

Le fasi della mitosi coincidono con cambiamenti nella morfologia dei cromosomi e dell'assetto cellulare

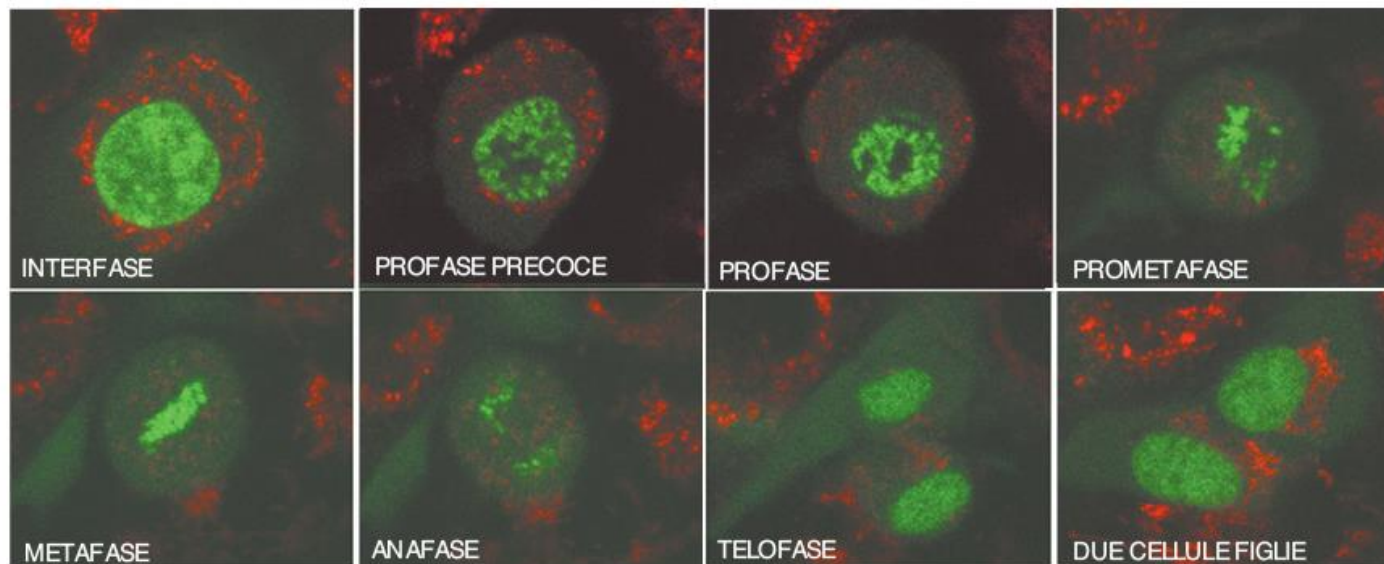
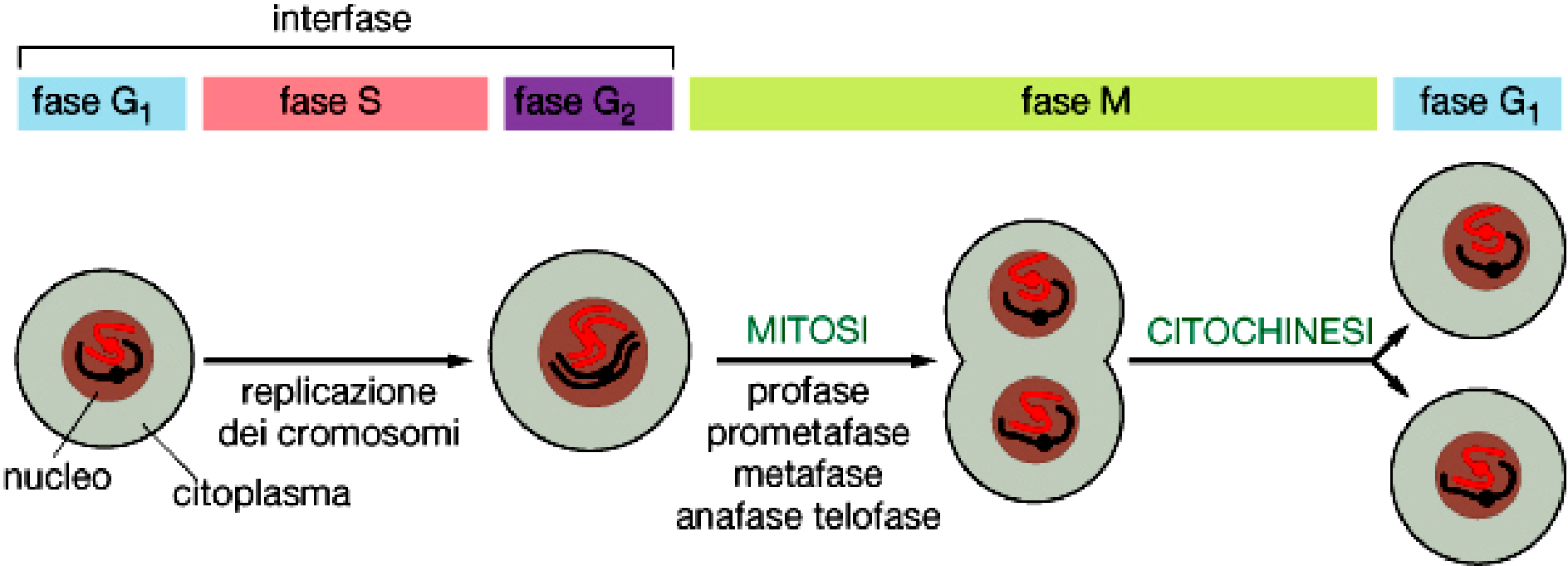


FIGURA 7.23 La microscopia confocale a fluorescenza. La tecnica del time-lapse permette di registrare l'evoluzione di un fenomeno biologico dal vivo, acquisendo ad intervalli regolari immagini dello stesso campione lungo un certo numero di ore ed ottenendo così una sequenza relativamente fluida del fenomeno studiato. In questo caso le immagini rappresentano una cellula esprime la proteina istonica H1 fusa alla GFP (Green Fluorescent Protein), una proteina fluorescente della medusa che emette una fluorescenza verde se eccitata ad una particolare lunghezza d'onda. La fusione viene eseguita a livello dei cDNA generando un nuovo gene chimero. Il gene è clonato in un vettore idoneo per l'espressione in cellule di mammifero ed introdotto all'interno delle cellule con la tecnica della microiniezione nucleare. Questa strategia permette di evidenziare indirettamente il DNA delle cellule (colore verde dell'istone che si lega al DNA). In rosso, invece sono evidenziati i mitocondri con un colorante cationico, la tetra-metil-rodamina (TMRM), che si accumula specificatamente in questi organelli attratta dal potenziale di membrana ed emette fluorescenza rossa se eccitata ad una particolare lunghezza d'onda. Le diverse fasi della mitosi sono indicate. Si osservano: il compattamento dei cromosomi in profase, l'allineamento dei cromosomi in piastra in metafase e il loro trascinamento verso i poli nell'anafase.

