a favore dell'esistenza di un gradiente, mentre altri lavori sostengono, sulla base di modelli matematici computazionali, che un gradiente di RanGTP non è realizzabile in cellule con un piccolo volume citosolico (Goerlich et al., 2003). Inoltre, a questo proposito bisogna tenere presente che, magraro il loro alto potere informativo gli approcci di FRET hanno il limite di basarsi sull'osservazione del comportamento di chimere espresse esogenamente. I risultati ottenuti quindi in questo tipo di esperimenti riflettono solo in parte la situazione *in vivo*.

La localizzazione delle componenti del sistema di Ran in cellule mitotiche si è rivelata in realtà molto articolata: recentemente sono state messe in luce frazioni di queste componenti che hanno localizzazioni molto specifiche in corrispondenza di strutture dell'apparato mitotico, come verrà discusso più approfonditamente in seguito. In particolare, sono

state evidenziate frazioni di Ran (Keryer et al. 2003) e di RanBP1 (Di Fiore et al. 2003) associate ai centrosomi.

Un aspetto centrale di questa tesi è stato lo studio spaziale e temporale dell'importina β durante la mitosi. Abbiamo osservato che, in profase, l'importina β si distacca dall'involucro nucleare. Dalla prometafase all'anafase, importina β si accumula ai poli del fuso. Questa localizzazione richiede l'integrità dei MT, dal momento che quando i MT vengono depolimerizzati, importina β risulta delocalizzata e quando i MT si riformano, rilocalizza rapidamente ai poli. Questa localizzazione specifica, la cui importanza funzionale per la divisione mitotica sarà discussa in seguito, si evidenzia chiaramente in condizioni di estrazione blanda, che rimuovono gran parte della frazione solubile delle proteine, permettendo di rivelare quelle frazioni che invece stabiliscono interazioni stabili con particolari strutture cellulari. In queste condizioni, abbiamo potuto evidenziare che, dalla prometafase all'anafase, importina β , importina α , Ran, almeno in parte legato a GTP, e RanBP1, colocalizzano ai poli del fuso. In ana-telofase, importina β si distacca infine dai poli e viene reclutata alla periferia della cromatina in via di segregazione.

Questa particolare localizzazione che varia nel corso della progressione mitotica e che è caratterizzata da un accumulo dell'importina β ai poli del fuso proprio negli stadi iniziali della mitosi, fornisce le basi per il meccanismo con cui il network di Ran regola l'organizzazione del fuso in cellule di mammifero.

2. I complessi SAF/importine si muovono lungo i MT e vengono dissociati ai poli

In questo studio abbiamo dimostrato che nell'associazione di importina α e β ai MT mitotici è coinvolta la dineina, una proteina-motore che ha un ruolo importante nell'organizzazione della polarità del fuso mitotico (Merdes et al., 2000). È noto che sia TPX2 (Wittmann et al., 2000) che NuMA (Merdes et al., 2000) sono trasportate ai poli, in parte per associazione diretta con i MT, in parte grazie al trasporto mediato da dineina (Wittmann et al., 2000; Brunet et al., 2004; Haren and Merdes, 2002). I nostri dati suggeriscono che importina β si muova lungo i MT, verso i poli, in complessi con almeno alcuni di questi SAF. Abbiamo verificato, infatti, che inattivando TPX2 mediante RNAi, importina β non localizza più ai poli del fuso. Quindi, TPX2 e importina β si muovono in complesso verso i poli. Come discuteremo più avanti, la formazione e la

dissociazione dei complessi importine/SAF sono finemente coordinate nello spazio (lungo il fuso), e nel tempo (negli stadi mitotici), e sono essenziali per l'organizzazione dell'apparato mitotico. *In vitro*, utilizzando proteine purificate, è stato osservato che TPX2 è funzionalmente inibito nei complessi con le importine α/β , ma mantiene inalterata la capacità di interagire con i MT (Trieselmann et al., 2003; Tsai et al., 2003). Infatti, il dominio di interazione con i MT e la sequenza NLS mappano in regioni non sovrapposte (Brunet et al., 2004). Altri SAF invece, quali XCTK2 e Kid, due proteine-motore della famiglia delle chinesine, che svolgono un ruolo importante nell'organizzazione in fasci dei microtubuli mitotici e nell'allineamento cromosomico, legano le importine e i MT in maniera mutualmente esclusiva (Trieselmann et al., 2003; Ems-Mc Clung et al., 2004). Nel caso di queste due chinesine, quindi, le importine esercitano la loro funzione inibitoria impedendo alle chinesine stesse di interagire fisicamente con i MT. La regolazione da parte di Ran, dissociando le importine dai complessi, permette alle chinesine di muoversi lungo i MT ed è determinante per la loro funzionalità. Nel caso di NuMA e TPX2, la possibilità di interagire con i MT e, simultaneamente, con le importine, suggerisce un modello in cui l'importina β stabilizza i complessi formati da importina α e TPX2 (o SAF con caratteristiche biochimiche simili) durante l'interazione, contemporanea, con motori e MT. In questo quadro, il legame alle importine permetterebbe di mantenere i SAF 'inattivi' durante il loro viaggio lungo il fuso verso i poli. Poichè la gran parte di RanGTP è concentrata intorno ai cromosomi, e non nel citoplasma mitotico lungo il fuso (Kalab et al., 2002), i complessi importine/SAF sono stabili lungo i MT. Soltanto quando questi complessi raggiungono i poli (trasportati da dineina), la frazione centrosomale di RanGTP può legare importina β , dissociando i complessi e determinando quindi l'attivazione locale dei SAF "polari" come TPX2.

E' interessante ricordare che RanBP1, in assenza del fattore di idrolisi RanGAP1, lega Ran stabilizzando la conformazione legata al GTP (Bischoff et al., 1995). Studi in cellule di mammifero hanno dimostrato che RanGAP1 è escluso dai centrosomi (Joseph et al., 2002). Di conseguenza, è ragionevole ipotizzare che la funzione della frazione centrosomale di RanBP1 sia quella di regolare il 'giusto' livello di RanGTP e di conseguenza l'attivazione locale dei SAF.

3. TPX2 e importina β stabiliscono un rapporto di dipendenza reciproca nell'organizzazione dei poli del fuso

Abbiamo dimostrato che l'eccesso di importina β interferisce con la corretta organizzazione del fuso mitotico, inducendo frammentazione dei poli, problemi nell'allineamento cromosomico e ritardo nella progressione mitotica. Questi dati suggeriscono che un eccesso di importina β inibisca, o ritardi, il rilascio dei SAF ai poli, dipendente da RanGTP. La nostra dimostrazione che le anomalie indotte da importina β sono mitigate dalla co-espressione di TPX2, o di sequenze NLS qualsiasi, è di supporto a questo modello. Infatti, in questi esperimenti, si ha una titolazione dell'importina β in eccesso da parte degli NLS co-espressi: di conseguenza, i SAF sono nuovamente disponibili e i difetti mitotici, indotti dall'espressione della sola importina β , vengono recuperati.

Una importante conclusione che si può ricavare dall'efficacia del recupero da parte di sequenze NLS riguarda il ruolo dell'importina α : importina α lega direttamente le sequenze NLS, e quindi, nel processo di attivazione dipendente da RanGTP, agisce come una molecola "ponte" tra SAF che contengono un NLS del tipo TPX2 e importina β . Le sequenze NLS esogene competono con i SAF endogeni per il legame all'importina α , favorendo il rilascio di questi ultimi (vedi Fig. 24).

Nell'ambito di questo modello bisogna ricordare che l'inattivazione di TPX2 mediante RNAi in cellule HeLa induce frammentazione dei centrioli e di conseguenza fusi multipolari (Garrett et al., 2002). Quindi, l'inibizione dei SAF, sia essa ottenuta per inattivazione diretta (RNAi) o mediante un eccesso di importina β , danneggia allo stesso modo la bipolarità del fuso.

Anche quando RanBP1 è presente in eccesso si osserva la formazione di fusi mitotici multipolari (Guarguaglini et al., 2000). Questa anomalia è generata specificamente in mitosi, e riflette l'induzione di una separazione anomala (splitting) tra i due centrioli che appartengono allo stesso centrosoma (Di Fiore et al., 2003). Si può quindi ipotizzare che l'eccesso di RanBP1 agisca variando il pool del RanGTP al centrosoma e, di conseguenza, ostacolando l'attivazione locale dei SAF. In quest'ottica, lo splitting dei centrioli potrebbe risultare dal mancato rilascio di una qualche proteina, legata ad importina β , deputata a mantenere la coesione tra i centrioli (Di Fiore et al., 2004).

Inseriti in questo quadro, i nostri risultati indicano che, in cellule di mammifero, importina β è un fattore chiave nella regolazione della funzionalità del fuso mitotico. In particolare, nelle cellule mitotiche, si stabilisce una dipendenza reciproca tra importina β e TPX2: TPX2 è il 'vettore' di cui si serve l'importina β per arrivare ai poli, mentre importina β , rispondendo alla presenza di RanGTP, conferisce a TPX2 una 'regolabilità' spazialmente circoscritta ai poli. In questo scenario sia l'equilibrio molare, e quindi i rapporti quantitativi tra le singole componenti, sia il programma di localizzazione di Ran, importine e SAF sono elementi critici nella funzionalità del fuso mitotico (Fig. 32).

