



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea: Scienze biologiche

TITOLO TESI:

CCAR2 NEL RUOLO DI REGOLATORE DELLA PROGRESSIONE MITOTICA

CCAR2 IN THE ROLE OF REGULATOR OF MITOTIC PROGRESSION

Sessione di Ottobre

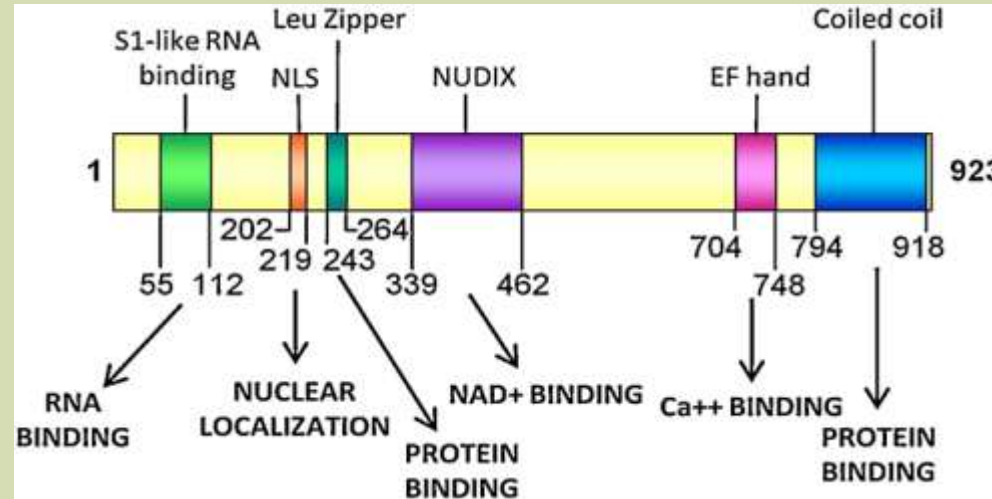
Anno Accademico 2021/2022

TESI DI LAUREA DI:
LAMBERTUCCI LARA

DOCENTE REFERENTE:
Chiar.ma Prof.ssa MARIA ASSUNTA BISCOTTI

INTRODUZIONE

CCAR2 è una proteina nucleare costituita da un singolo polipeptide di **923 aminoacidi** diviso in diversi domini funzionali.



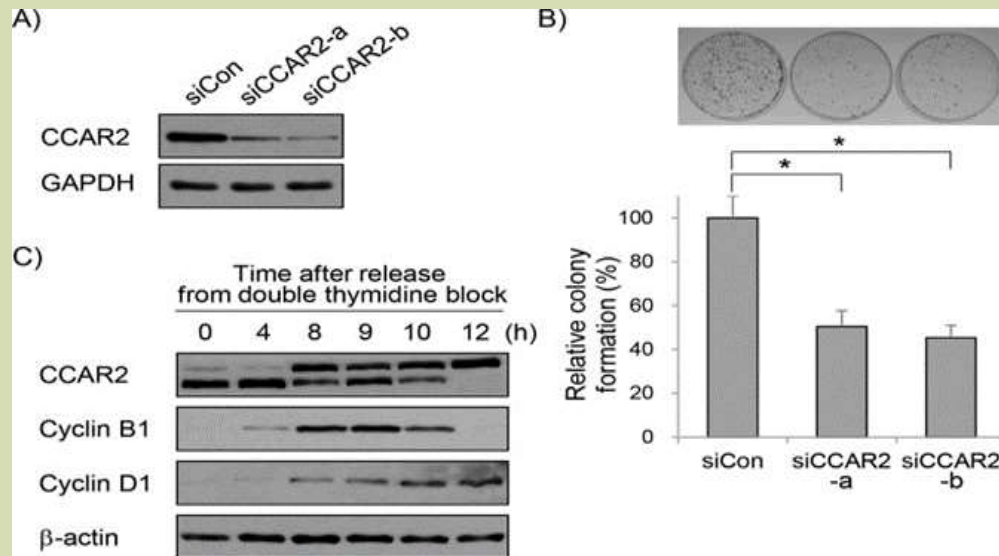
I suoi ruoli nell'ambiente cellulare sono stati ampiamente discussi, tra questi troviamo quello di **modulatore della morte cellulare** [1-2], **rimodellatore della cromatina** [3], **promotore e soppressore tumorale** [4] e di **regolatore della trascrizione** [5]. I precedenti studi hanno dedotto che CCAR2 formasse una rete funzionale con proteine responsabili della condensazione e segregazione cromosomica, anche se non si è segnalata un'interazione diretta [6]. Inoltre altri studi hanno chiarito il ruolo di DBC1 nell'attivare fattori di trascrizione implicati nella proliferazione di cellule tumorali [7]. Le sue funzioni nel promuovere la progressione cellulare in condizioni normali, però, non sono state prese in considerazione fino in fondo. Questo studio tende a mettere in risalto il suo contributo nella **regolazione mitotica** [8], che avviene a livello della condensazione, segregazione cromosomica, regolazione della chinasi AURORA B (componente del CPC [9]) e del complesso SAC.