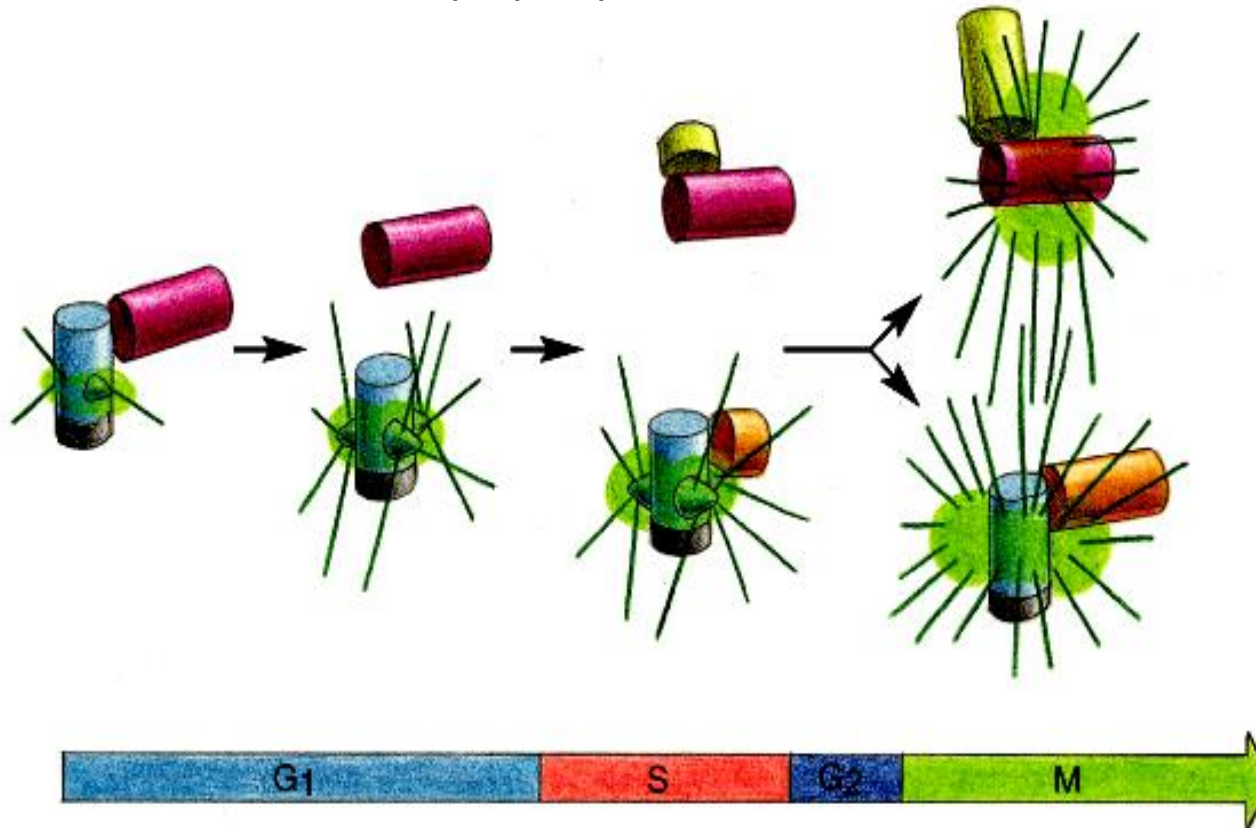
La cellula si prepara alla mitosi durante l'interfase:
1) replicazione dei cromosomi in fase S



La cellula si prepara alla mitosi durante l'interfase:

2) duplicazione del centrosoma in fase S

- La **CDK2** che innesca la replicazione del DNA nella fase **S** attiva anche la duplicazione dei centrioli;
- Durante la fase S un **centriolo figlio** inizia a crescere alla base di ogni centriolo madre. L'allungamento avviene nella fase **G2** del ciclo cellulare;
- Le due coppie di centrioli rimangono vicine fino alla **fase M** quando ciascuna coppia induce la nucleazione dei microtubuli del proprio polo del fuso mitotico.



Profase

- Nella profase ogni cromosoma è costituito da due **cromatidi fratelli** uniti tramite le **coesine** a livello dei centromeri. Le coesine sulle braccia cromosomiche vengono dissociate per fosforilazione della subunità **Scc3** (mediata dalla polo-like chinasi Plk1). La **coesina centromerica** risulta refrattaria alla fosforilazione grazie all'azione delle proteine Shugoshin e perdura fino alla metafase.
- Avviene il **compattamento** dei cromosomi iniziato da **CDK1** attraverso la fosforilazione delle **condensine**.
- **I due centrosomi** si separano per organizzare i due poli del fuso mitotico dando inizio all'assemblaggio dei microtubuli del **fuso mitotico**
- Contemporaneamente la struttura del **citoscheletro collassa** (ad opera della fosforilazione da parte di **CDK1**), la **lamina nucleare inizia a prepararsi per dissolversi** (fosforilazione da parte di **CDK1**).

Maturing Promoting Factor

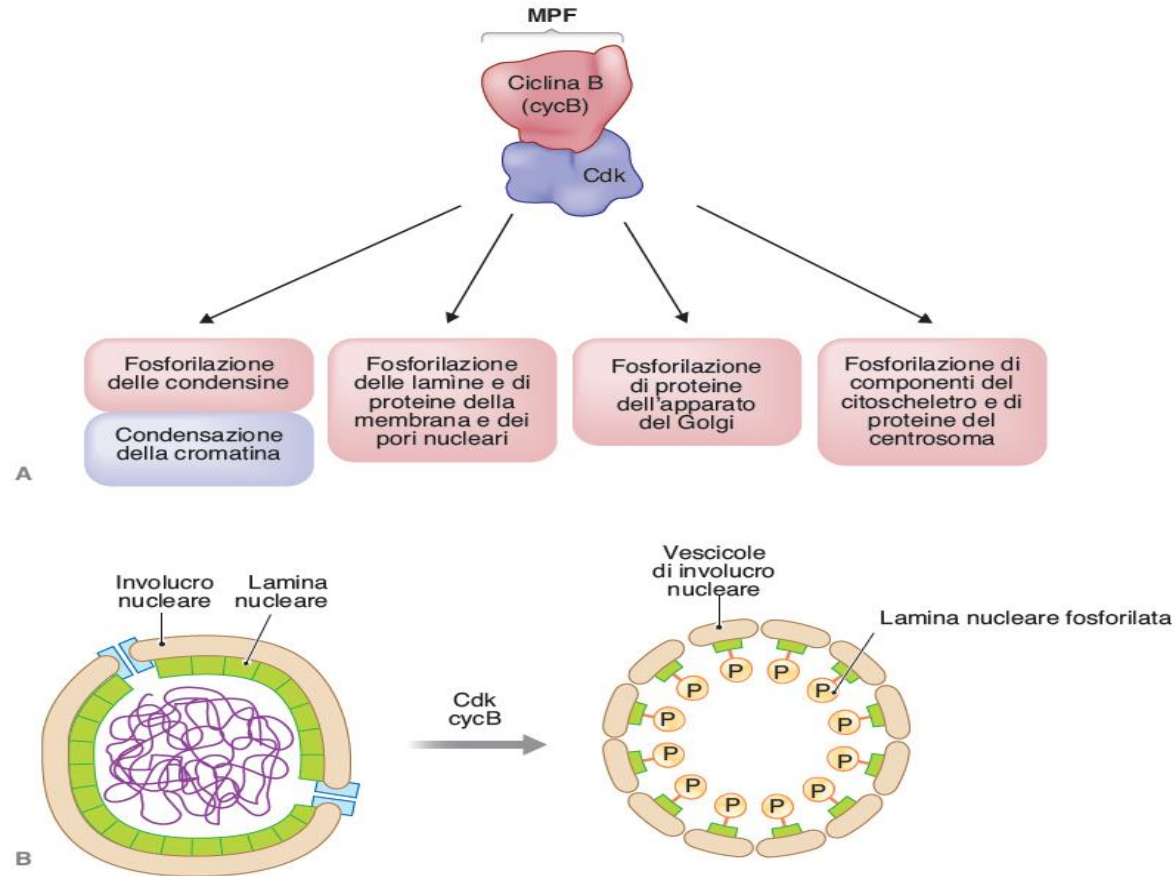
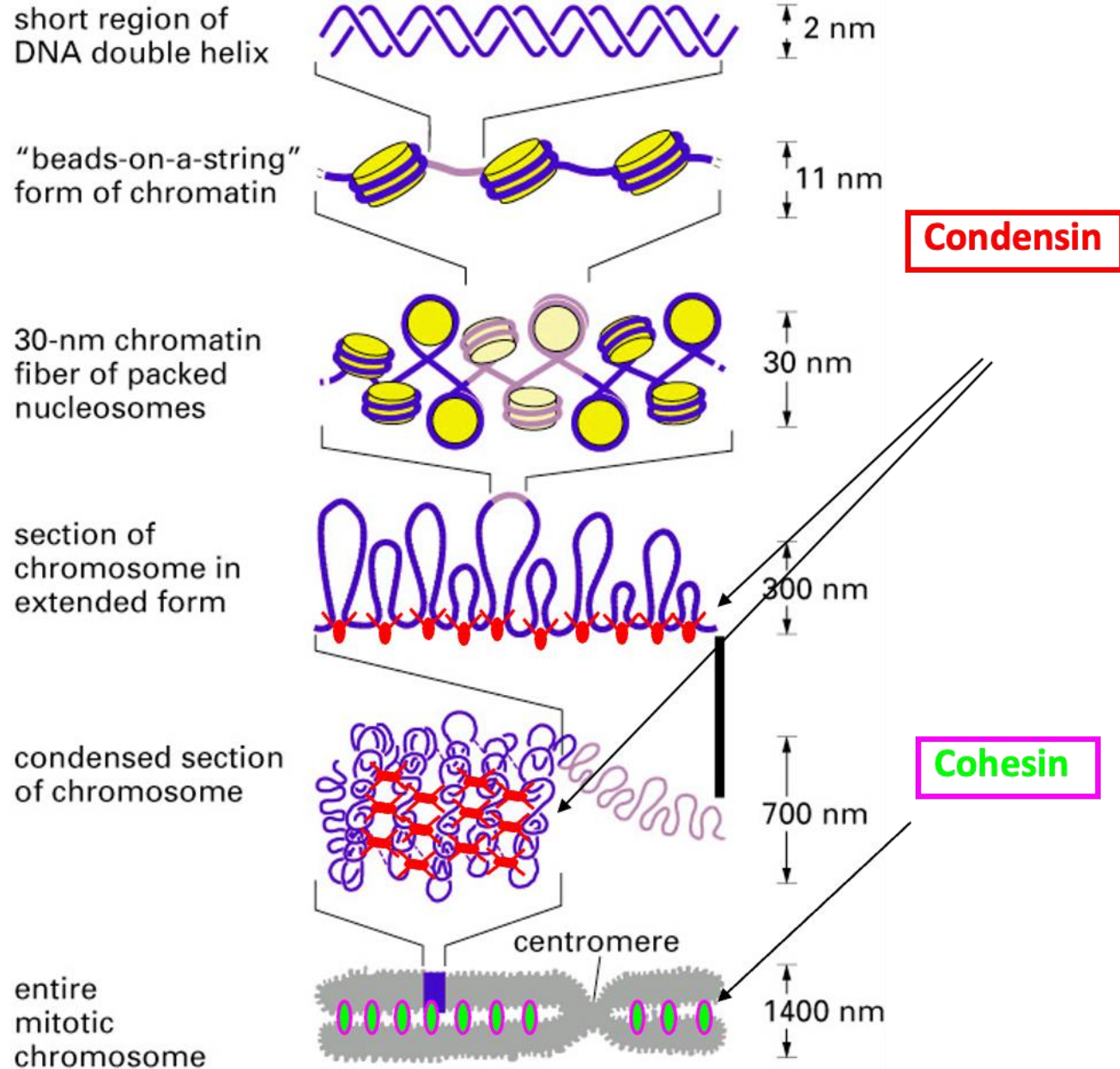