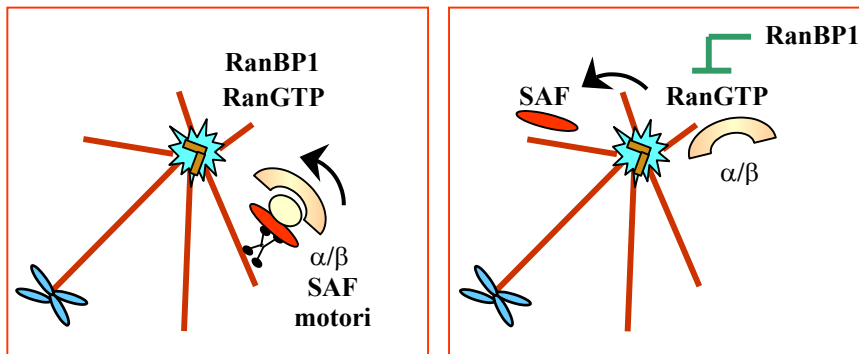


Fig. 32. Modello per l'organizzazione dei poli del fuso mitotico in cellule somatiche. SAF del tipo di TPX2 possono agire come 'vettori' dei loro stessi inibitori (importine) (pannello a sinistra) e come bersaglio della regolazione da parte di RanGTP (pannello a destra).

4. I partner di Ran si distribuiscono in 'circuiti locali' intorno a specifiche strutture mitotiche

In generale, molte evidenze che si stanno accumulando in letteratura sulle funzioni mitotiche del network di Ran, suggeriscono che il bilancio molecolare e l'organizzazione spaziale sono essenziali in tutti i processi mitotici controllati da Ran. Da queste evidenze emerge uno scenario in cui, tutti gli attori, nello svolgimento dello spettacolo 'mitosi', devono trovarsi nel posto giusto al momento giusto: in mitosi, infatti, particolari corredi di fattori regolativi sono richiesti intorno a specifiche strutture per organizzare la serie di eventi che porteranno alla divisione cellulare.

4a. Un circuito locale di Ran ai centrosomi

La formazione del fuso mitotico, nelle cellule somatiche, inizia durante la profase, prima della rottura dell'involucro nucleare. Quindi, i regolatori della dinamica dei MT, in questa prima fase, sono fattori non nucleari e non associati alla cromatina. NuMA, TPX2 e gli altri NLS-SAF, sono ininfluenti, dato che la membrana nucleare ancora intatta li tiene lontani dalla 'scena' del centrosoma. I protagonisti, sono piuttosto, fattori di nucleazione, quali la γ -tubulina e le proteine ad essa associate nel γ -TURC (γ -tubulin ring complex), e fattori coinvolti nella stabilizzazione e nell'ancoraggio delle estremità meno dei MT ai poli (per una review vedi Kline-Smith e Walczack, 2004).

Ricerche recenti suggeriscono che il sistema di Ran svolga un ruolo regolativo già a questo stadio. Ran è implicato nell'ancoraggio dei MT ai centrosomi in cellule di mammifero (Keryer et al., 2003). Sia Ran che RanBP1 associano al centrosoma per tutta la durata del ciclo cellulare in maniera stabile, come le componenti costitutive (Keryer et al., 2003; Di Fiore et al., 2003). La delocalizzazione di Ran dal centrosoma in cellule interfasiche induce disorganizzazione degli aster e ostacola la ricrescita dei MT (Keryer et al., 2003). In questa funzione, Ran agisce di concerto con AKAP450 (Keryer et al., 2003), una proteina coiled-coil che recluta al centrosoma diversi fattori (per una review vedi Andersen, 1999).

Un problema che rimane irrisolto riguarda la regolazione del ciclo di idrolisi e scambio di GTP sul Ran centrosomale. Né RCC1, né RanGAP1 sono stati rilevati al centrosoma (Keryer et al., 2003; Moore et al., 2002; Joseph et al., 2002). Si può ipotizzare che altri meccanismi, diversi da quelli che regolano il ciclo di Ran nel trasporto, agiscano localmente sul Ran mitotico, facendo leva su fattori, non ancora identificati, capaci di vicariare le funzioni di RCC1 e RanGAP1 (Di Fiore et al., 2004). Tra i possibili candidati, Mog1 è un fattore nucleare che ha un'attività di scambio su Ran, sia in *Xenopus* (Nicolas et al., 2001) che in cellule di mammifero (Steggerda e Pascal, 2000). La sua localizzazione mitotica non è nota. È molto interessante l'ipotesi che Mog1, come altri fattori nucleari, raggiunga i poli del fuso durante la mitosi, dove potrebbe regolare lo scambio di GTP sul Ran centrosomale. Un altro interessante fattore è NeRCC1, una proteina con un dominio chinasi omologo a quello di diverse chinasi centrosomali e che presenta, inoltre, regioni di omologia con RCC1. Nonostante non sia dimostrato se NeRCC1 possa catalizzare lo scambio di nucleotidi su Ran, è molto interessante l'osservazione che la microiniezione di anticorpo anti-NeRCC1 in cellule

di mammifero in profase induce fusi anomali, prevalentemente multipolari, con cromosomi mal allineati (Roig et al., 2002), molto simili a quelli osservati in presenza di disfunzioni del network di Ran. Potrebbe essere interessante ai fini di comprendere pienamente il controllo mitotico mediato da Ran, indagare ulteriormente la localizzazione e il ruolo mitotico di questi due candidati.

Importina α e β , invece, non localizzano al centrosoma in interfase e quindi non sono coinvolte in questo circuito di regolazione a questo stadio.

Dopo la rottura dell'involucro nucleare, il comportamento dinamico dei MT cambia vistosamente. I MT interfascici diventano più corti e più dinamici. La bipolarità del fuso viene regolata da proteine-motore con attività antagoniste, come il complesso dineina/dinactina diretto verso le estremità meno, e la chinesina Eg5 che si muove verso le estremità più (Walczack et al., 1998; per una review Heald 2000). La struttura dei poli deve essere correttamente regolata per fornire supporto ai movimenti del fuso e dei cromosomi durante la segregazione: la formazione di nuovi MT e l'organizzazione di quelli pre-esistenti deve essere coordinata per mantenere l'integrità dei poli del fuso (per una review Kline-Smith e Walczack, 2004). In questo quadro, il 'timing' della localizzazione di importina β ai poli che abbiamo descritto acquista particolare rilevanza. I complessi importine/SAF raggiungono i poli quando le attività di organizzazione e di supporto sono necessarie per l'integrità dei poli stessi. L'attivazione dei SAF a questo stadio è importante, come dimostrano esperimenti di inattivazione di TPX2, in cui i poli del fuso assumono strutture aberranti e la mitosi non può progredire oltre la prometafase (Garrett et al., 2002; Gruss et al., 2002; Guarguaglini, dati non pubblicati).

Nei nostri esperimenti, un eccesso di importina β , cioè un alterato bilancio molecolare tra la componenti di questo network locale, induce frammentazione dei poli e fusi anomali simili a quelli dovuti all'inattivazione di TPX2. Il meccanismo di assemblaggio di un fuso bipolare funzionale richiede dunque che RanGTP si leghi ad importina β , sottraendo la funzione inibitoria che quest'ultima esercita su fattori chiave dell'assemblaggio stesso. Come abbiamo osservato (Fig.16) importina β e α , RanBP1 e RanGTP colocalizzano ai poli del fuso dalla prometafase all'anafase, rendendo possibile la realizzazione di diverse interazioni. In studi biochimici, è stata dimostrata l'esistenza di un complesso trimetrico RanGDP/importina β /RanBP1, la cui funzione non è definita (Plafker e

Macara, 2002) ma che potrebbe essere interpretato come una sorta di 'intermedio di reazione'. Allora, nel quadro degli eventi che abbiamo qui prospettato, l'osservazione che un eccesso di RanBP1 induce a livello dei poli del fuso anomalie simili, sebbene non identiche, (Guarguaglini et al., 2000; Di Fiore et al., 2003) alla sovraespressione di importina β e all'inattivazione di TPX2, acquista un nuovo interesse: possiamo ipotizzare, infatti, che un eccesso di RanBP1 interferisca proprio con la capacità di RanGTP di regolare in modo efficiente i complessi importine/SAF (Fig. 32).

4b. Un circuito locale di Ran ai cinetocori

In metafase, i cinetocori svolgono un ruolo chiave nel controllo della progressione mitotica. A questo stadio, il checkpoint della formazione del fuso (spindle assembly checkpoint) sorveglia il legame di tutti i cromatidi fratelli ai MT e il conseguente allineamento nella piastra metafasica, e regola quindi l'inizio della segregazione cromosomica. In questo sistema di controllo, diverse proteine regolatrici si legano ai cinetocori e ne controllano la struttura e la funzionalità, attivando, in caso di irregolarità, una cascata di segnalazione che blocca la transizione metafase/anafase (per una review vedi Amon et al., 1999; Peters, 2002). Dati recenti suggeriscono un nuovo ruolo del network di Ran nel controllo del legame dei MT ai cinetocori. E' stato osservato che all'inizio dell'anafase, cioè nel momento in cui lo 'spindle checkpoint' viene spento, la quantità di RCC1 associato ai cromosomi aumenta (Arnaoutov e Dasso, 2003; Li e Zheng, 2004; Hutchins et al., 2004), E' stato ipotizzato che questo causi variazioni nel livello di RanGTP in prossimità dei cinetocori; a loro volta, queste variazioni potrebbero funzionare da interruttore molecolare per spegnere il checkpoint quando i cromosomi sono ormai allineati sulla piastra metafasica (Arnaoutov and Dasso, 2003; per una review Li et al, 2003b). Inoltre, una frazione di RanGAP1, modificata dalla 'sumolazione' mediata dalla Ran-binding protein RanBP2/Nup358, è associata ai cinetocori (Joseph et al., 2002).