Materiali e metodi

- **Cellule:** utilizzo di cellule tumorali di carcinoma polmonare, cellule di adenocarcinoma cervicale e fibroblasti polmonari normali inseriti nel mezzo essenziale minimo di Eagle integrato con 10% di siero bovino fetale, 100 U/ml di penicillina G sodica, 100 µg/ml di streptomina solfato e 0,25 µg/ml di amfotericina B. Le cellule sono state incubate a 37 °C in un incubatrice al 5% di CO₂.
- **Trasfezione:** metodica attraverso cui si inserisce il materiale genetico esogeno in una cellula eucariotica tramite metodo fisico o chimico. Tale materiale si lega al DNA cellulare nelle regioni complementari ad esso e ne inibisce l'espressione genica. In questo studio viene bloccata l'espressione del gene CCAR2.
- **Saggio clonogenico:** cellule piastrate ed incubate per 14 giorni, successiva rimozione del mezzo, risciacquo con PBS, fissaggio in acido acetico: metanolo (1:7 vol/vol) e infine colorate. Le cellule sono state sincronizzate con un doppio blocco di timidina prima per 19h poi per 15h per permettere loro di arrestare in fase G1/S. Alle cellule arrestate è stato poi permesso di entrare in fase S eliminando timidina con PBS.
- **Western blotting:** è una tecnica usata in biologia molecolare e cellulare per l'estrazione di proteine da una miscela di proteine complesse utilizzando la separazione per dimensione su gel di poliacrilamide, trasferimento su supporto solido e marcatura tramite anticorpo primario e secondario [10]. Gli anticorpi usati in questo studio sono anti-ciclina B1, anti-Aurora B fosforilata e non, anti-PLK, anti-CCAR2 (prodotto da coniglio immunizzato).
- **Immagini cellule:** le immagini 3D delle cellule mitotiche state acquisite tramite microscopio invertito.
- **Immunocitochimica a fluorescenza:** questa tecnica permette di confermare la presenza di una proteina in cellule in coltura e di determinarne la posizione a livello cellulare. Le cellule sono state incubate con anticorpi contro Aurora B, Aurora B-pT232, PLK1-pT210, PLK1, Mad2, BubR1, CCAR2, pericentrina, CREST a 37 °C per 20 min e poi incubate con corrispondente anticorpo secondario a 37 °C per 20 min. I nuclei sono stati controcolorati con Hoechst 33342.
- **Induzione errore di attacco:** per indurre errori nell'attacco KT-MT è stato utilizzato monastrol per 3 ore, esso promuove l'arresto nella metafase. Bloccando l'insorgenza dell'anafase, le cellule consentono al macchinario del checkpoint di correggere gli errori di attacco dei microtubuli.
- **Visualizzazione dei cromosomi:** le cellule mitotiche sono state trattate con colcemid o monastrol per bloccare la mitosi. Successivamente tali cellule, prelevate o tramite shake-off o tripsinizzazione, sono state poste in ambiente ipotonico, centrifugate e risospese più volte. Infine, sono state fatte cadere su vetrini in modo tale da provocare la rottura della membrana cellulare con conseguente uscita dei cromosomi, i quali poi sono stati colorati con Giemsa.

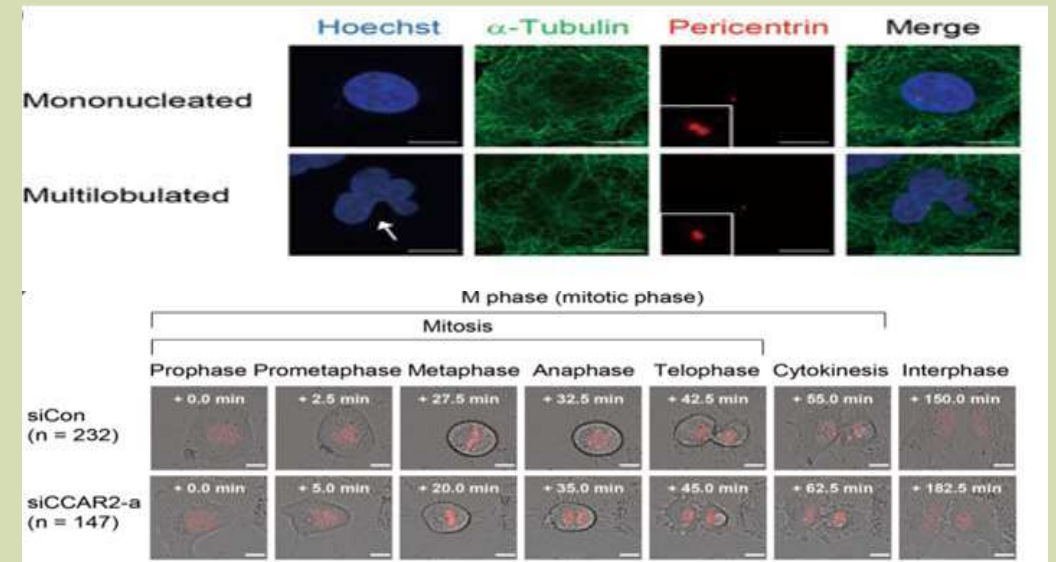
Risultati

1.1 CCAR2: promotore della proliferazione cellulare



Le cellule trasfettate (siCCAR2) presentano un deficit della proteina e una **crescita clonogenica** significativamente minore rispetto alle cellule di controllo (siCon).

