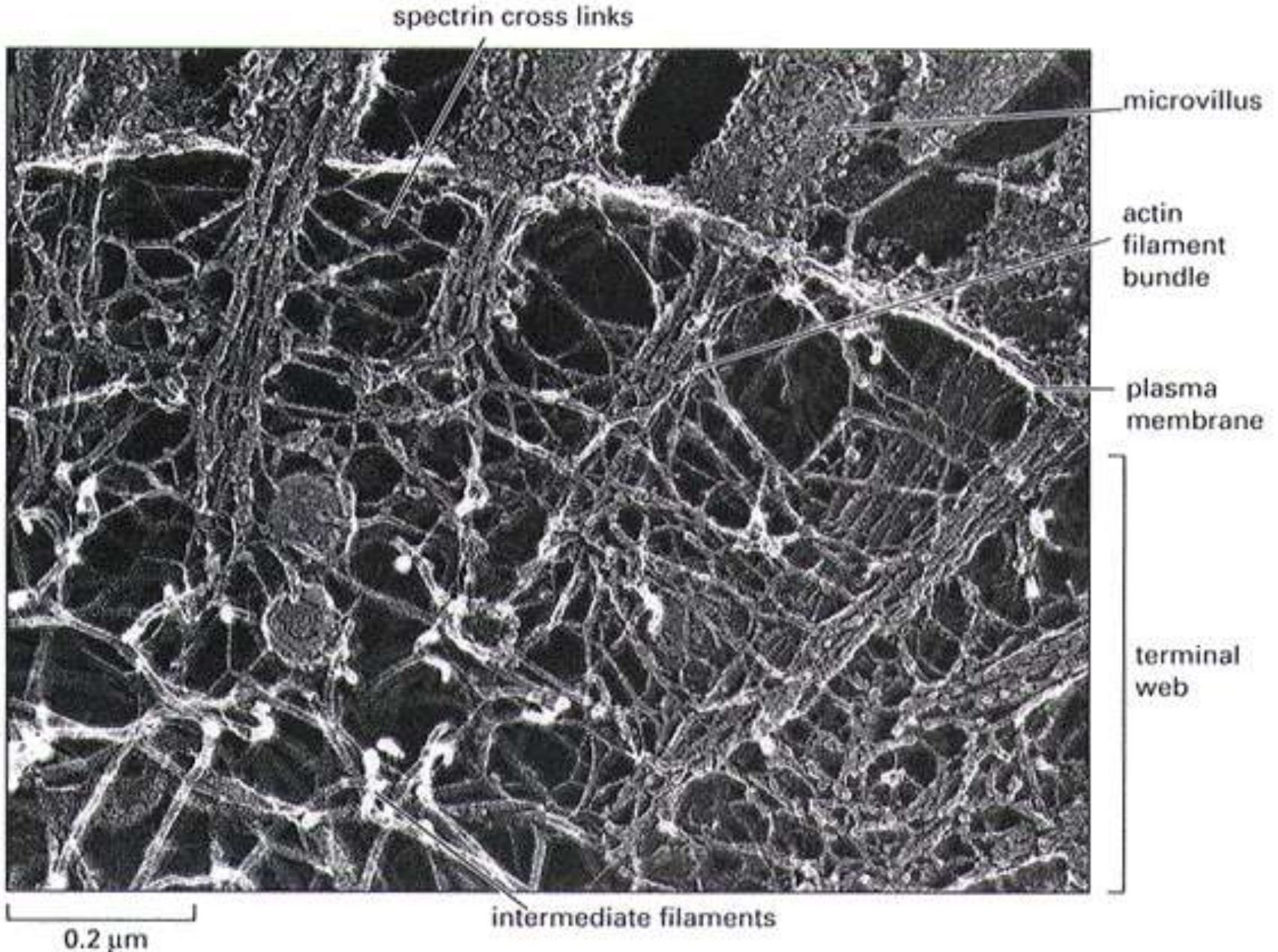


IL CITOSCHELETRO



IL CITOSCHELETRO DI UNA CELLULA E' COSTITUITO DA UNA VARIETA' DI STRUTTURE FILAMENTOSE



CITOSCHELETRO: *Sistema di filamenti che svolge funzioni spaziali e meccaniche nella cellula*

- media l'organizzazione spaziale delle cellule
- ne mantiene la forma corretta (animale)
- permette i cambiamenti di forma e il movimento (es. spermatozoi)
- media il riarrangiamento dei componenti interni durante la crescita e la divisione cellulare
- esercita una trazione sui cromosomi allontanandoli durante la mitosi
- taglia la cellula in divisione in due
- spinge e guida il traffico intracellulare di organelli
- sostiene la membrana plasmatica
- guida la crescita della parete cellulare vegetale

Le diverse funzioni del citoscheletro si basano sul comportamento di tre famiglie di proteine che si assemblano a formare tre tipi principali di filamenti; ciascun tipo di filamenti ha proprietà meccaniche distinte e una dinamica diversa, ma certi principi fondamentali sono comuni a tutti.

Tre tipi di filamenti del citoscheletro sono comuni a molte cellule eucariotiche:

1. Filamenti intermedi: forniscono forza meccanica e resistenza agli stress
2. Microtubuli: determinano le posizioni degli organelli e dirigono il trasporto intracellulare
3. Filamenti di actina: determinano la forma della superficie cellulare e sono necessari per la locomozione dell'intera cellula

Proteine accessorie: sono essenziali per l'assemblaggio controllato dei filamenti del citoscheletro, comprendono i *motori proteici* che muovono gli organelli o i filamenti stessi.