Questi dati modificano in parte la concezione che i cromosomi siano una piattaforma uniformemente carica di RanGTP, e suggerisce invece che un circuito locale di Ran potrebbe funzionare a livello dei cinetocori (Quimby and Dasso, 2003). A sostegno di questo modello, è interessante il contributo di RanBP2/Nup358. Questa proteina, pur legando Ran, non fa parte del 'core' regolativo del network, ma può indirettamente regolarlo perchè ha una attività di SUMO-ligasi che può modificare la componente

RanGAP1. In interfase, RanBP2 è localizzata ai pori nucleari, ma in mitosi si ridistribuisce ai poli del fuso, ai MT e ai cinetocori, dove colocalizza con RanGAP1 (Salina et al., 2003; Joseph et al., 2004). L'inattivazione di RanBP2 mediante *RNAi*, in cellule umane, non ha effetto sul trasporto, ma provoca un'alterazione nella struttura del cinetocore, inibendo il reclutamento di regolatori dello 'spindle checkpoint'. Questo mancato reclutamento induce, a sua volta, un ritardo in prometafase e difetti nell'allineamento dei cromosomi. Tutte queste osservazioni convergono ad indicare non solo l'esistenza di un network ai cinetocori, ma anche un suo ruolo funzionale nel sorvegliare il legame dei cromosomi ai MT del fuso (Di Fiore et al., 2004).

4c. Un circuito locale di Ran ai MT

Una frazione di Ran è legata alla cromatina durante la mitosi (Hinkle et al., 2002; Bilbao-Cortes et al., 2002; Zhang et al., 2002; Li et al., 2003a) ma la maggior parte si ridistribuisce al citoplasma mitotico associandosi in parte con i MT. Alcune evidenze in letteratura, pur frammentarie, convergono a suggerire diverse funzioni per questa frazione di Ran. Come abbiamo già ricordato in Introduzione, Ran può regolare *in vitro* la dinamica dei MT e stabilizzarne le estremità crescenti (Carazo-Salas et al., 2001; Wilde et al., 2001). Inoltre, Ran può influenzare la mobilità della chinesina Eg5 (Wilde et al., 2001). Anche per RanBP1 è stato identificato un ruolo nel controllo della dinamica dei MT: la microiniezione di anticorpo anti-RanBP1 in cellule mitotiche di mammifero produce una eccessiva stabilizzazione del fuso, rendendolo resistente all'azione di agenti depolimerizzanti, inibisce la dinamica dei MT e compromette la corretta segregazione dei cromatidi fratelli (Guarguaglini et al., 2000). Anche una frazione di RanGAP1 somolata si associa ai MT (Joseph et al., 2002; Matunis et al., 1998). Queste osservazioni suggeriscono che un circuito locale di Ran operi lungo i MT e che, data la prevalenza di componenti che regolano l'idrolisi del RanGTP, questa reazione acquisti importanza prevalente quando la dinamica, piuttosto che la nucleazione dei MT, diventa critica per la funzionalità del fuso mitotico.

Abbiamo già messo in evidenza l'importanza della regolazione dei complessi formati da importina α , β e SAF, dopo la rottura dell'involucro nucleare, per la corretta organizzazione dei poli del fuso. Questi complessi potrebbero essere importanti anche nella regolazione della dinamica dei MT. E' logico supporre che RanGTP, attraverso il suo effetto su TPX2

regoli anche l'attività di fattori più a valle. Ad esempio, l'attività di Aurora-A, uno dei principali regolatori dell'attività dei centrosomi e del fuso mitotico, ed in parte anche la sua localizzazione al fuso, sono dipendenti da TPX2 (Tsai et al., 2003; Eysers et al., 2003; Kufer et al., 2002). E' importante sottolineare, a questo proposito, che un'inattivazione soltanto parziale di TPX2 non altera la struttura dei poli, ma piuttosto l'organizzazione dei MT del fuso (Gruss et al., 2002). Questo potrebbe indicare che la mancanza, o l'insufficienza, dell'attività di TPX2 venga risentita prima di tutto dalla frazione di Aurora-A associata ai MT. Possiamo ipotizzare che RanGTP, regolando TPX2, influenzi dunque anche il suo bersaglio immediato, cioè l'attività di Aurora-A lungo i MT.

In sintesi, l'analisi delle localizzazioni delle componenti del sistema di Ran rispetto alle strutture dell'apparato mitotico suggerisce che, in cellule somatiche, componenti del network di Ran e vettori di trasporto si ridistribuiscono dopo la rottura dell'involucro nucleare, in circuiti locali specializzati. Questo punto di vista è più realistico di quello tradizionale di un unico 'gradiente mitotico'. In questa luce, i dati disponibili ad oggi possono essere retrospettivamente re-interpretati ammettendo che alterazioni dell'equilibrio molecolare tra le componenti del sistema di Ran, interferendo con l'attività dei circuiti locali, impedisce il corretto svolgimento di specifici aspetti della mitosi: bipolarità del fuso, checkpoint meta-anafase, segregazione dei cromosomi (Fig 33)

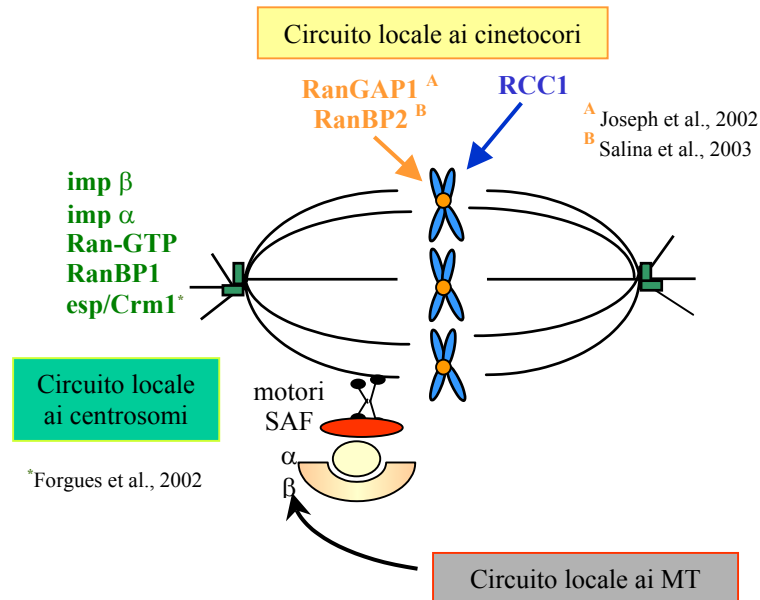


Fig. 33. In mitosi, le componenti del sistema di Ran si ridistribuiscono in ‘circuiti locali’ intorno alle strutture dell’apparato mitotico (centrosomi, in verde; MT, in nero; cinetocori, in arancio; RCC1 è legato alla cromatina, in blu) e ne regolano la funzionalità (adattato da Di Fiore et al., 2004).

5. Il ruolo dell’importina β nella ricostituzione dell’involucro nucleare alla fine della mitosi

Un interessante aspetto delle funzioni regolative di importina β associate alla sua capacità di interagire con i MT emerge da un lavoro recente in *Drosophila*. Un mutante di importina β , *ketel*, che non può rispondere alla regolazione da parte di RanGTP (Timinszky et al., 2002), non altera l’organizzazione del fuso in embrioni di *Drosophila*, ma la ricostituzione dell’involucro dopo la mitosi. Questa forma mutante di importina β , infatti, sequestra sui MT fattori richiesti proprio per la completa ricostruzione della membrana (Tirian et al., 2003). Quindi, importina β , interagendo con i MT mitotici, può svolgere diverse funzioni a seconda dei ‘carga’ a cui si lega; legandosi ai SAF, importina β partecipa all’organizzazione dei poli del fuso. Una frazione del pool mitotico di importina β potrebbe invece funzionare come una sorta di deposito di fattori responsabili della formazione della membrana che devono essere tenuti ‘inattivi’ durante la mitosi e resi subito disponibili quando ha inizio la ricostituzione del nucleo.