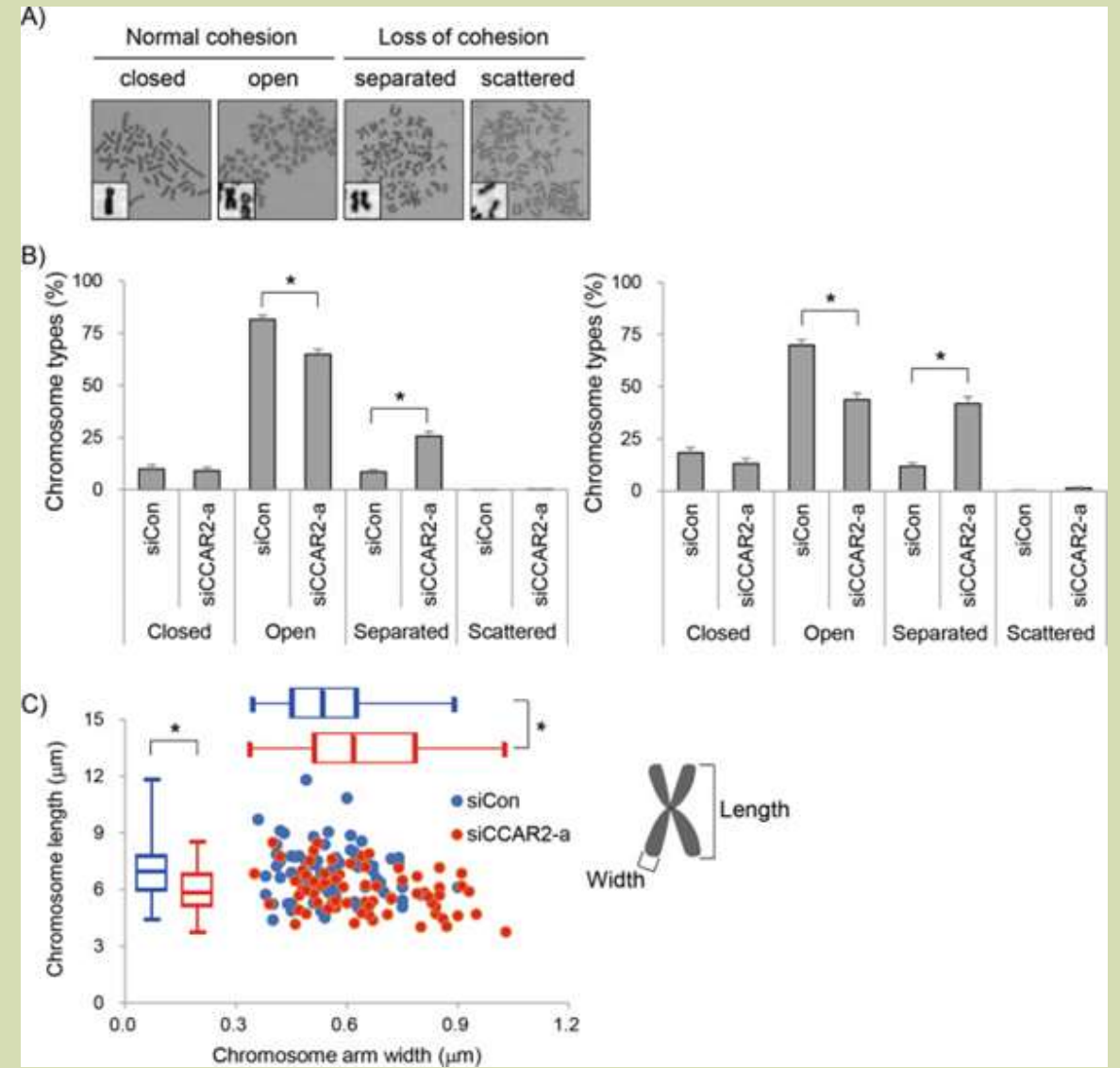
1.2 La carenza di CCAR2, possibile ostacolo della divisione cellulare