FIGURA 7.15 (A) Substrati di MPF. (B) Fosforilazione, mediata da Cdk, della lamina nucleare in mitosi e conseguente vescicolazione della stessa membrana.

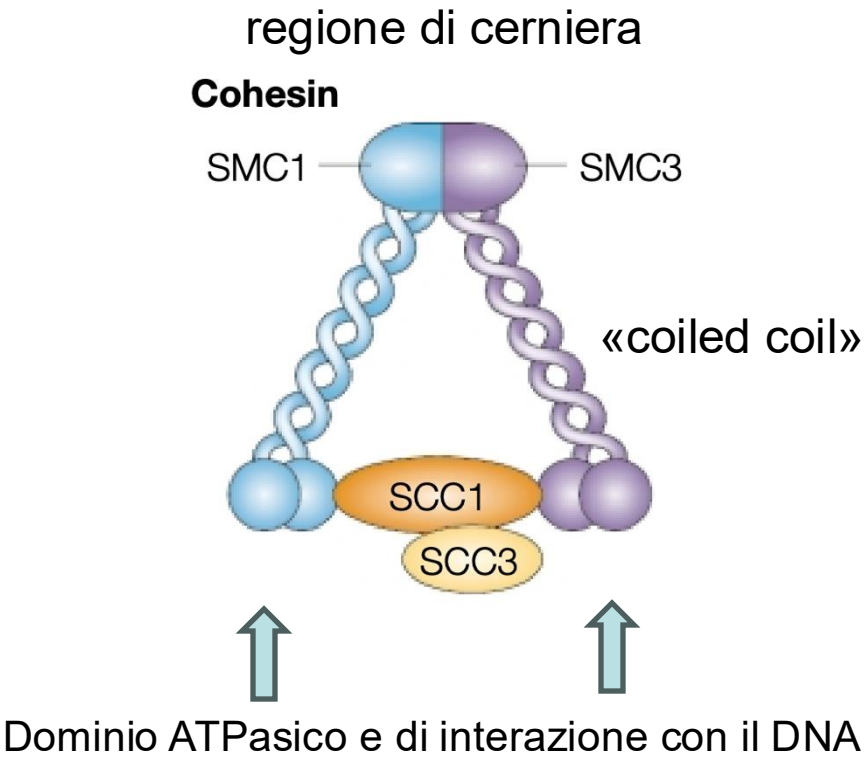


NET RESULT: EACH DNA MOLECULE HAS BEEN PACKAGED INTO A MITOTIC CHROMOSOME THAT IS 10,000-FOLD SHORTER THAN ITS EXTENDED LENGTH

Figure 4-55. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

La **coesina** è un complesso proteico composto da quattro membri che è richiesto per tenere uniti i **cromatidi fratelli** dei cromosomi appena replicati.

La coesina contiene un **eterodimero** delle proteine **SMC** (**S**tructural **M**aintenance of **C**hromosomes) **SMC1** (blu) e **SMC3** (viola), che è associato alle proteine **non-SMC** (**SCC1** (arancione) e **SCC3** (giallo))