Oltre ai ruoli mitotici che abbiamo finora discusso, importina α e β svolgono funzioni dirette nella formazione dell’involucro nucleare. In saggi di ricostituzione delle membrane a partire da componenti purificate è stato dimostrato che importina β è richiesta nella ricostituzione dell’involucro mediata da Ran (Zhang et al., 2002). In esperimenti indipendenti, in presenza di un eccesso di importina β , le vescicole, che costituiscono i precursori della membrana nucleare, vengono correttamente reclutate intorno alla cromatina, ma non si fondono a formare un involucro continuo (Harel et al., 2003). Importina α ha *in vitro* un effetto simile sulla fusione delle vescicole (Hachet et al., 2004). In questi esperimenti dunque, le importine α e β , sembrano agire da regolatori negativi nella ricostituzione dell’involucro nucleare così come nell’organizzazione del fuso mitotico. I nostri dati *in vivo* danno sostegno ai dati biochimici. Abbiamo osservato che in anafase l’importina β si stacca dai poli e si ridistribuisce intorno alla cromatina in via di segregazione. Questo costituisce un evento precoce all’uscita della mitosi che precede la decondensazione della cromatina, la riduzione dei livelli di

RanBP1 e il rientro di Ran al nucleo (Guarguaglini et al., 2000; nostre osservazioni non pubblicate). Un 'timing' simile è stato descritto, in un lavoro indipendente, per importina α (Sugimoto et al., 2002). La rilocalizzazione precoce delle importine alla periferia della cromatina sembra dunque essere uno dei primi eventi, e forse avere un ruolo regolativo precoce, in un processo più ampio di regolazione dell'uscita dalla mitosi. È stato osservato che RCC1 è fosforilato in mitosi da CDK1/ciclina B. Questa fosforilazione impedisce ad RCC1 di legarsi alle importine α e β ed in metafase aumenta la mobilità di RCC1 sulla cromatina. All'anafase, questa mobilità diminuisce: questo evento è stato messo in relazione con la defosforilazione, anche se non in modo esclusivo (Hutchins et al., 2004). Se, da una parte, un cambiamento nella dinamica dell'interazione tra RCC1 e cromatina in anafase potrebbe segnalare la "revoca" dello spindle checkpoint, dall'altra, la defosforilazione di RCC1 all'uscita dalla mitosi potrebbe indurre il ripristino del legame alle importine α e β , facilitando il reclutamento di queste ultime alla cromatina per costruire i nuovi nuclei. Anche le importine α e β , d'altra parte, sembrano essere a loro volta fosforilate in G2/M (Yasuhara et al., 2004); benchè il significato di questa modificazione non sia chiaro, essa potrebbe contribuire a favorire alcune interazioni (per esempio, con RCC1) e inibirne altre (con dineina e SAFs) in un momento, quello dell'uscita dalla mitosi, in cui la cellula va incontro a profondi cambiamenti e in cui le 'relazioni' mitotiche devono riconvertirsi in interfasiche.

6. Le importine: vecchi cavalli di battaglia e nuove funzioni

I risultati emersi in questo studio contribuiscono a consolidare l'idea che la GTPasi Ran regoli diversi aspetti della vita della cellula attraverso le importine in un rapporto di cooperazione/antagonismo, che alcuni autori hanno interpretato ricorrendo al paradigma dello yin/yang (Harel e Forbes, 2004). In questo paradigma, l'importina β rappresenta l'elemento versatile, mobile, lo yin appunto, che interagisce con vari 'carga' in modi diversi, a volte inibendoli e trattenendoli, come per i fattori coinvolti nell'organizzazione del fuso e dell'involucro nucleare, a volte invece facilitandone il movimento, come nel trasporto. Ran invece è lo yang, l'elemento stabile che nella sua coerenza agisce sempre nello stesso modo: spinge l'importina β a lasciare il suo carico. L'estrema versatilità

dimostrata dall'importina β ci mette in allerta sulla possibilità che in futuro possano emergere nuove funzioni.

Anche l'importina α potrebbe riservarci altre sorprese. E' stato già dimostrato che importina α regola negativamente TPX2 *in vitro* (Schatz et al., 2003), ed in questa tesi noi abbiamo dimostrato che agisce da molecola ponte tra i fattori NLS-SAF e importina β nell'organizzazione del fuso in cellule di mammifero.

Importina α agisce in concerto con β anche in un altro contesto: importina α interagisce con dineina nel sistema di trasporto retrogrado lungo gli assoni caratteristico dei neuroni. Importina β si lega al complesso in maniera dipendente da α . Questo sistema di trasporto ha la funzione fondamentale di convogliare verso il corpo cellulare del neurone i segnali che modulano la rigenerazione dei nervi in seguito ad una lesione (Hanz et al., 2003). Questa osservazione suggerisce che il trasporto lungo i MT, mediato dalle importine α e β e dalla dineina, sia funzionale non solo all'organizzazione del fuso mitotico, come noi abbiamo dimostrato, ma possa costituire un sistema più generalizzato di trasporto, tanto da essere utilizzato anche in un sistema altamente specializzato come i neuroni.

In base a quanto abbiamo discusso finora, e alle prospettive aperte dall'emergere di nuove evidenze, appare molto appropriata l'ossequazione di Amnon Harel e Douglass Forbes (Harel e Forbes, 2004): il nome 'importina', coniato da Benjamin Lewin per il primo recettore di trasporto identificato, e che ad alcuni era sembrato troppo 'importante' (Goerlich et al., 2003), si è rivelato invece una scelta lungimirante.

In sintesi, questo lavoro di tesi fornisce informazioni importanti sui meccanismi che stanno alla base dell'organizzazione del fuso mitotico in cellule di mammifero e sulle alterazioni che, modificandone la struttura bipolare, possono indurre malsegregazione cromosomica e di conseguenza instabilità genomica. Contribuendo a definire un nuovo ruolo del sistema Ran/importine nelle cellule somatiche, i nostri risultati aggiungono un tassello alla visione, proposta da alcuni autori (Harel e Forbes, 2004), di questo sistema come un regolatore 'globale', in interfase e in mitosi, assimilabile ai sistemi chinasi/fosfatasi o ubiquitina/proteasoma.

METODI

Plasmidi

Abbiamo amplificato la sequenza umana codificante l'importina β a partire da un costrutto d'espressione batterico, gentilmente fornito dal Dr D. Goerlich (Università di Heidelberg) mediante PCR (polymerase chain reaction) e l'abbiamo clonata in frame con la sequenza codificante per la GFP (green fluorescent protein) nel vettore pEGFP-N1, per l'espressione in cellule di mammifero. Questo costrutto viene indicato nei risultati come pIB-GFP. Il costrutto per l'espressione di TPX2 in cellule di mammifero è stato gentilmente fornito dalla Dr I. Vernos (EMBL, Heidelberg). Il costrutto NLS, gentilmente fornito dal Dr X.W. Wang (Lab. Molecular Carcinogenesis, National Cancer Institute, NIH, Bethesda, USA), contiene sequenze di localizzazione nucleare (NLS) in frame con la GFP. Il vettore per la luciferasi è distribuito dalla Clontech.

Culture cellulari e metodiche di sincronizzazione

In questa tesi si sono utilizzate le seguenti linee cellulari: cellule umane HeLa e HC1, derivate dalle HeLa che esprimono stabilmente la centrina1-GFP (gentilmente fornite dal Dr. M. Bornens, Institut Curie, Paris), fibroblasti umani MRC5, fibroblasti embrionali murini NIH-3T3 e fibroblasti subcutanei murini L929. Tutte le linee sono state coltivate in terreno contenente siero fetale di vitello al 10% ed in presenza dell'antibiotico geneticina (G418) alla concentrazione di 500 $\mu\text{g/ml}$ nel caso delle cellule HC1. Per arricchire le colture di cellule mitotiche, è stata aggiunta al terreno di coltura timidina (2 mM) per 16-24 ore; successivamente il terreno è stato sostituito con terreno fresco contenente 30 μM deossicitidina per 7-10 ore. In alcuni esperimenti, al terreno di coltura è stata aggiunta cicloesimide (CHX) (10 $\mu\text{g/ml}$) per inibire la sintesi proteica. Dove è specificato nei risultati, dopo il rilascio, al terreno è stato aggiunto nocodazolo (NOC) (0.2 $\mu\text{g/ml}$) o taxolo (TAX) (1 μM) per le ultime 4-6 ore di coltura prima della raccolta. I profili del ciclo cellulare delle colture sono stati analizzati con un citofluorimetro a flusso FACStar (Beckton Dickinson). Per i saggi di ricrescita dei MT, le cellule sono state incubate a 0°C per 1 ora, poi reincubate a 37°C per 5-20 minuti.

RNA interference (RNAi)

Negli esperimenti di inattivazione, cellule HeLa sono state trasfettate con oligonucleotidi a RNA a doppio filamento (Dharmacon Research, Inc) diretti contro la sequenza codificante per TPX2 (144-GAA UGG AAC UGG AGG GCU U-162) o come controllo, diretti contro la sequenza della luciferasi (GL-2) alla concentrazione finale di 80 nM, seguendo il protocollo standard fornito dalla Dharmacon Research Inc. L'Oligofectamina (Invitrogen) è stata usata come agente di trasfezione. In tutti gli esperimenti le cellule sono state raccolte dopo 40 ore di trasfezione.

Esperimenti di trasfezione

Le cellule sono state trasfettate utilizzando il reagente FUGENE (Roche Diagnostic, 3 μ l/ μ g DNA) oppure Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 1 μ l/ μ g DNA). Per il costrutto esprimente l'importina β abbiamo saggiato dosi comprese tra i 2 e i 6 μ g di DNA per 1×10^6 cellule. Nella maggior parte degli esperimenti sono stati utilizzati 2 μ g di costrutto. In alcuni esperimenti, costrutti derivati dal vettore pCMV per l'espressione in eucarioti ed esprimenti TPX2, NLS, GFP o luciferasi sono stati co-trasfettati nelle quantità indicate nel testo, e la quantità totale di DNA nelle miscele di trasfezione è stata portata a 8 μ g utilizzando il vettore vuoto pCMV. Le cellule sono state raccolte 30 ore dopo la trasfezione e analizzate mediante immunofluorescenza.