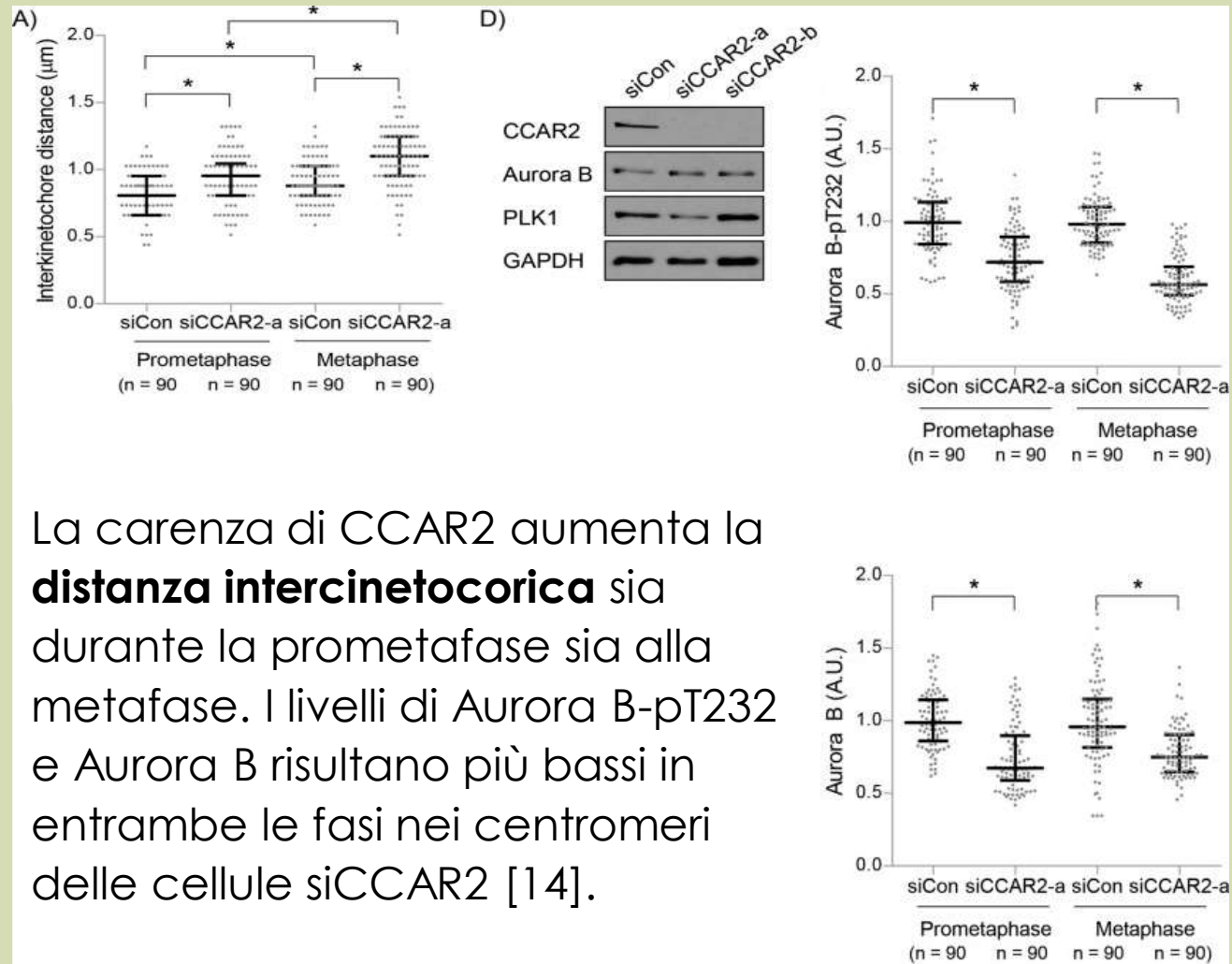
Il deficit della proteina provoca la formazione di **nuclei multilobati** nelle cellule figlie e la durata totale dalla profase alla citochinesi è stata significativamente più lunga nelle cellule siCCAR2.