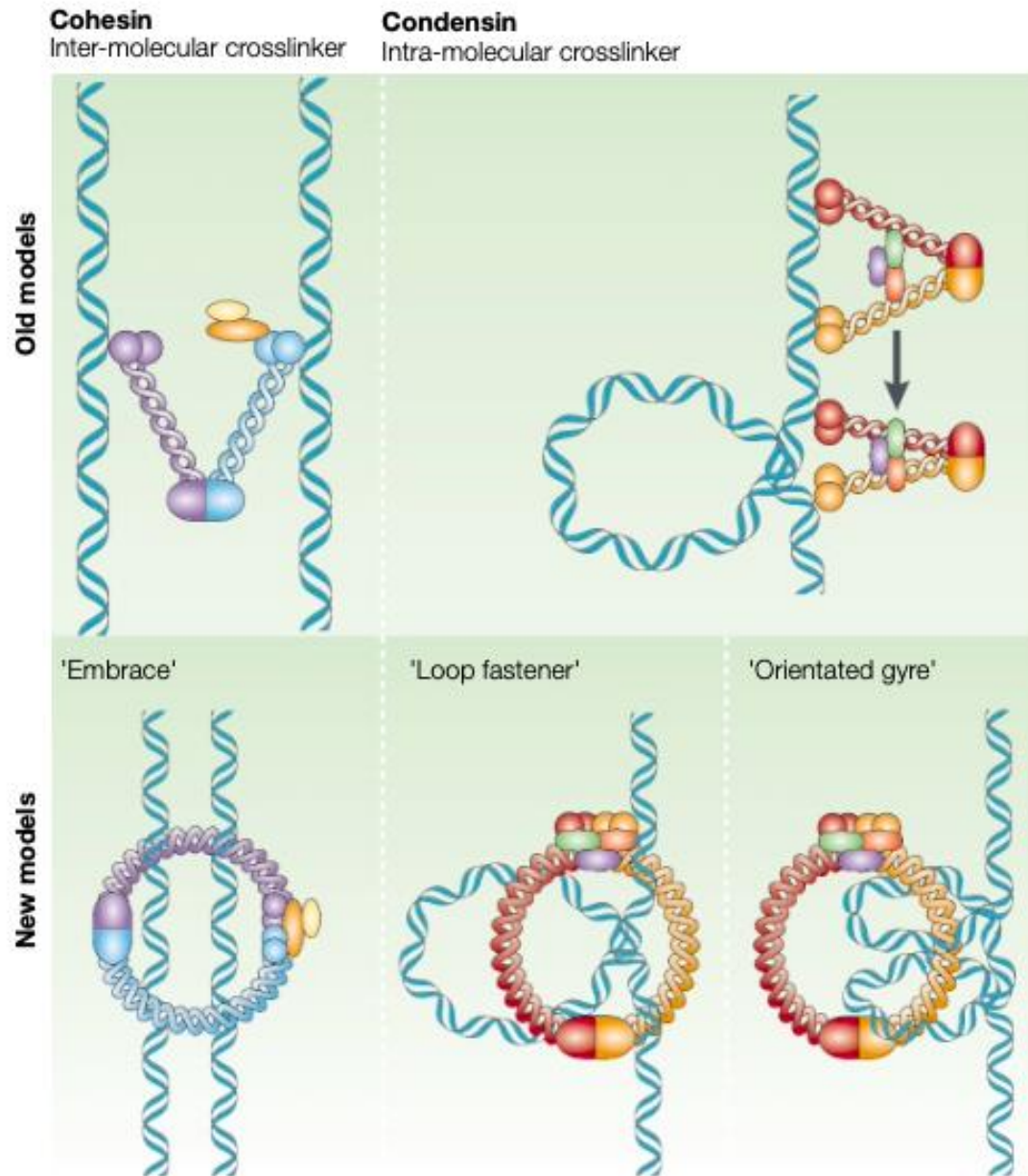


COESINA

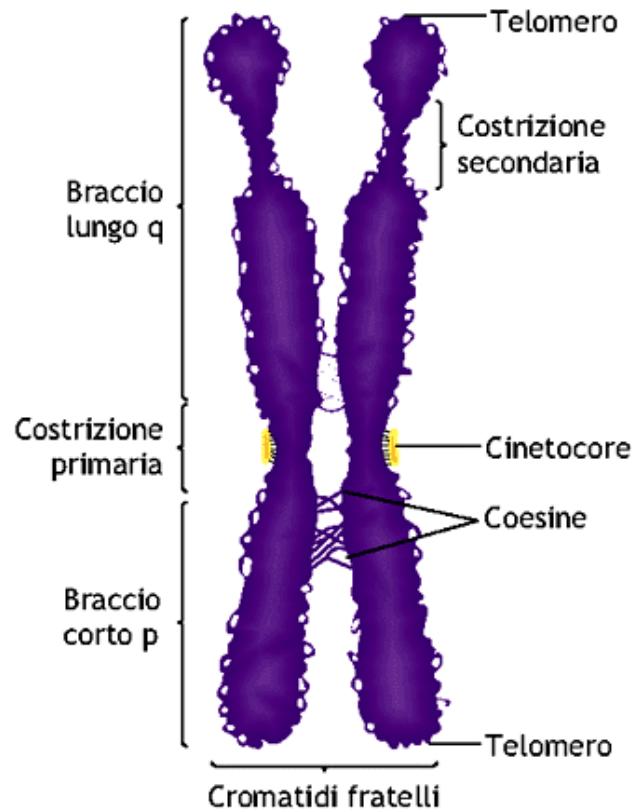
- SMC1
- SMC3
- SCC1
- SCC3

CONDENSINA

- SMC2
- SMC4
- CAP-G
- CAP-H
- CAP-D2



Cromosoma metafasico



■ **Figura 1.70 Il cromosoma metafasico.** Il cromosoma metafasico è la forma massimamente compattata della cromatina. È evidente un centromero che identifica un braccio corto (p) ed un braccio lungo (q), le estremità telomeriche e le costrizioni secondarie. Le proteine che tengono uniti i cromatidi fratelli sono dette coesine.

I cromosomi al termine della duplicazione del DNA (in preparazione per la divisione cellulare) sono costituiti da due filamenti, **cromatidi fratelli**.

1. **Centromero: costrizione primaria** che a seconda della posizione ci consente di classificarli in metacentrici (a metà), submetacentrici o acrocentrici (spostato verso le estremità) o telocentrici (terminale); i cromatidi fratelli uniti a livello del **centromero tramite le coesine**;
2. **Cinetocore:** si aggancia al fuso mitotico;
3. **Costrizione secondaria:** organizzatore del nucleolo
4. **Telomeri:** estremità dei cromosomi.

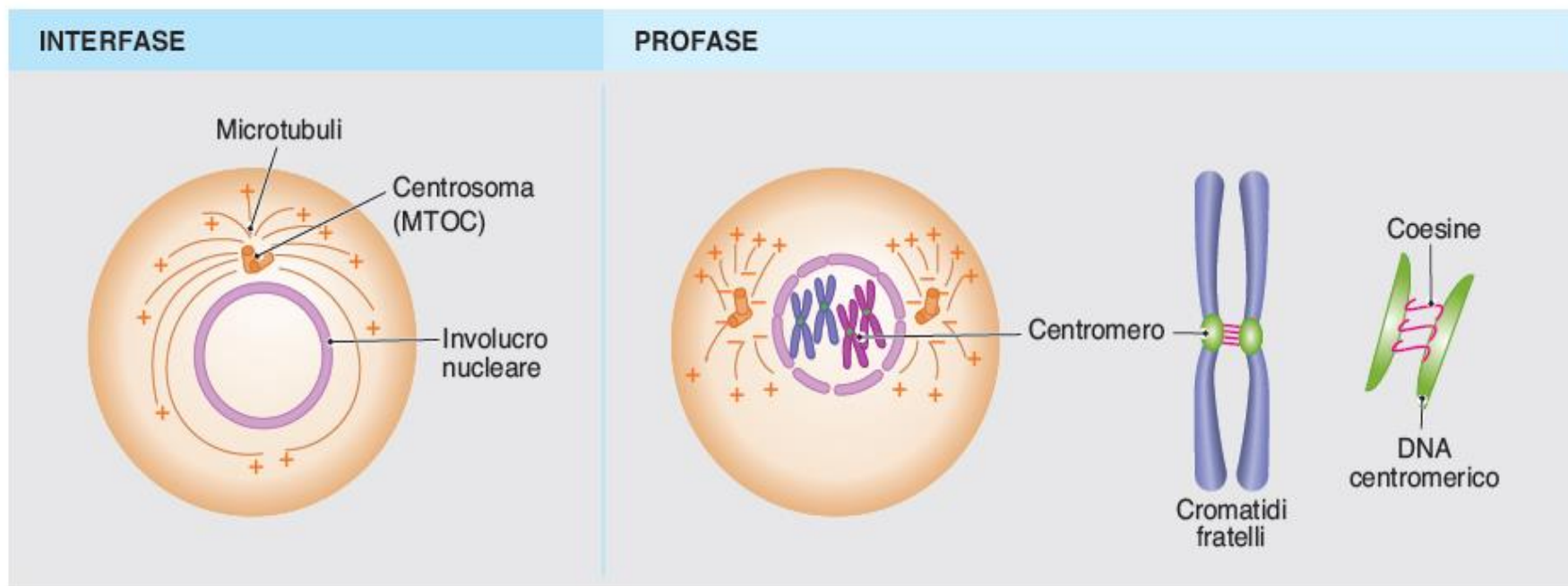


FIGURA 7.24 Differenze tra una cellula in interfase ed una in profase nell'organizzazione dei cromosomi, dei centrioli, dei microtubuli e dell'involucro nucleare. Da ricordare la polarità dei microtubuli con la distribuzione ordinata delle estremità positive lontane dai centrioli. L'ingrandimento illustra l'interazione tra i cromatidi fratelli che si esplica a livello del centromero attraverso il coinvolgimento della coesina.