Polimerizzazione e sedimentazione dei MT

Per la polimerizzazione di MT esogeni abbiamo utilizzato tubulina liofilizzata estratta da cervello bovino (Cytoskeleton), diluita (1 mg/ml) in buffer BRB80 freddo (80 mM PIPES, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, pH 6.8), contenente 10% glicerolo, a cui è stato aggiunto 1 mM MgGTP al momento della diluizione. Abbiamo stimolato la polimerizzazione aggiungendo TAX gradualmente fino ad arrivare ad una concentrazione finale di 10 μ M ed incubando la reazione a 37°C per 30 minuti. Questa reazione è stata poi centrifugata attraverso un cuscino di glicerolo (40%) in BRB80 (rotore SW55Ti, 55000 rpm, 37°C, 10 minuti). Il pellet contenente i MT è stato risospeso in BRB80 contenente DTT (1 mM) e TAX (20 μ M). Gli estratti mitotici sono stati preparati da colture cellulari

arrestate in timidina e poi rilasciate e raccolte nel buffer BRB80 a cui erano stati aggiunti inibitori delle proteasi e delle fosfatasi e 20 µg/ml citocalasina B. L'estratto è stato omogenizzato in un potter vetro/vetro. L'estratto crudo è stato centrifugato (14000 rpm, 30 minuti, 4°C) e il supernatante incubato con 0.5 mM MgGTP, 3 mM MgCl₂, 20 µM TAX per stimolare la polimerizzazione dei MT endogeni, e 5 mM MgAMPPNP o, alternativamente, 2.5 mM MgATP, rispettivamente per favorire o inibire la cosedimentazione di proteine-motore, per 30 minuti a 33°C. Aliquote dell'estratto sono state incubate in presenza o meno di MT polimerizzati esogeni (ad una concentrazione finale di tubulina pari a 0.3 mg/ml). Le reazioni sono state poi centrifugate attraverso un cuscino di saccarosio 1M, preparato in BRB80 completo di inibitori delle proteasi e delle fosfatasi, TAX 10 µM e 0.5 mM MgATP (rotore SW55Ti, 40000 rpm, 30 minuti, 22°C). In alcuni esperimenti, aliquote dell'estratto (0.7-1.0 mg) sono state incubate (1 ora su una ruota a +4°C) con 10 µg di anticorpo m70.1 diretto, contro la catena intermedia della dineina (DIC) (isotipo IgM di topo, Sigma-Aldrich D5167), o con 10 µg di anticorpo non specifico (anti-IgM murine, indotte in capra, Santa Cruz Biotechnology), o con un volume uguale di BRB80 (controllo senza anticorpo). La reazione di polimerizzazione dei MT e la sedimentazione sono state poi effettuate come descritto sopra.

Western immunoblotting

Gli estratti proteici sono stati separati mediante elettroforesi su gel di acrilammide/sodio-dodecil-solfato (SDS-PAGE), utilizzando gel al 10% di acrilammide, e trasferiti su membrane di nitrocellulosa (Schleicher & Schuell). Le membrane sono state poi incubate con i seguenti anticorpi primari: importina β (clone 23, 1 µg/ml), Ran (clone 20, 0,25 µg/ml) e p150^{Glued} (clone 1, 610473, 1 µg/ml) prodotti da Transduction Laboratories; α-tubulina (clone B-5-1-2, 3.35 µg/ml) e DIC (m70.1 fluido ascitico murino, 1:2000) prodotti da Sigma-Aldrich; actina (clone I19, 0.5 µg/ml), p34/cdc2 (clone 17, 0.5 µg/ml), ciclina B1 (GNS1, 0.5 µg/ml), Ran (C-20, 0.5 µg/ml), RanBP1 (clone C-19, 0.5 µg/ml), RCC1 (C-20, 0.5 µg/ml) e importina α1 e α2 (C-20 cloni, sc6918 e sc6917 rispettivamente, entrambe alla concentrazione di 1.5 µg/ml), tutti prodotti da Santa Cruz Biotechnology; ed infine TPX2, gentilmente fornito dal Dr I. Mattaj (EMBL, Heidelberg) 1:10000. Le proteine reattive sono state rilevate

utilizzando anticorpi secondari coniugati con la perossidasi di horseradish (HRP) (Santa Cruz Biotechnology).

Immunofluorescenza (IF)

Cellule coltivate direttamente su vetrini sterili sono state (i) fissate con 3% paraformaldeide/30 mM saccarosio per 10 minuti, oppure (ii) trattate con 1% Triton X-100 in PHEM (45 mM Hepes pH 6.9, 45 mM PIPES pH 6.9, 10 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoride) per 4 minuti, lavate e quindi fissate in 3% paraformaldeide/30 mM saccarosio per 10 minuti, e successivamente in metanolo per 2 minuti. Gli anticorpi primari utilizzati sono: importina β (vedi sopra) 1:50; γ -tubulina (T3559, Sigma-Aldrich, 1:1000); fosfo-AuroraA/AIK (T288) (n. cat 3091, Transduction Laboratories, 1:500); α -tubulina (clone B-5-1-2, Sigma-Aldrich, 1:2000); IAK1/Aurora-A (clone 4, Transduction Laboratories, 1:500); TPX2, gentilmente fornito dal Dr. I. Mattaj, 1:5000; anti-centrina monoclonale 20H5, gentilmente fornita dal Dr J. Salisbury (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA), 1:5000; anti-centrina2 policlonale, gentilmente fornita dal Dr. M. Bornens (Institut Curie, Paris), 1:1000; RanBP1 (clone C-19, Santa Cruz Biotechnology, 1:100); RanGTP (AR-12, Richards et al., 1995), gentilmente fornito dal Dr. I. Macara (Center for Signalling, Charlottesville, Virginia, USA) 1:50; NuMA (Ab-2, Oncogene, 1:50). Abbiamo utilizzato anticorpi secondari coniugati ai seguenti fluorocromi: fluoresceina isotiocianato (FITC), Cy3 or AMCA (Jackson Immunoresearch Laboratories); rodamina (Santa Cruz Biotechnology), o Texas Red (Vector). Le cellule sono state esaminate utilizzando un microscopio Olympus AX70 a epifluorescenza collegato ad una CCD camera (Photometrics) oppure un microscopio Leica DMR ed una camera CoolSnap (Photometrics). Le immagini confocali sono state ottenute utilizzando un microscopio TCS-SP2 (Leica) (Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare, Università di Roma 'La Sapienza') oppure un LSM 510 META (Zeiss).

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro di tesi è stato realizzato nel laboratorio della Dr. Patrizia Lavia, nell'Istituto di Biologia e Patologia Molecolari del CNR (Consiglio Nazionale delle Ricerche), c/o l'Università di Roma "La Sapienza".

Vorrei ringraziare Patrizia Lavia per la costante supervisione nella realizzazione di questo progetto, per le stimolanti discussioni e il suo contributo alla mia crescita scientifica e personale. Un ringraziamento particolare a Barbara Di Fiore per il ruolo speciale che lei ha avuto nella mia formazione e per il suo contributo alla progettazione e alla realizzazione di parte di questi esperimenti. Vorrei ringraziare Rosamaria Mangiacasale, compagna di lavoro da molti anni, per il valido contributo dato a questo lavoro. Un ringraziamento speciale va a Giulia Guarguaglini per l'insostituibile sostegno morale e pratico nella realizzazione di questa tesi. Vorrei ringraziare ancora Federica Lucantoni per il contributo tecnico e gli altri membri del laboratorio, Antonio Tedeschi e Fabrizia Sobrero, che con la loro presenza amichevole hanno reso piacevole la realizzazione di questo lavoro.

Vorrei ringraziare in particolar modo Catherine Thibier, del laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Università di Parigi Pierre-et-Marie Curie, per il suo contributo alla realizzazione di alcuni degli esperimenti di questa tesi. Un ringraziamento va ad Enzo Marchetti per la sua disponibilità e per il suo aiuto nella realizzazione delle immagini confocali. Vorrei ringraziare ancora il Dr. Michel Bornens (Istituto Curie, Parigi), e il Dr. Ian Macara (Center for Signalling, Charlottesville, Virginia, USA), oltre che per i materiali che mi hanno gentilmente fornito, per i suggerimenti che mi hanno dato mentre questo progetto era in corso.

I miei ringraziamenti vanno ancora al mio Tutore, Prof. Massimo Leviero per la sua disponibilità, per la supervisione scientifica e per i consigli che mi sono stati d'aiuto nella realizzazione di questa tesi.