1.3 CCAR2 implicato nella perdita di coesione e condensazione cromosomica

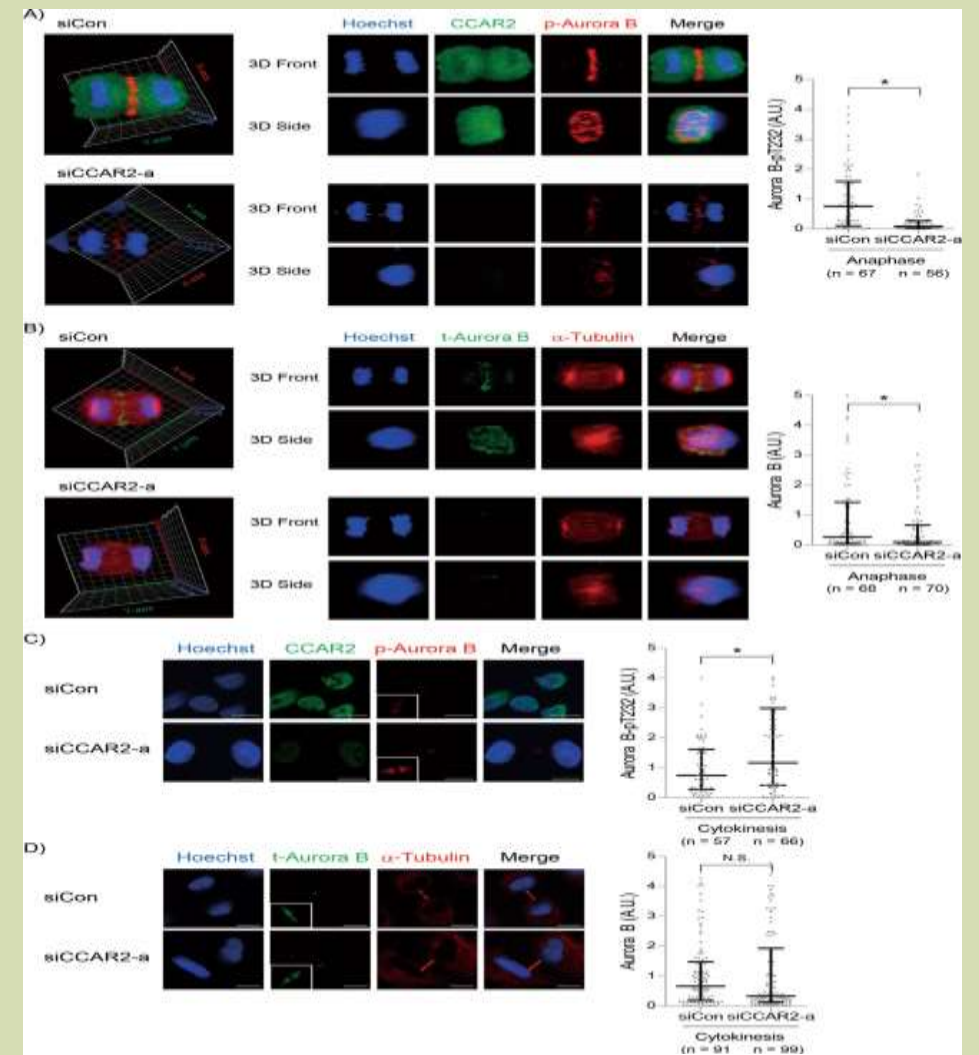
Le cellule siCCAR2 presentano una **perdita generale, prematura di coesione** e cromosomi con **bracci più larghi e più corti** [11-13].



1.4 CCAR2 e la chinasi AURORA B



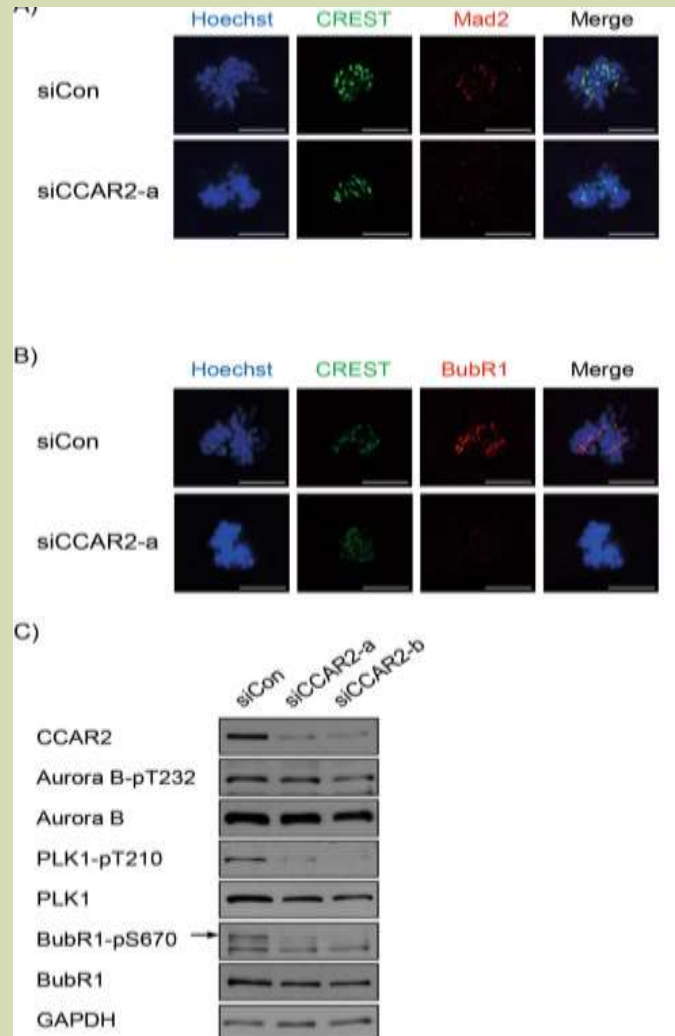
La carenza di CCAR2 aumenta la **distanza intercinetocorica** sia durante la prometafase sia alla metafase. I livelli di Aurora B-pT232 e Aurora B risultano più bassi in entrambe le fasi nei centromeri delle cellule siCCAR2 [14].