Prometafase

- L'avvio della **prometafase** coincide con la frammentazione della membrana nucleare
- Il citoscheletro si riorganizza e i microtubuli vanno ad organizzare il **fuso mitotico** formato da:
 - ✓ **Fibre astrali** che vanno dal polo verso il **cortex** e che contribuiscono all'allungamento del fuso che viene trascinato verso la periferia
 - ✓ **Fibre cinetocore** che si legano al **cinetocore** e che sono fondamentali per la separazione dei cromosomi
 - ✓ **Fibre interpolari** che partono dai poli del fuso e si sovrappongono all'equatore portano ad allungamento del fuso per allontanare i cromosomi

Prometafase

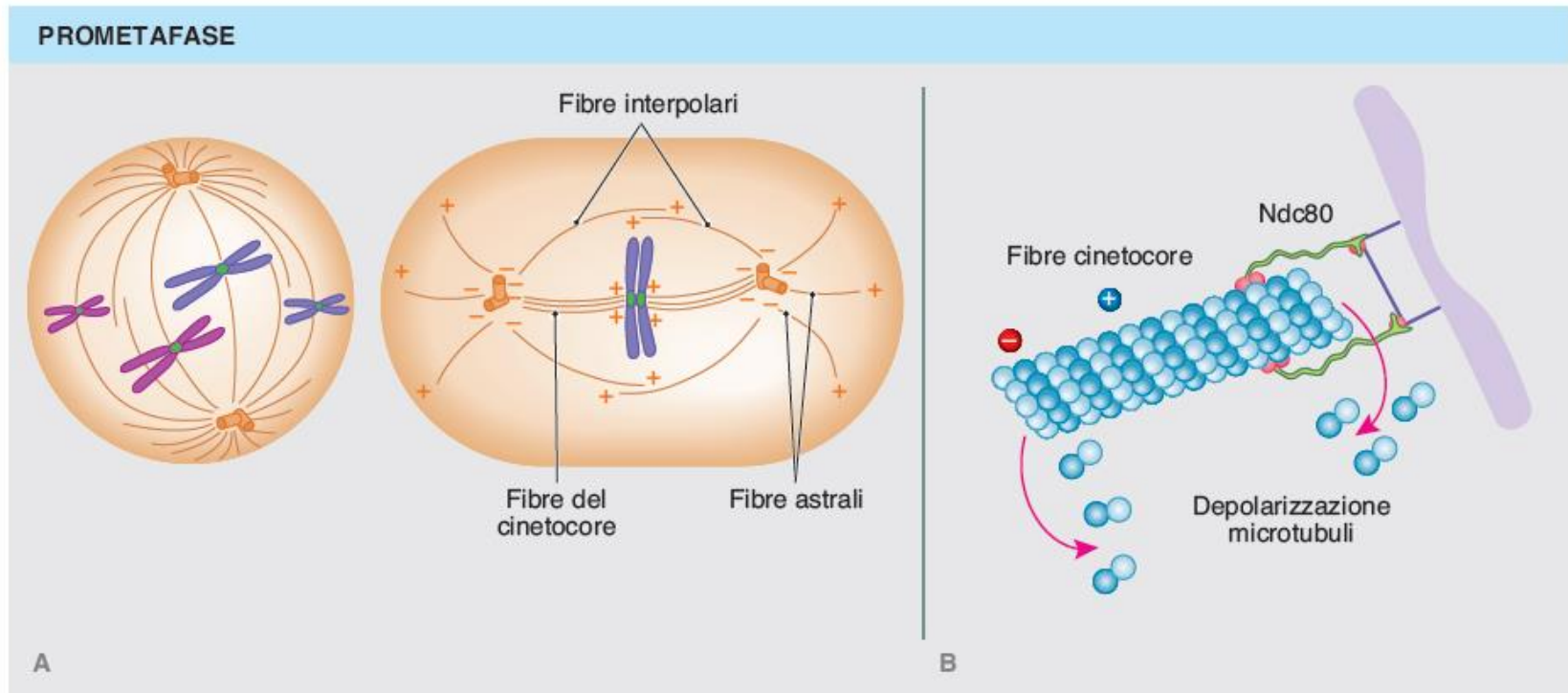
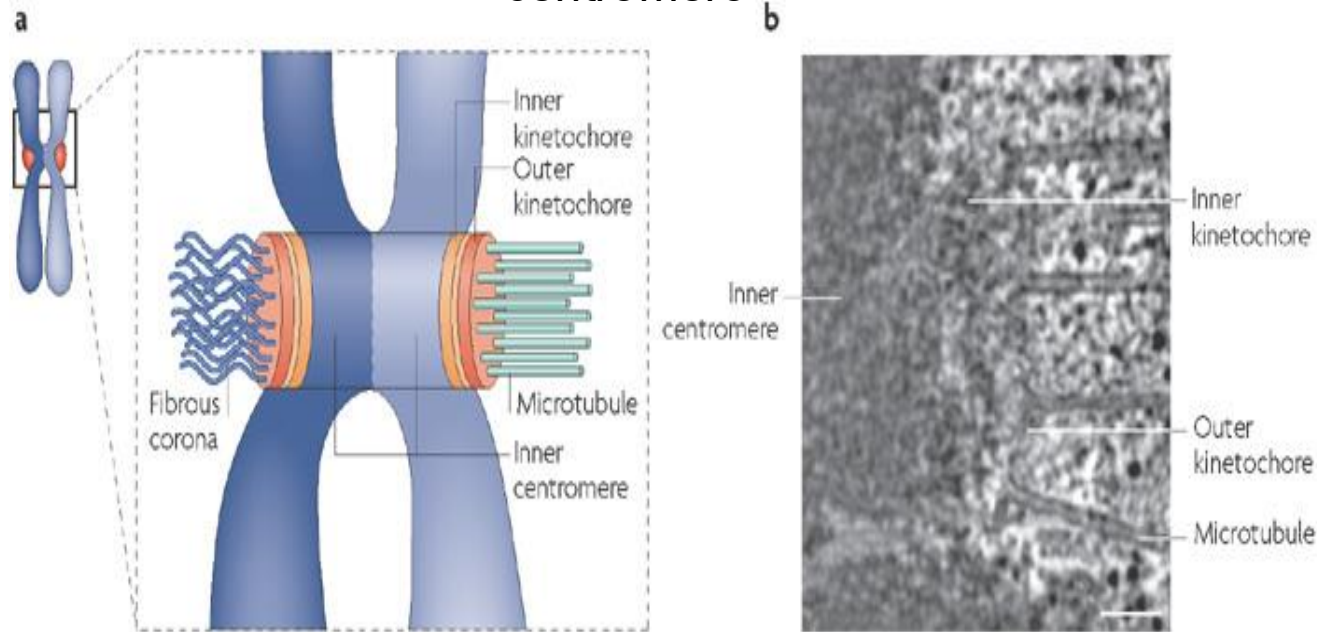


FIGURA 7.25 (A) Cambiamenti nell'organizzazione dei cromosomi e dei microtubuli nella cellula in prometafase. Viene evidenziato il fuso mitotico nelle sue diverse componenti. Dai poli del fuso, formati dai due centrioli si dipartono: le fibre del cinetocore, che entrano in contatto con i cromosomi a livello dei centromeri, le fibre astrali, che mediano i rapporti con il cortex cellulare, e le fibre interpolarì, che stabiliscono contatti con i microtubuli provenienti dal polo opposto del fuso. **(B)** Il complesso Ndc80 media l'interazione tra cinetocori ed estremità (+) dei microtubuli.