Marilena Ciciarello

BIBLIOGRAFIA

1. Amon A. (1999). The spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev.* 9: 69-75.
2. Andersen S.S. (1999). Molecular characteristics of the centrosome. *Int. Rev. Cytol.* 187:51-109.
3. Arnaoutov A. and Dasso M. (2003). The Ran GTPase regulates kinetochore function. *Dev. Cell* 5: 99-111.
4. Askjaer P., Galy V., Hannak E. and Mattaj I.W. (2002). Ran GTPase cycle and importins alpha and beta are essential for spindle formation and nuclear envelope assembly in living *Caenorhabditis elegans* embryos. *Mol. Biol. Cell* 13: 4355-4370.
5. Bamba C., Bobiniec Y., Fukuda M. and Nishida E. (2002). The GTPase Ran regulates chromosome positioning and nuclear envelope assembly in vivo. *Curr. Biol.* 12: 503-7.
6. Battistoni A., Guarguaglini G., Degrossi F., Pittoggi C., Palena A., Di Matteo G., et al. (1997). Deregulated expression of the RanBP1 gene alters cell cycle progression in murine fibroblasts. *J. Cell Sci.* 110: 2345-57.
7. Baumer M., Kunzler M., Steigemann P., Braus G.H. and Irniger S. (2000). Yeast Ran-binding protein Yrb1p is required for efficient proteolysis of cell cycle regulatory proteins Pds1p and Sic1p. *J. Biol. Chem.* 275: 38929-37.
8. Bilbao-Cortes D., Hetzer M., Langst G., Becker P.B. and Mattaj I.W. (2002). Ran binds to chromatin by two distinct mechanisms. *Curr. Biol.* 12: 1151-6.
9. Bischoff F.R., Krebber H., Smirnova E., Dong W. and Ponstingl, H. (1995). Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by RanGTP binding protein RanBP1. *EMBO J.* 14: 705-715.
10. Blagden S.P. and Glover D.M. (2003) Polar expeditions-provisioning the centrosome for mitosis. *Nat. Cell. Biol.* 5:505-511.
11. Brinkley B.R. (2001). Managing the centrosome numbers game, from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell. Biol.* 11: 18-21.
12. Brunet S., Sardon T., Zimmerman T., Wittmann T., Pepperkok R., Karsenti E. and Vernos I. (2004). Characterization of the TPX2 Domains Involved in Microtubule Nucleation and Spindle Assembly in *Xenopus* Egg Extracts. *Mol. Biol. Cell.* 15: 5318-28.
13. Borczuk A.C., Shah L., Pearson G.D., Walter K.L., Wang L., Austin J.H., Friedman R.A., Powell C.A. (2004) Molecular signatures in biopsy specimens of lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* Jul 170:167-74.
14. Carazo-Salas R.E., Guarguaglini G., Gruss O.J., Segref A., Karsenti E. and Mattaj I.W. (1999). Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature* 400: 178-81.

15. Carazo-Salas R.E., Gruss O.J., Mattaj I.W. and Karsenti E. (2001). RanGTP coordinates regulation of microtubule nucleation and dynamics during mitotic-spindle assembly. *Nat. Cell Biol.* 3: 228-34.
16. Cassimeris L., and Spittle C. (2001) Regulation of microtubule-associated proteins. *Int. Rev. Cytol.* 210: 163-226.
17. Cicatiello L, Scafoglio C, Altucci L, Cancemi M, Natoli G, Facchiano A, Iazzetti G, Calogero R, Biglia N, De Bortoli M, Sfiligoi C, Sismondi P, Bresciani F, Weisz A. (2004) A genomic view of estrogen actions in human breast cancer cells by expression profiling of the hormone-responsive transcriptome. *J. Mol. Endocrinol.* 32:719-75.
18. Ciciarello M., Mangiacasale R., Casenghi M., Limongi Z.M., D'Angelo M., Soddu S., Lavia P. and Cundari E. (2001). p53 displacement from centrosomes and p53-mediated G1 arrest following transient inhibition of the mitotic spindle. *J. Biol. Chem.* 276: 19205-13.
19. Clarke P.R. and Zhang C. (2001). Ran GTPase, a master regulator of nuclear structure and function during the eukaryotic cell division cycle? *Trends Cell Biol.* 11: 366-71.
20. Compton D.A. (1998). Focusing on spindle poles. *J. Cell Sci.* 111: 1477-81.
21. Coutavas E., Ren M., Oppenheim J.D., D'Eustachio P., Rush M.G. (1993) Characterization of proteins that interact with the cell-cycle regulatory protein Ran/TC4. *Nature* 366: 585-7.
22. Dai W, Cogswell JP. (2003) Polo-like kinases and the microtubule organization center: targets for cancer therapies. *Prog. Cell. Cycle Res.* 5: 327-34.
23. Dasso M. (2002). The Ran GTPase: theme and variations. *Curr Biol*12: R502-8.
24. D'Assoro A.B., Lingle W.L. and Salisbury J.L.. (2002). Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene* 21: 6146-53.
25. De Luca A., Mangiacasale R., Severino A., Malquori L., Baldi A., Palena A. et al. (2003). E1A deregulates the centrosome cycle in a Ran GTPase-dependent manner. *Cancer Res.* 63: 1430-7.
26. Demeter J., Morphey M. and Sazer S. (1995). A mutation in the RCC1-related protein pim1 results in nuclear envelope fragmentation in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92: 1436-40.
27. Difilippantonio S., Chen Y., Pietas A., Schluns K., Pacyna-Gengelbach M., Deutschmann N., Padilla-Nash H.M., Ried T., Petersen I. (2003) Gene expression profiles in human non-small and small-cell lung cancers. *Eur. J. Cancer.* 39:1936-47.
28. Di Fiore B., Guarguaglini G., Palena A., Kerkhoven R.M., Bernards R. and Lavia P. (1999). Two E2F sites control growth-regulated and cell cycle-regulated transcription of the Htf9-a/RanBP1 gene through functionally distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274: 10339-48.
29. Di Fiore B. (2001). Regulatory roles of the Ran signaling network in mammalian cells. PhD Thesis. University of Rome "La Sapienza".

30. Di Fiore B., Ciciarello M., Mangiacasale R., Palena A., Tassin A.M., Cundari E. and Lavia P. (2003). Mammalian RanBP1 regulates centrosome cohesion during mitosis. *J. Cell Sci.* 116: 3399-3411.
31. Di Fiore B., Ciciarello M. and Lavia P. (2004). Mitotic functions of the Ran GTPase network: the importance of being in the right place at the right time. *Cell Cycle* 3: 305-313.
32. Di Matteo G, Fuschi P, Zerfass K, Moretti S, Ricordy R, Cenciarelli C, Tripodi M, Jansen-Durr P, Lavia P. (1995) Transcriptional control of the Htf9-A/RanBP-1 gene during the cell cycle. *Cell. Growth Differ.* 6:1213-24.
33. Doxsey S.J. (2002). Duplicating dangerously, linking centrosome duplication and aneuploidy. *Mol. Cell.* 10: 439-40.
34. Ems-Mc Clung S.C., Zheng Y. and Walczak, C.E. (2004). Importin alpha/beta and RanGTP regulate XCTK2 microtubule binding through a bipartite NLS. *Mol. Biol. Cell* 15: 46-57.
35. Eyers P.A., Erikson E., Chen L.G. and Maller J.L. (2003). A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Curr. Biol.* 13: 691-7.
36. Fleig U., Salus S.S., Karig I. and Sazer S. (2000). The fission yeast Ran GTPase is required for microtubule integrity. *J. Cell Biol.* 151: 1101-1.
37. Gaglio T., Dionne M.A., and Compton D.A. (1997) Mitotic spindle poles are organized by structural and motor proteins in addition to centrosomes. *J. Cell. Biol.* 138:1055-66.
38. Garrett S., Auer K., Compton D.A. and Kapoor, T.M. (2002). hTPX2 is required for normal spindle morphology and centrosome integrity during vertebrate cell division. *Curr. Biol.* 12: 2055-2059.
39. Goerlich D. and Kutay U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 607-60.
40. Goerlich D., Seewald M.J. and Ribbeck K. (2003). Characterization of Ran-driven cargo transport and the RanGTPase system by kinetic measurements and computer simulation. *EMBO J.* 22: 1088-1100.
41. Gonczy P., Echeverri C., Oegema K., Coulson A., Jones S.J., Copley R.R. et al. (2000). Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature* 408: 331-6.
42. Gromley A., Jurczyk A., Sillibourne J., Halilovic E., Mogensen M., Groisman I. et al. (2003). A novel human protein of the maternal centriole is required for the final stages of cytokinesis and entry into S phase. *J. Cell Biol.* 161: 535-45.
43. Gruss O.J., Carazo-Salas R.E., Schatz C.A., Guarguaglini G., Kast J., Wilm M., Le Bot N., Vernos I., Karsenti E. and Mattaj I.W. (2001). Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell* 104: 83-93.
44. Gruss O.J., Wittmann M., Yokoyama H., Pepperkok R., Kufer T., Sillje H., Karsenti E., Mattaj I.W. and Vernos I. (2002). Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. *Nat. Cell Biol.* 4: 871-879.