Il deficit di CCAR2 interrompe la **regolazione spaziotemporale di Aurora B** durante la mitosi tardiva [15].

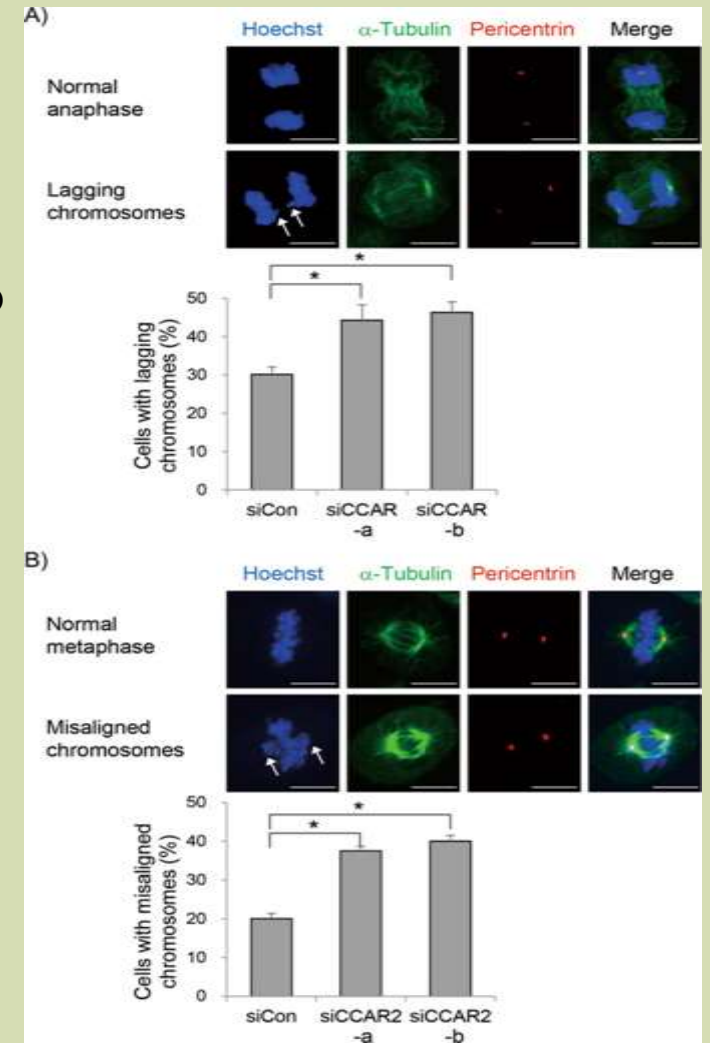
1.5 CCAR2 in relazione al complesso SAC

La non espressione di CCAR2 è responsabile dell'inattivazione del SAC, delle proteine sac-correlate **Mad2** e **BubR1** [13] e dei bassi livelli di **PLK1-pT210** e **BubR1-pS670** [16-18].



1.6 CCAR2 coinvolto nella corretta segregazione

Le cellule siCCAR2 presentano un numero elevato di cromosomi in ritardo e disallineati, probabilmente dovuto ad attacchi **merotelici** [19-20] non risolti.



Discussione

I risultati ottenuti dallo studio illustrano che CCAR2 (o regolatore del ciclo cellulare e apoptosi 2 o DBC1) è un importante protagonista dello scenario mitotico, che ne regola i diversi componenti chiave. Si è dimostrato che le cellule di controllo presentano un **picco di espressione** di CCAR2 in corrispondenza del passaggio G2/M, suggerendo il suo ruolo nella divisione cellulare e anche nel controllo dei diversi step della fase M. I cromosomi delle cellule siCCAR2 hanno un numero maggiore di bracci separati, a sostegno del fatto che DBC1 controlli la **coesione centromerica e pericentromerica** andando ad interferire con la normale funzionalità della **coesina**. Lo studio ha messo anche in luce il controllo di CCAR2 sulla **compattazione cromosomica** mediata dalla **condensina I e II** (la prima permette l'accorciamento cromosomico in larghezza, la seconda in lunghezza), il deficit della proteina ha aumentato la quantità di cromosomi con bracci più larghi e più corti. I bassi livelli di Aurora B-pT232 e Aurora B esaminati in prometafase e metafase, dimostrano un difetto nel loro reclutamento al cinetocore, responsabile dell'elevata **distanza intercinetocorica** in entrambe le fasi. Analizzando il posizionamento delle due chinasi durante la mitosi tardiva, si è constatato che Aurora B-pT232 e Aurora B sono meno concentrate nella **midzone e corteccia equatoriale del fuso** durante l'anafase, mentre alla citochinesi i livelli di Aurora B-pT232 al **midbody** [21] risultano elevati, provocando la prolungata attivazione del checkpoint di abscissione [22] e di conseguenza l'aumento della durata di citochinesi; invece quelli di Aurora B si sono dimostrati non significativamente diversi dal controllo. La chinasi posta al cinetocore è fondamentale per il controllo degli attacchi KT-MT, infatti nelle cellule siCCAR2 la sua bassa quantità induce la comparsa di cromosomi **disallineati, in ritardo** con attacchi spesso **merotelici**, l'inattivazione del SAC [23] e delle sue proteine e quindi la mancata correzione degli attacchi errati.