Fibre del cinetocore si legano al **cinetocore**, una placca proteica nel centromero



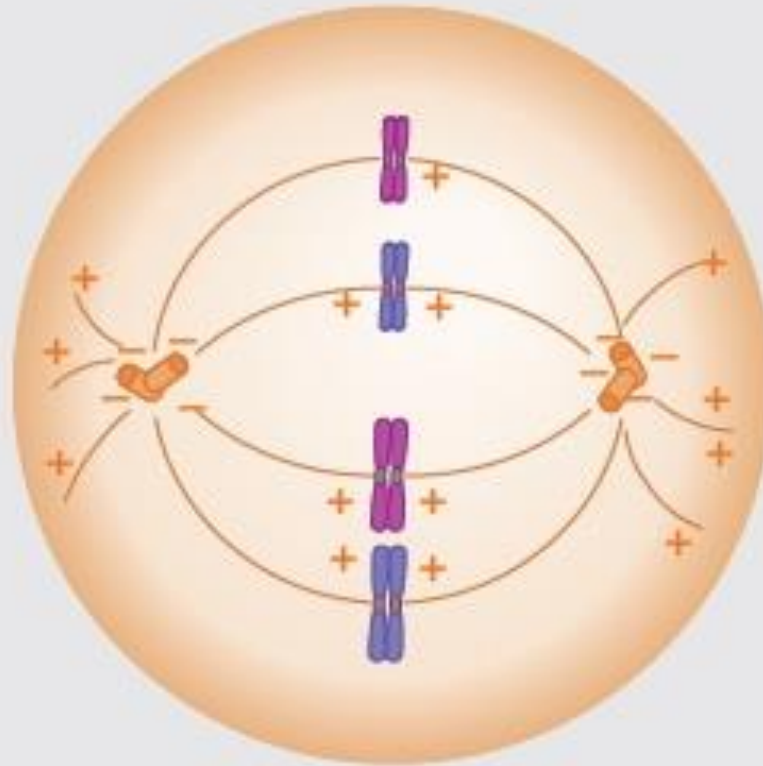
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

<https://doi.org/10.1038/nrm2310>

Schema di un cromosoma mitotico con cromatidi fratelli appaiati: il cromatide a destra è attaccato ai microtubuli (il numero dipende dalla specie) e il cromatide a sinistra è staccato. Sono evidenziati il cinetocore interno, il cinetocore esterno, il centromero interno e la corona fibrosa, che è rilevabile sul cinetocore staccato. b | **Micrografia elettronica di un cinetocore umano).**

Metafase

METAFASE



Metafase

- I cromosomi sono allineati in posizione mediana rispetto ai due poli del fuso
- In questa fase i cromatidi fratelli sono ancora tenuti insieme dalle coesine mentre **le fibre del fuso tendono a separarli**
- **Attivo il checkpoint** che assicura che il fuso sia pronto e che tutti i cromosomi siano sul fuso
- Se tutto è in regola viene attivato **l'Anaphase Promoting Complex (APC)** e si passa all'anafase

APC causa degradazione della securina che blocca le separasi (proteolizzano le coesine)

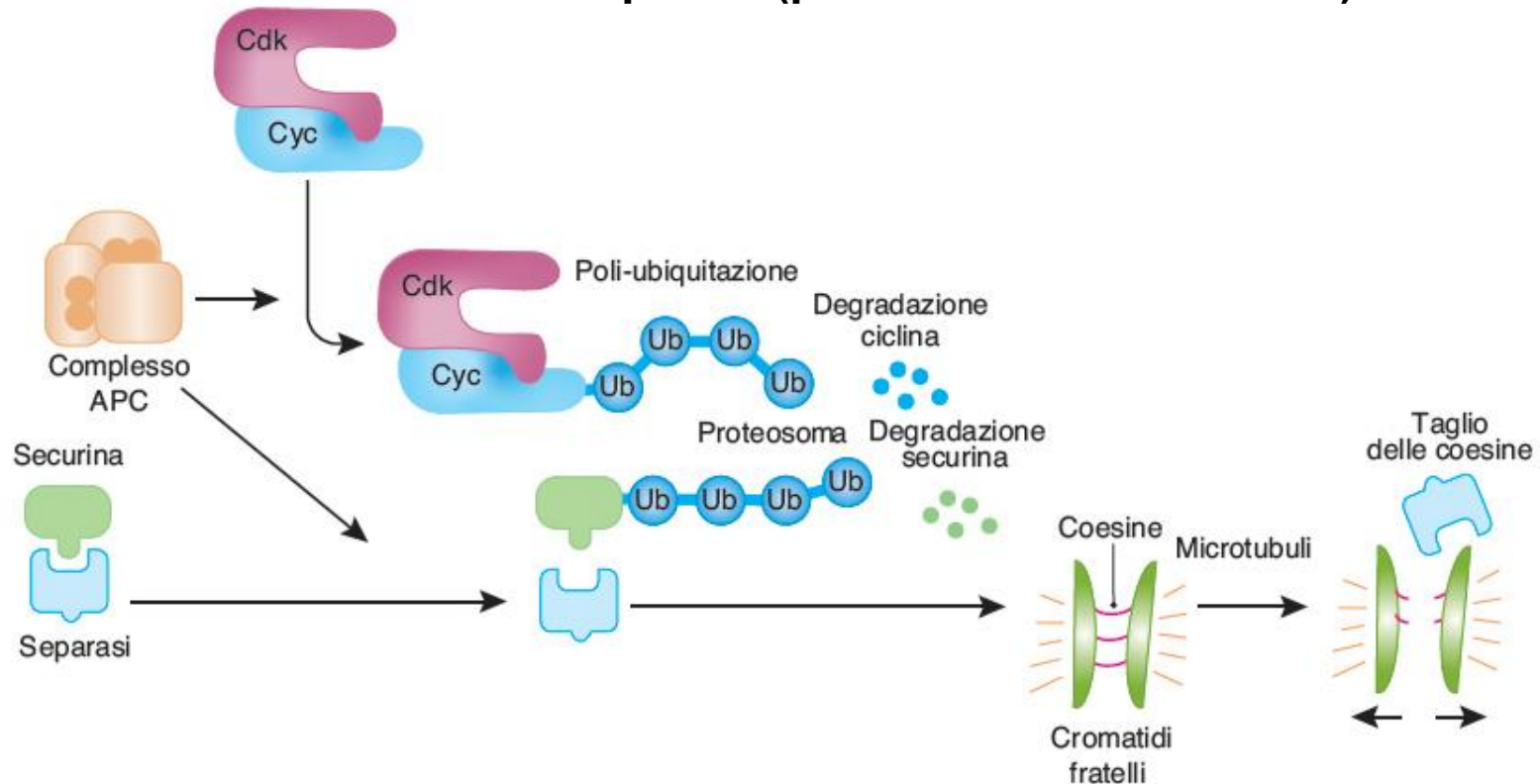


FIGURA 7.27 Le funzioni degradative del complesso multiproteico APC/C. Attività E3-ligasi presenti in APC/C poli-ubiquitinano la ciclina B e ne promuovono la degradazione via proteosoma. Un'altra proteina degradata dal proteosoma dopo la poli-ubiquitinazione mediata da APC/C è la securina, l'inibitore della separasi. La degradazione della securina libera la separasi che può proteolizzare le coesine che ancora tengono uniti i cromatidi fratelli a livello dei centromeri. Ha inizio l'anafase.

Anafase

- APC: induce la degradazione delle coesine
- APC: induce degradazione della ciclina B e pertanto inibizione di CDK1
- I cromatidi fratelli si separano e migrano verso le estremità del polo

https://www.youtube.com/watch?v=L61Gp_d7evo

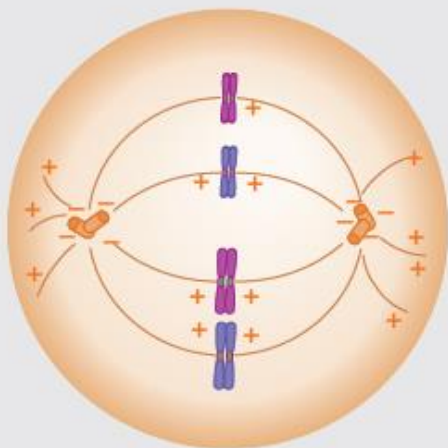
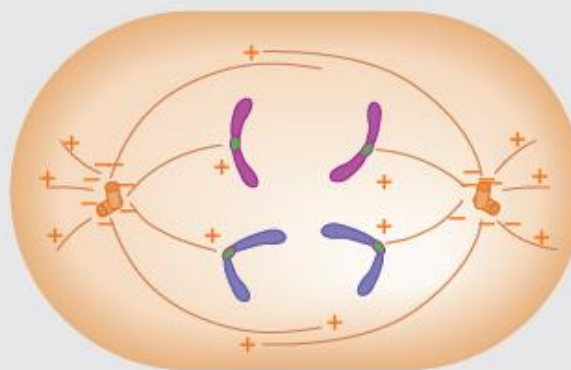
METAFASE**ANAFASE**

FIGURA 7.26 Cambiamenti nella distribuzione dei cromosomi in metafase ed anafase. In metafase i cromatidi fratelli, ancora uniti dalla coesina, sono posizionati in piastra metafasica. Con l'anafase ha inizio la corsa dei cromatidi fratelli verso i poli opposti del fuso.