45. Guarguaglini G., Renzi L., D'Ottavio F., Di Fiore B., Casenghi M., Cundari E. and Lavia P. (2000). Regulated Ran-binding protein 1 activity is required for organization and function of the mitotic spindle in mammalian cells in vivo. *Cell Growth Differ.* 11: 455-465.
46. Guo Q.M., Malek R.L., Kim S., Chiao C, He M., Ruffly M., Sanka K., Lee N.H., Dang C.V., Liu E.T. (2000) Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray. *Cancer Res.* 60: 5922-28.
47. Hachet V., Kocher T., Wilm M. and Mattaj I.W. (2004). Importin alpha associates with membranes and participates in nuclear envelope assembly in vitro. *EMBO J.* 23: 1526-35.
48. Hanz S., Perlson E., Willis D., Zheng J.Q., Massarwa R., Huerta J.J., Koltzenburg M., Kohler M., van-Minnen J., Twissm J.L. and Fainzilber M. (2003). Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. *Neuron* 40: 1095-1104.
49. Harel A. and Forbes D.J. (2004). Importin beta: conducting a much larger cellular symphony. *Mol. Cell.* 16: 319-30.
50. Harel A., Chan R.C., Lachish-Zalait A., Zimmerman E., Elbaum M. and Forbes D.J. (2003). Importin beta negatively regulates nuclear membrane fusion and nuclear pore complex assembly. *Mol. Biol. Cell* 14: 4387-4396.
51. Haren L. and Merdes A. (2002). Direct binding of NuMA to tubulin is mediated by a novel sequence motif in the tail domain that bundles and stabilizes microtubules. *J. Cell Sci.* 115: 1815-1824.
52. Heald R., Tournebize R., Blank T., Sandaltzopoulos R., Becker P., Hyman A. and Karsenti E. (1996). Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature.* 382: 420-5.
53. Heald R., Tournebize R., Habermann A., Karsenti E. and Hyman A. (1997). Spindle assembly in *Xenopus* egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization. *J. Cell Biol.* 138: 615-28.
54. Heald R. (2000). Motor function in the mitotic spindle. *Cell.* 102: 399-402.
55. Hinchcliffe E.H. and Sluder G. (2001). "It takes two to tango": understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Dev.* 15: 1167-81.
56. Hinchcliffe E.H., Miller F.J., Cham M., Khodjakov A. and Sluder G. (2001). Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase. *Science* 291:1547-50.
57. Hinkle B., Slepchenko B., Rolls M.M., Walther T.C., Stein P.A., Mehlmann L. et al. (2002). Chromosomal association of Ran during meiotic and mitotic divisions. *J. Cell Sci.* 115: 4685-93.
58. Hoyt M.A. (2000). Exit from mitosis: spindle pole power. *Cell.* 102: 267-70.
59. Hutchins J.R., Moore W.J., Hood F.E., Wilson J.S., Andrews P.D., Swedlow J.R. and Clarke P.R. (2004). Phosphorylation regulates the dynamic interaction of RCC1 with chromosomes during mitosis. *Curr. Biol.* 14: 1099-1104.

60. Ishida S., Huang E., Zuzan H., Spang R., Leone G., West M., Nevins J.R.. (2001) Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol. Cell Biol.* 21: 4684-99.
61. Joseph J., Tan S.H., Karpova T.S., McNally J.G. and Dasso M. (2002). SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *J. Cell Biol.* 156: 595-602.
62. Joseph J., Liu S.T., Jablonski S.A., Yen T.J. and Dasso, M. (2004). The RanGAP1-RanBP2 complex is essential for microtubule-kinetochore interactions in vivo. *Curr. Biol.* 14: 611-617.
63. Kalab P., Pu R.T. and Dasso M. (1999). The Ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Curr. Biol.* 9: 481-4.
64. Kalab P., Weis K. and Heald R. (2002). Visualization of a RanGTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science* 295: 2452-2456.
65. Kalderon D., Roberts B.L., Richardson W.D., and Smith A.E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39: 499-509.
66. Karsenti E., Newport J., Hubble R. and Kirschner M. (1984). Interconversion of metaphase and interphase microtubule arrays, as studied by the injection of centrosomes and nuclei into *Xenopus* eggs. *J. Cell Biol.* 98: 1730-45.
67. Karsenti E. and Vernos I. (2001). The mitotic spindle, a self-made machine. *Science* 294: 543-7.
68. Keryer G., Di Fiore B., Celati C., Lechtreck K.F., Mogensen M., Delouvé A. Lavia P., Bornens M., and Tassin A.M. (2003). Part of Ran is associated with AKAP450 at the centrosome. Involvement in microtubule organizing activity. *Mol. Biol. Cell* 14: 4260-4271.
69. Khodjakov A. and Rieder C.L. (2001). Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression. *J. Cell Biol.* 153: 237-42.
70. Kirkpatrick D. and Solomon F. (1994). Overexpression of yeast homologs of the mammalian checkpoint gene *RCC1* suppresses the class of alpha-tubulin mutations that arrest with excess microtubules. *Genetics* 137: 381-92.
71. Kline-Smith S.L. and Walczak C.E.. (2004). Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics. *Mol. Cell* 15: 317-27.
72. Kufer T.A., Sillje H.H., Korner R., Gruss O.J., Meraldi P. and Nigg E.A.. (2002). Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J. Cell Biol.* 158: 617-23.
73. Li H.Y., Wirtz D. and Zheng Y. (2003a). A mechanism of coupling *RCC1* mobility to RanGTP production on the chromatin in vivo. *J Cell Biol.* 160: 635-44.
74. Li H.Y., Cao K. and Zheng Y. (2003b) Ran in the spindle checkpoint: a new function for a versatile GTPase. *Trends Cell Biol.* 13:553-557.
75. Li H.Y. and Zheng Y. (2004). Phosphorylation of *RCC1* in mitosis is essential for producing a high RanGTP concentration on chromosomes and for spindle assembly in mammalian cells. *Genes Dev.* 18: 512-527.

76. Liu X, Erikson RL. (2003) Polo-like kinase 1 in the life and death of cancer cells. *Cell Cycle*. 2:424-5.
77. Mattaj I.W. and Englmeier L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase *Annu. Rev. Biochem.* 67: 265-306.
78. Matunis M.J., Coutavas E. and Blobel G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the RanGTPase-activating protein RanGAP between the cytosol and the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 135: 1457-70.
79. Matynia A., Dimitrov K., Mueller U., He X. and Sazer S. (1996). Perturbations in the *sp1p* GTPase cycle of *Schizosaccharomyces pombe* through its GTPase-activating protein and guanine nucleotide exchange factor components result in similar phenotypic consequences. *Mol Cell Biol.* 16: 6352-62.
80. Mayor T., Meraldi P., Stierhof Y.D., Nigg E.A. and Fry A.M. (1999). Protein kinases in control of the centrosome cycle. *FEBS Lett.* 452: 92-5.
81. Melchior F. (2001). Ran GTPase cycle: one mechanism, two functions. *Curr. Biol.* 11: R257-60.
82. Meraldi P. and Nigg E. A. (2002). The centrosome cycle. *FEBS Lett.* 521:9-13
83. Meraldi P., Honda R., Nigg E.A. (2004). Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14: 29-36.
84. Merdes A., Ramyar K., Vechio J.D. and Cleveland D.W. (1996). A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly *Cell.* 87: 447-58.
85. Merdes A. and Cleveland D.W. (1997). Pathways of spindle pole formation, different mechanisms; conserved components. *J. Cell Biol.* 138: 953-6.
86. Merdes A., Heald R., Samejima K., Earnshaw W.C., and Cleveland D.W. (2000). Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA. *J. Cell Biol.* 149: 851-862.
87. Moore J.D. (2001). The RanGTPase and cell-cycle control. *Bioessays.* 23: 77-85.
88. Moore W., Zhang C. and Clarke, P.R. (2002). Targeting of RCC1 to chromosomes is required for proper mitotic spindle assembly in human cells. *Curr. Biol.* 12: 1442-1447.
89. Murray. A.W (1991) Cell cycle extracts. *Methods Cell Biol.* 36: 581-605.
90. Nachury M.V., Maresca T.J., Salmon W.C., Waterman-Storer C.M., Heald R. and Weis K. (2001). Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell* 104: 95-106.
91. Nemergut M.E., Mizzen C.A., Stukenberg T., Allis C.D. and Macara I.G. (2001). Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science* 292: 1540-3.
92. Nicolas F.J, Moore W..J, Zhang C. and Clarke P.R. (2001). XMog1, a nuclear ran-binding protein in *Xenopus*, is a functional homologue of *Schizosaccharomyces pombe* *mog1p* that co-operates with RanBP1 to control generation of RanGTP. *J. Cell Sci.* 114: 3013-23.

93. Nigg E.A. (2002). Centrosome aberrations, cause or consequence of cancer progression? *Nat. Rev. Cancer* 2: 815-25.
94. Nishijima H., Seki T., Nishitani H. and Nishimoto T. (2000). Premature chromatin condensation caused by loss of RCC1. *Prog. Cell Cycle Res.* 4: 145-56.
95. Nishimoto T., Eilen E., and Basilico C. (1978). Premature of chromosome condensation in a ts DNA- mutant of BHK cells. *Cell* 15: 475-83.
96. Nishitani H., Ohtsubo M., Yamashita K., Iida H., Pines J., Yasudo H., Shibata Y., Hunter T. and Nishimoto T. (1991). Loss of RCC1, a nuclear DNA-binding protein, uncouples the completion of DNA replication from the activation of cdc2 protein kinase and mitosis. *EMBO J.* 10:1555-64.
97. Ohba T., Nakamura M., Nishitani H. and Nishimoto T. (1999). Self-organization of microtubule asters induced in *Xenopus* egg extracts by GTP-bound Ran. *Science* 284: 1356-8.
98. Ohtsubo M., Okazaki H. and Nishimoto T. (1989). The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA. *J Cell Biol.* 109:1389-97.
99. Ouspenski I.I., Mueller U.W., Matynia A., Sazer S., Elledge S.J. and Brinkley B.R. (1995). Ran-binding protein-1 is an essential component of the Ran/RCC1 molecular switch system in budding yeast. *J. Biol. Chem.* 270: 1975-8.
100. Palazzo R.E., Vogel J.M., Schnackenberg B.J., Hull D.R. and Wu X. (2000). Centrosome maturation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 49:449-70.
101. Peters J. M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell.* 9: 931-43.
102. Piel M., Meyer P., Khodjakov A., Rieder C.L. and Bornens M. (2000). The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* 149: 317-330.
103. Pines J. (1999). Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat. Cell. Biol.* 1: E73-9.
104. Plafker K. and Macara I.G. (2000). Facilitated nucleocytoplasmic shuttling of the Ran binding protein RanBP1. *Mol. Cell Biol.* 20: 3510-21.
105. Plafker K. and Macara I.G. (2002). Fluorescence resonance energy transfer biosensors that detect Ran conformational changes and a Ran x GDP-importin-beta-RanBP1 complex in vitro and in intact cells. *J. Biol. Chem.* 277: 30121-30127.
106. Porter L.A. and Donoghue D.J. (2003). Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. *Prog. Cell Cycle Res.* 5: 335-47.
107. Pu R.T. and Dasso M. (1997). The balance of RanBP1 and RCC1 is critical for nuclear assembly and nuclear transport. *Mol Biol Cell.* 8: 1955-70.
108. Quimby B.B. and Dasso, M. (2003). The small GTPase Ran: interpreting the signs. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 15: 338-344.
109. Raff JW. (2002) Centrosomes and cancer: lessons from a TACC. *Trends Cell Biol.* 12: 222-5.
110. Richards S.A., Lounsbury K.M. and Macara, I.G. (1995). The C terminus of the nuclear RAN/TC4 GTPase stabilizes the GDP-bound state and mediates