Referenze

1. Sundararajan, R., Chen, G., Mukherjee, C. et al. L'elaborazione caspasi-dipendente attiva l'attività proapoptotica di eliminato nel cancro al seno-1 durante la segnalazione di morte alfa-mediata dal fattore di necrosi tumorale. *Oncogene* 24, 4908–4920 (2005).
2. Zhao, W., Kruse, J.P., Tang, Y. et al. Regolazione negativa della deacetilasi SIRT1 da parte di DBC1. *Natura* 451, 587–590 (2008). H. Vaziri, S.K. Dessain, E. Ng Eaton, S.I. Imai, R.A. Frye, T.K. Pandita, L. Guarente, R.A. Weinberg
3. hSIR2(SIRT1) funziona come una deacetilasi p53 NAD-dipendente *Cell*, 107 (2001), pp. 149-159 H. Hiraieke, O. Wada-Hiraieke, S. Nakagawa, S. Koyama, Y. Miyamoto, Okay. Sone, M. Tanikawa, T. Tsuruga, K. Nagasaka, Y. Matsumoto, K. Oda, K. Shoji.
4. H. Fukuhara, S. Saji, K. Nakagawa, S. Kato, T. Yano, Y. Takefani Identificazione di DBC1 come repressore trascrizionale per BRCA1 *Fr. J. Cancro*, 102 (2010), pp. 1061-1067
5. P. Close, P. East, A.B. Dirac-Svejstrup, H. Hartmann, M. Heron, S. Maslen, A. Chariot, J. Soding, M. Skehel, J.Q. Svejstrup Il complesso DBIRD integra lo splicing alternativo dell'mRNA con l'allungamento del trascritto della RNA polimerasi II
6. Magni M, Buscemi G, Zannini L. Ciclo cellulare e regolatore dell'apoptosi 2 all'interfaccia tra risposta al danno al DNA e fisiologia cellulare. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2018 Aprile-Giugno; 776:1-9. DOI: 10.1016/j.mrrev.2018.03.004. Epub 2018 Mar 19. PMID: 29807573.
7. Giguère SS, Guise AJ, Jean Beltran PM, Joshi PM, Greco TM, Quach OL, Kong J, Cristea IM. Il profilo proteomico delle interazioni cancellate nel cancro al seno 1 (DBC1) indica una regolazione sfaccettata dell'espressione genica. *Proteomica a cellule Mol*. 2016 Mar;15(3):791-809. DOI: 10.1074/mcp. M115.054619. Epub 2015 Dicembre 9. PMID: 26657080; PMCID: PMC4813701.
8. Best SA, Nwaobasi AN, Schmults CD, Ramsey MR. CCAR2 è necessario per la proliferazione e il mantenimento del tumore nel carcinoma a cellule squamose umane. *J Invest Dermatol*. 2017 Febbraio;137(2):506-512. DOI: 10.1016/j.jid.2016.09.027. Epub 2016 ottobre 7. PMID: 27725203; PMCID: PMC5258681.
9. Il complesso cromosomico dei passeggeri (CPC): da easy rider a padrino della mitosi. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Dicembre;13(12):789-803. DOI: 10.1038/nrm3474. PMID: 23175282; PMCID: PMC3729939
10. Mahmood T, Yang PC. Western blot: tecnica, teoria e risoluzione dei problemi. *N Am J Med Sci*. 2012 Settembre;4(9):429-34. DOI: 10.4103/1947-2714.100998. PMID: 23050259; PMCID: PMC3456489
11. <https://gaz.wiki/post/it/Coesina>
12. Wood, A., Severson, A. & Meyer, B. Condensin e la complessità della coesina: il repertorio in espansione delle funzioni. *Nat Rev Genet* 11, 391–404 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrg2794>
13. Hirano T. Condensins: organizzatori universali di cromosomi con diverse funzioni. *Genes Dev*. 2012 Agosto 1;26(15):1659-78. DOI: 10.1101/gad.194746.112. PMID: 22855829; PMCID: PMC3418584.
14. <https://impactsummitasia.org/it/una-sbirciata-fina-nel-complesso-regno-della-fosforilazione-dellistone/>
15. Mierzwa B, Gerlich DW. Abscissione citocinetica: meccanismi molecolari e controllo temporale. *Dev Cell*. 2014 Dicembre 8;31(5):525-38. DOI: 10.1016/j.devcel.2014.11.006. PMID: 25490264.
16. Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, Ellston R, Haworth C, Johnson T, Mortlock A, Keen N, Taylor SS. Aurora B accoppia l'allineamento cromosomico con anafase prendendo di mira BubR1, Mad2 e Cenp-E ai cinetocori. *J Cell Biol*. 2003 Apr 28;161(2):267-80. DOI: 10.1083/jcb.200208091. PMID: 12719470; PMCID: PMC2172902.
17. Muñoz-Barrera M, Monje-Casas F. L'aumento dell'attività dell'Aurora B causa una continua interruzione degli attacchi chinetocore-microtubulo e instabilità del fuso. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Sep 23;111(38):E3996-4005. DOI: 10.1073/pnas.1408017111. Epub 2014 settembre 8. PMID: 25201961; PMCID: PMC4183290.
18. Manic G, Corradi F, Sistigu A, Siteni S, Vitale I. Molecular Regulation of the Spindle Assembly Checkpoint by Kinases and Phosphatases. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2017;328:105-161. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.08.004. Epub 2016 Oct 18. PMID: 28069132.
19. Juraj Gregan, Silvia Polakova, Lijuan Zhang, Iva M. Tolić-Nørrelykke, Daniela Cimini, Merotelic kinetochore attachment: causes and effects, *Trends in Cell Biology*, Volume 21, Issue 6, 2011, Pages 374-381, ISSN 0962-8924
20. Salmon ED, Cimini D, Cameron LA, DeLuca JG. Merotelic kinetochores in mammalian tissue cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2005 Mar 29;360(1455):553-68. doi: 10.1098/rstb.2004.1610. PMID: 15897180; PMCID: PMC1569470.
21. Mullins JM, McIntosh JR. Isolamento e caratterizzazione iniziale del midbody dei mammiferi. *J Cell Biol*. 1982 Settembre;94(3):654-61. DOI: 10.1083/jcb.94.3.654. PMID: 7130277; PMCID: PMC2112229
22. Petsalaki E, Zachos G. Il checkpoint di abscissione: un guardiano della stabilità cromosomica. *Cellule*. 29 novembre 2021;10(12):3350. DOI: 10.3390/cells10123350. PMID: 34943860; PMCID: PMC8699595. Carmena M, Wheelock M, Funabiki H, Earnshaw WC
23. Lara-Gonzalez P, Westhorpe FG, Taylor SS. Checkpoint di assemblaggio del fuso. *Curr Biol*. 2012 Nov 20;22(22):R966-80. DOI: 10.1016/j.cub.2012.10.006. PMID: 23174302.
24. Fig.1 Magni M, Buscemi G, Zannini L. Ciclo cellulare e regolatore dell'apoptosi 2 all'interfaccia tra risposta al danno al DNA e fisiologia cellulare. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2018 Aprile-Giugno; 776:1-9. DOI: 10.1016/j.mrrev.2018.03.004. Epub 2018 Mar 19. PMID: 29807573.
25. Elaborato e figure annesse dalla fig.2 alla 7 : Ryu J, Kim JE. CCAR2 controlla la progressione mitotica attraverso la regolazione spaziotemporale di Aurora B. *Cell Death Dis*. 2022 Jun 7;13(6):534. DOI: 10.1038/s41419-022-04990-8. PMID: 35672287; PMCID: PMC9174277.