ANAFASE A: SI ACCORCIANO LE FIBRE DEL CINETOCORE

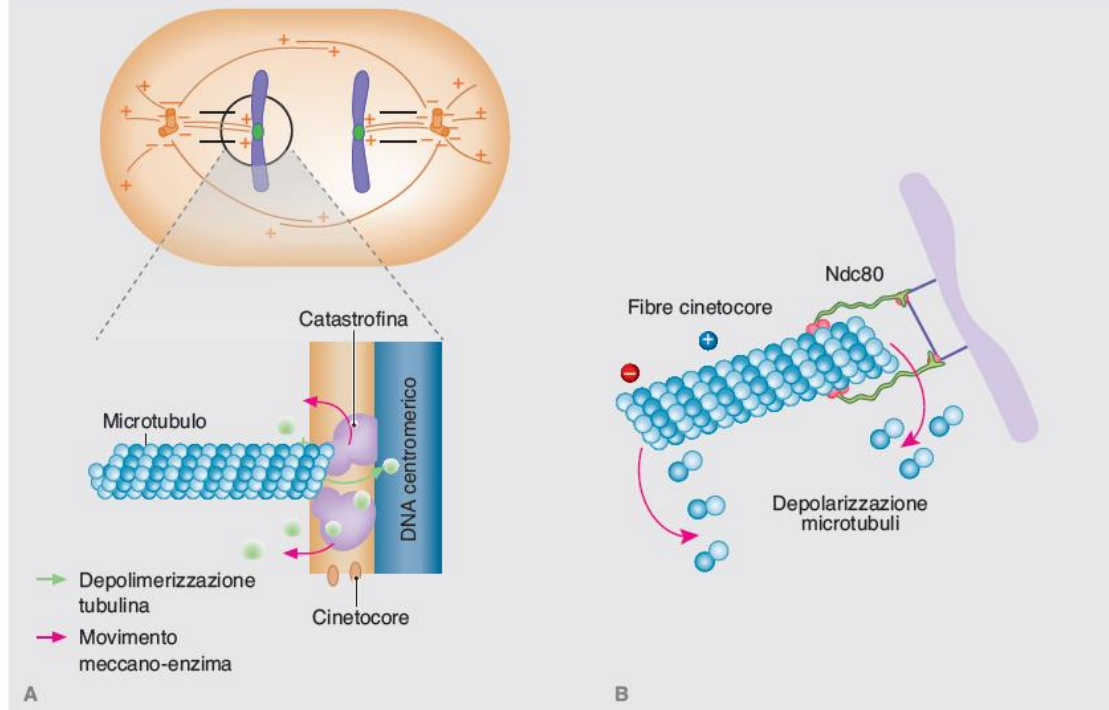


FIGURA 7.28 (A) L'organizzazione del fuso mitotico ed i principali mecano-enzimi coinvolti nella ri-organizzazione del fuso stesso durante la progressione della mitosi. Le frecce indicano la direzionalità del movimento dei mecano-enzimi. **(B)** La depolimerizzazione delle fibre del cinetocore. Ndc80 che lega lateralmente i microtubuli lo fa attraverso legami multipli a bassa affinità che si riformano in continuazione seguendo la depolimerizzazione dei microtubuli e, di conseguenza, trascinando i cromosomi.



R. Alessandro, C. Bucci, S. Fasano
Manuale di Biologia e Genetica
 per il semestre filtro, V Ed.
 Edises Edizioni

La "catastrofina" (famiglia delle **Kinesine-13**) **accelera drasticamente la depolimerizzazione** dei microtubuli, un processo fondamentale per questo accorciamento.

ANAFASE B: SI ALLUNGANO LE FIBRE INTERPOLARI

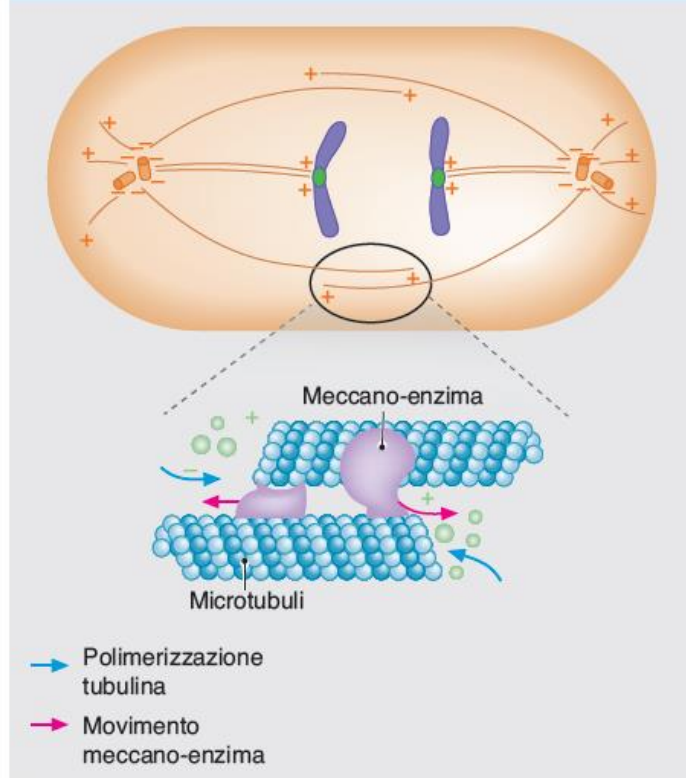


FIGURA 7.29 I cambiamenti nei microtubuli e l'azione dei meccano-enzimi nell'anafase B. I poli opposti del fuso si allontanano e la cellula si allunga. L'ingrandimento evidenzia i cambiamenti a livello della zona equatoriale di sovrapposizione delle fibre interpolarì. La freccia → rimarca la polimerizzazione della tubulina all'estremità positiva delle fibre interpolarì. La freccia → mette in risalto l'azione dei meccano-enzimi sui microtubuli sovrapposti favorendo lo slittamento delle fibre interpolarì e l'allungamento del fuso.

Telofase

- Ogni cromatidio fratello si è portato alle due opposte regioni della cellula
- **Si riforma la membrana nucleare** con i pori nucleari
- Gli organelli che si erano frammentati per consentire equa distribuzione tra le cellule figlie, si organizzano nella struttura interfase
- I cromosomi gradualmente si decondensano
- Inizia ad invaginarsi la membrana plasmatica **perpendicolarmente all'asse del fuso** in una zona equidistante dai poli della cellula

TELOFASE

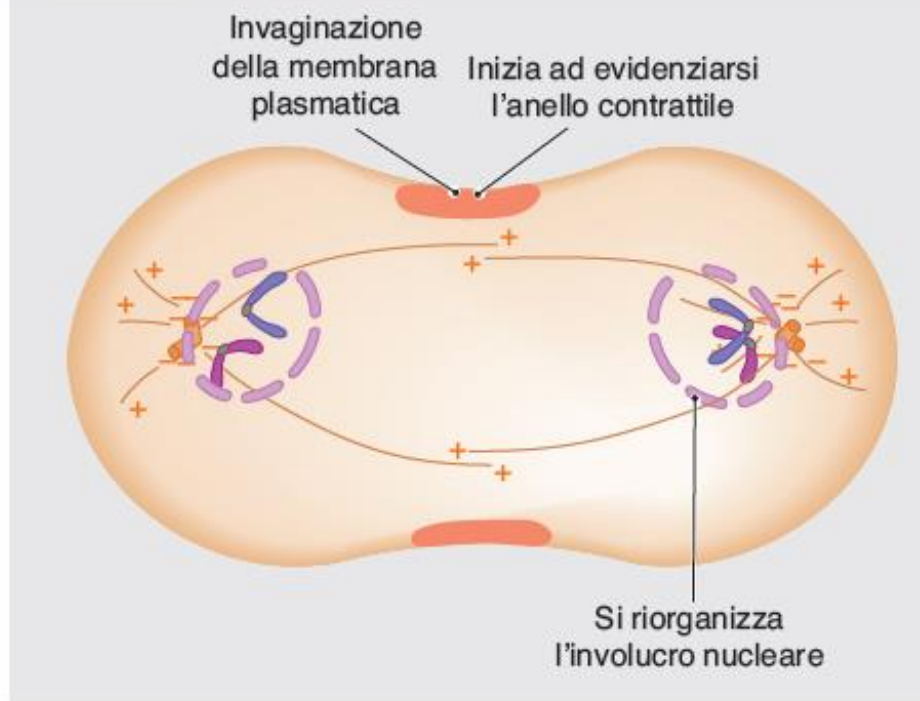


FIGURA 7.31 Cambiamenti della distribuzione dei cromosomi in telofase. Presso un'invaginazione della membrana plasmatica, nella zona equatoriale, si incomincia ad organizzare l'anello contrattile.