- interactions with RCC1, RAN-GAP, and HTF9A/RANBP1. *J. Biol. Chem.* 270: 14405-14411.
111. Rieder C.L., Faruki S. and Khodjakov A. (2001). The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center. *Trends Cell Biol.* 11: 413-9.
112. Roig J., Mikhailov A., Belham C. and Avruch J. (2002). Ncrcl1, a mammalian NIMA-family kinase, binds the Ran GTPase and regulates mitotic progression. *Genes Dev.* 16: 1640-58.
113. Rush M.G., Drivas G. and D'Eustachio P. (1996). The small nuclear GTPase Ran: how much does it run? *Bioessays.* 18: 103-12.
114. Rush M.G. and D'Eustachio P. editors (2001). *The small GTPase Ran.* Kluwer Academic Publishers.
115. Salina D., Enarson P., Rattner J.B. and Burke B. (2003). Nup358 integrates nuclear envelope breakdown with kinetochore assembly. *J. Cell Biol.* 162: 991-1001.
116. Salus S.S., Demeter J. and Sazer S. (2002). The Ran GTPase system in fission yeast affects microtubules and cytokinesis in cells that are competent for nucleocytoplasmic protein transport. *Mol. Cell Biol.* 22: 8491-505.
117. Sawin K. E. and Mitchison T. J. (1991). Mitotic spindle assembly by two different pathways in vitro. *J. Cell Biol.* 112: 925-40.
118. Sazer S. and Nurse P. (1994). A fission yeast RCC1-related protein is required for the mitosis to interphase transition *EMBO J.* 13: 606-15.
119. Sazer S. and Dasso M. (2000). The Ran decathlon: multiple roles of Ran. *J. Cell Sci.* 113: 1111-8.
120. Schatz C.A., Santarella R., Hoenger A., Karsenti E., Mattaj I.W., Gruss O.J. and Carazo-Salas, R.E. (2003). Importin alpha-regulated nucleation of microtubules by TPX2. *EMBO J.* 22: 2060-2070.
121. Schroer T. A. (2001). Microtubules don and doff their caps: dynamic attachments at plus and minus ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 92-6.
122. Smith A.E., Slepchenko B.M., Schaff J.C., Loew L.M. and Macara I.G. (2002). Systems analysis of Ran transport. *Science* 295: 488-491.
123. Smith AE, Kalderon D, Roberts BL, Colledge WH, Edge M, Gillett P, Markham A, Paucha E, and Richardson WD. (1985). The nuclear location signal. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 226: 43-58.
124. Steggerda S.M. and Paschal B.M. (2000). The mammalian Mog1 protein is a guanine nucleotide release factor for Ran. *J. Biol. Chem.* 275: 23175-80.
125. Sugimoto K., Urano T., Zushi H., Inoue K., Tasaka H., Tachibana M. and Dotsu M. (2002). Molecular dynamics of Aurora-A kinase in living mitotic cells simultaneously visualized with histone H3 and nuclear membrane protein importin alpha. *Cell Struct. Funct.* 27: 457-67.
126. Timinszky G., Tirian L., Nagy F.T., Toth G., Perczel A., Kiss-Laszlo Z., Boros I., Clarke P.R. and Szabad J. (2002). The importin-beta P446L dominant-negative mutant protein loses RanGTP binding ability and blocks the formation of intact nuclear envelope. *J. Cell Sci.* 115: 1675-1687.

127. Tirian L., Timinszky G. and Szabad J. (2003). P446L-importin-beta inhibits nuclear envelope assembly by sequestering nuclear envelope assembly factors to the microtubules. *Eur. J. Cell Biol.* 82: 351-359.
128. Trieselmann N., Armstrong S., Rauw J. and Wilde A. (2003). Ran modulates spindle assembly by regulating a subset of TPX2 and Kid activities including Aurora A activation. *J. Cell Sci.* 116: 4791-4798.
129. Tritarelli A., Oricchio E., Ciciarello M., Mangiacasale R., Palena A., Lavia P., Soddu S. and Cundari E. (2004). p53 localization at centrosomes during mitosis and postmitotic checkpoint are ATM-dependent and require serine 15 phosphorylation. *Mol. Biol. Cell.* 15: 3751-7.
130. Troyanskaya O.G., Garber M.E., Brown P.O., Botstein D., Altman R.B. (2002) Nonparametric methods for identifying differentially expressed genes in microarray data. *Bioinformatics*; 18: 1454-61.
131. Tsai M.Y., Wiese C., Cao K., Martin O., Donovan P., Ruderman J., Prigent C. and Zheng Y. (2003). A Ran signaling pathway mediated by the mitotic Chinese Aurora A in spindle assembly. *Nat. Cell Biol.* 5: 242-248.
132. Xu S.H., Qian L.J., Mou H.Z., Zhu C.H., Zhou X.M., Liu X.L., Chen Y., Bao W.Y. (2003) Difference of gene expression profiles between esophageal carcinoma and its pericancerous epithelium by gene chip. *World J Gastroenterol* 9: 417-22.
133. Walczak C.E., Vernos I., Mitchison T.J., Karsenti E. and Heald R. (1998). A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity. *Curr. Biol.* 8: 903-13.
134. Walther T.C., Askjaer P., Gentzel M., Habermann A., Griffiths G., Wilm M., Mattaj I.W. and Hetzer M. RanGTP mediates nuclear pore complex assembly (2003). *Nature.* 424: 689-94.
135. Watanabe M., Fukuda M., Yoshida M., Yanagida M. and Nishida E. (1999). Involvement of CRM1, a nuclear export receptor, in mRNA export in mammalian cells and fission yeast. *Genes Cells* 4: 291-7.
136. Weis K. (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* 112: 441-451.
137. Wiese C., Wilde A., Moore M.S., Adam S.A., Merdes A., and Zheng Y. (2001). Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science* 291: 653-656.
138. Wilde A. and Zheng Y. (1999). Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science* 284: 1359-62.
139. Wilde A., Lizarraga S.B., Zhang L., Wiese C., Gliksman N.R., Walczak C.E. and Zheng Y. (2001). Ran stimulates spindle assembly by altering microtubule dynamics and the balance of motor activities. *Nat. Cell Biol.* 3: 221-27.
140. Wittmann T., Boleti H., Antony C., Karsenti E. and Vernos I. (1998). Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein. *J. Cell Biol.* 143: 673-85.
141. Wittmann T., Hyman A. and Desai A. (2001) The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat. Cell Biol.* 3: E28-34.

142. Wittmann T., Wilm M., Karsenti E. and Vernos I. (2000). TPX2, A novel *Xenopus* MAP involved in spindle pole organization. *J. Cell Biol.* 149: 1405-1418.
143. Xu S.H., Qian L.J., Mou H.Z., Zhu C.H., Zhou X.M., Liu X.L. et al. (2003). Difference of gene expression profiles between esophageal carcinoma and its pericancerous epithelium by gene chip. *World J. Gastroenterol.* 9: 417-22.
144. Yasuhara N., Takeda E., Inoue H., Kotera I. and Yoneda Y. (2004). Importin alpha/beta-mediated nuclear protein import is regulated in a cell cycle-dependent manner. *Exp Cell Res.* 297: 285-93.
145. Zhan F., Hardin J., Kordsmeier B., Bumm K., Zheng M., Tian E., Sanderson R., Yang Y., Wilson C., Zangari M., Anaissie E., Morris C., Muwalla F., van Rhee F., Fassas A., Crowley J., Tricot G., Barlogie B., Shaughnessy J. Jr. (2002) Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 99:1745-57.
146. Zhang C. and Clarke P.R. (2000). Chromatin-independent nuclear envelope assembly induced by Ran GTPase in *Xenopus* egg extracts. *Science.* 288: 1429-32.
147. Zhang C. and Clarke P.R. (2001). Roles of RanGTP and RanGDP in precursor vesicle recruitment and fusion during nuclear envelope assembly in a human cell-free system. *Curr. Biol.* 11: 208-12.
148. Zhang C., Hughes M. and Clarke P.R. (1999). RanGTP stabilises microtubule asters and inhibits nuclear assembly in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Sci.* 112: 2453-61.
149. Zhang C., Hutchins J.R., Muhlhauser P., Kutay U., and Clarke P.R. (2002). Role of importin-beta in the control of nuclear envelope assembly by Ran. *Curr. Biol.* 12: 498-502.
150. Zheng Y. (2004). G protein control of microtubule assembly. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20:867-94.