Riassunto

Il ruolo di CCAR2 nella progressione mitotica in condizioni normali è stato poco studiato finora. Questo studio verte a far luce sulle sue funzioni all'interno delle varie fasi mitotiche, tenendo in considerazione i risultati ottenuti dalle precedenti ricerche riguardanti il suo contributo nella proliferazione cellulare in cellule cancerose e nella regolazione dello stato della cromatina.

DBC1 è risultato essere responsabile dell'innescio della divisione cellulare, in quanto le cellule siCCAR2 presentano una crescita clonogenica significativamente minore rispetto alle cellule siCon. La sua carenza nelle cellule promuove la formazione di nuclei multilobati e modifica la durata totale della fase M. La coesione peri-/centromerica e la compattazione cromosomica sono state notevolmente e prematuramente diminuite provocando la comparsa di cromosomi separati e con bracci più larghi e corti. I livelli di Aurora B e Aurora B-pT232 sono stati ridotti e ciò ha provocato perdita di coesione centromerica alla prometafase e metafase, mentre durante la mitosi tardiva le due chinasi sono state reclutate erroneamente nelle varie strutture del fuso. Il complesso SAC e le proteine Mad2, PLK1-pT210 e BubR1-pS670 sono stati inattivati dal deficit di CCAR2, ciò determina mancata correzione degli attacchi merotelici e comparsa di cromosomi disallineati e in ritardo all'anafase.

In conclusione, questi risultati suggeriscono che CCAR2 sia necessario per la transizione nell'ordine temporale di ogni fase mitotica regolando le strutture mitotiche e le chinasi.