Citodieresi

- Il **solco** che si è iniziato a formare durante la telofase continua ad invaginarsi perpendicolarmente all'asse che separa i due poli del fuso
- L'anello contrattile (**actina e miosina**) causerà la contrazione del citoplasma e la divisione in due della cellula

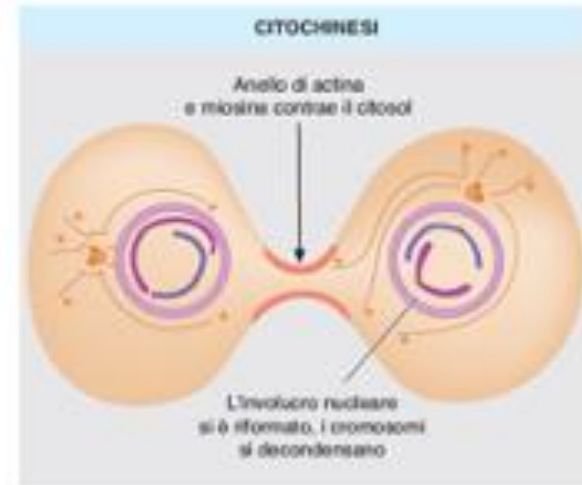


FIGURA 7.32 (A) Nella citochinesi l'azione continua dell'anello contrattile provoca la separazione in due del citoplasma che fissa la formazione di due nuove cellule. Attorno ai due poli del fuso, dove sono giunti al termine della loro corsa i cromosomi, si riorganizza l'involucro nucleare.

La dinamica degli organuli durante la mitosi varia a seconda del tipo di organulo

Mitocondri: I mitocondri si riproducono per scissione. Poiché il loro numero è alto, al momento della citodieresi vengono equamente distribuiti tra le due cellule figlie

Reticolo endoplasmatico: è ancorato **al** citoscheletro. Mentre il fuso si allunga in anafase B, il RE viene **tirato** verso i due poli, garantendo che ci sia materiale di RE in entrambe le metà cellulari. **si divide poi passivamente** durante la citochinesi

Apparato del Golgi: si frammenta e si distribuisce tra le cellule figlie. Ciò avviene in seguito a fosforilazione da parte delle chinasi della mitosi. I frammenti si associano al fuso che li trasporta ai due poli e quindi alle cellule figlie

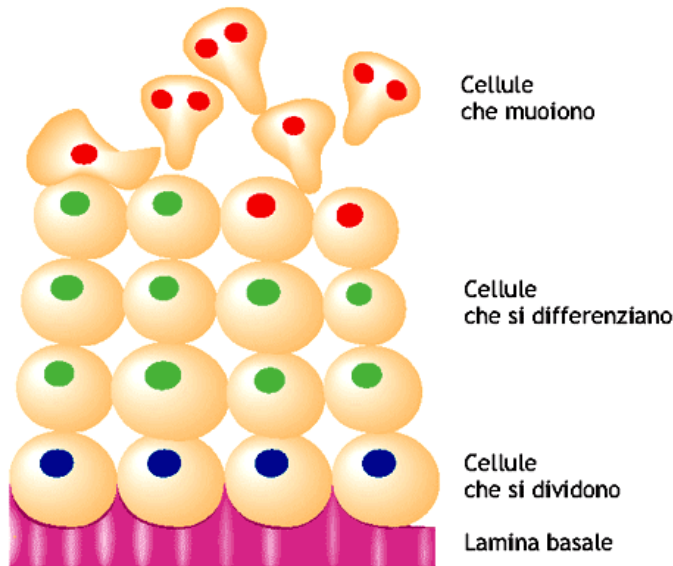
Lisosomi e endosomi: il rifornimento nelle cellule figlie avviene tramite fusione con endosomi tardivi che contengono nuovo materiale enzimatico.

Nucleolo: Durante la fase M, quando i cromosomi si condensano, il nucleolo scompare. Nella telofase, quando i cromosomi si decondensano, le regioni dei cromosomiche che contengono i geni degli rRNA riformano piccoli nucleoli, che poi si fondono per formarne uno solo in ciascuna cellula figlia.

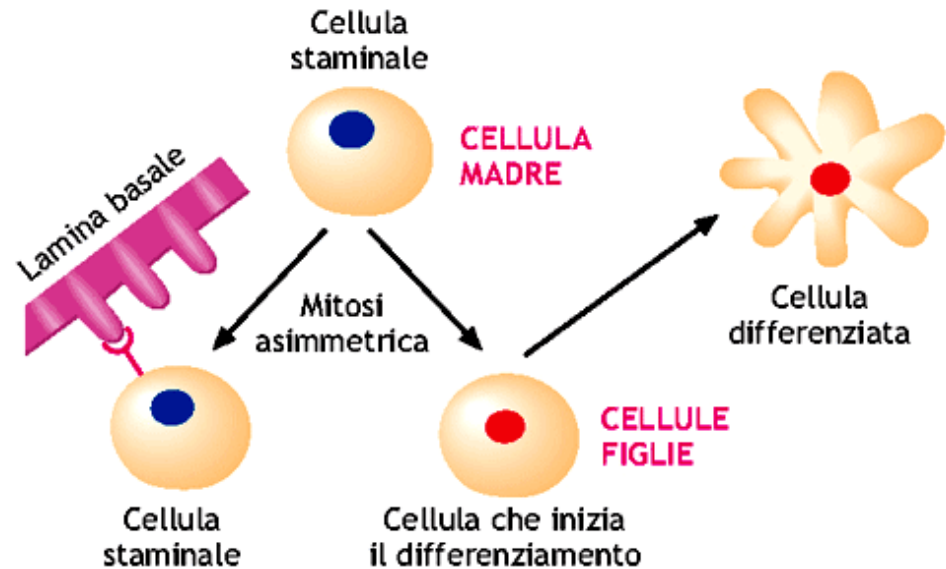
Come avviene la mitosi asimmetrica?

- La cellula presenta un asse (apicale- basale) lungo il quale si ha diversa distribuzione dei componenti della cellula
- Allineamento del fuso mitotico con asse di polarità della cellula in modo che vengano distribuiti diversamente.
- Come avviene questa distribuzione differenziale? Le ipotesi suggeriscono che l'ancoraggio possa essere guidato da segnali esterni (come la matrice extracellulare o le cellule vicine) o da interazioni con il citoscheletro corticale.
- *ESEMPIO: Numb (proteina che regola endocitosi presente sul lato interno della membrana cellulare) (si accumula su lato basale)*
- *perché nella porzione apicale è presente PAR3 a cui si lega aPKC (proteina chinasi C atipica) che fosforila Numb promuovendone il distacco*
- *non si sa cosa determini l'accumulo di PAR3 nella porzione apicale*

Come si mantiene inalterato il numero (pool) di cellule staminali?



■ **Figura 7.4** Esempio di un tessuto ad elevato ricambio come, ad esempio, la nostra pelle. Cellule nello strato più a contatto con la lamina basale sono in attiva proliferazione e si dividono continuamente. Negli strati superiori si consolida il programma differenziale, mentre negli strati apicali le cellule infarcite di cheratina e proteine accessorie svolgono un'azione protettiva che terminerà con la loro morte ed il distacco.



■ **Figura 7.5** Esempio di mitosi asimmetrica in una cellula staminale.