Differenze nelle forze che tengono unite le subunità determinano differenze cruciali nella stabilità e nelle proprietà meccaniche dei singoli filamenti.

CIASCUN TIPO DI FILAMENTO E' UN POLIMERO

MONOMERO

POLIMERO

actina	>	>	microfilamenti
tubulina	>	>	microtubuli
diverse proteine	>	>	filamenti intermedi

Filamenti di Actina

- Polimeri elicoidali a 2 filamenti della proteina ACTINA
- Strutture flessibili
- 5-9nM
- Fasci lineari
- Reti bidimensionali
- Gel tridimensionali

(c) Microfilaments (actin)

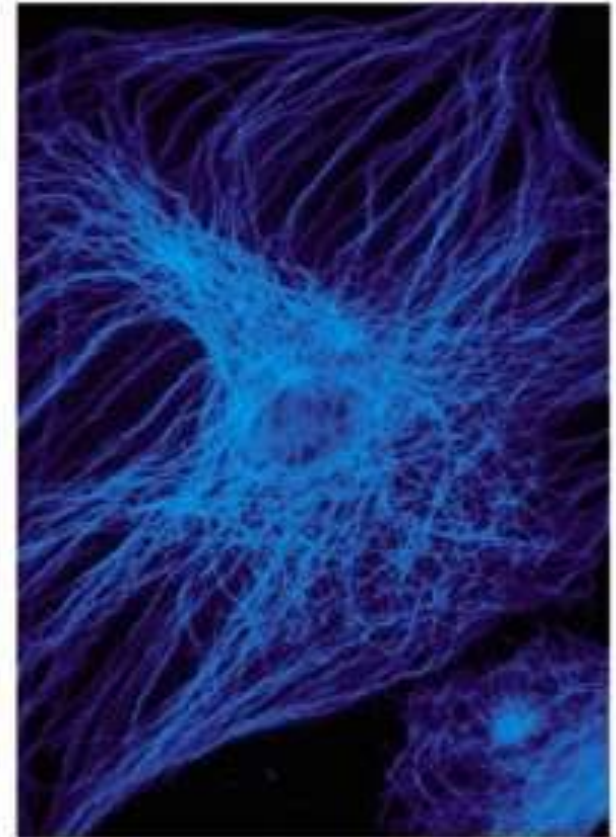


Microtubuli

- Cilindri cavi
- Unità: tubulina (alfa e beta)
- 25nM
- Rigidi
- MTOC: centrosoma

si definisce centrosoma (MTOC - MicroTubule Organizing Center) una struttura non membranosa posta vicino al nucleo e circondata da una massa amorfa di materiale pericentriolare, preposta alla formazione, alla demolizione e all'organizzazione dei microtubuli della cellula.

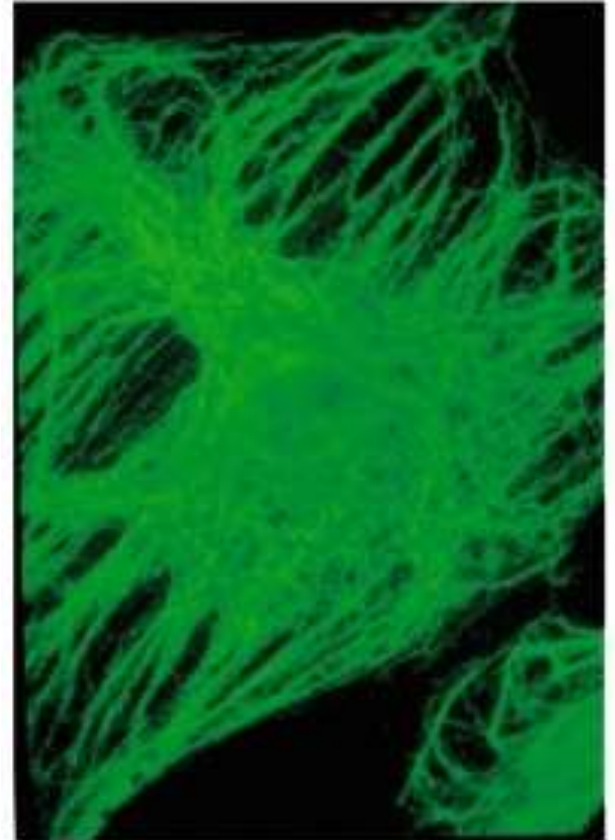
(b) Microtubules (tubulin)

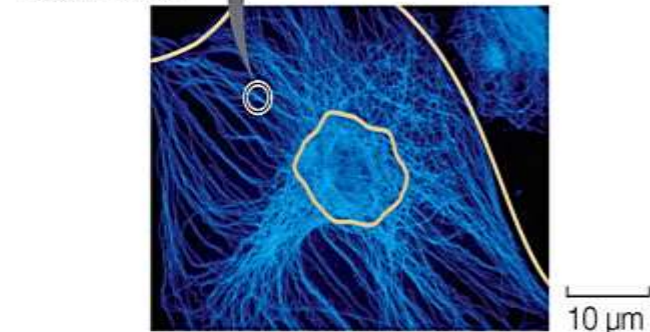
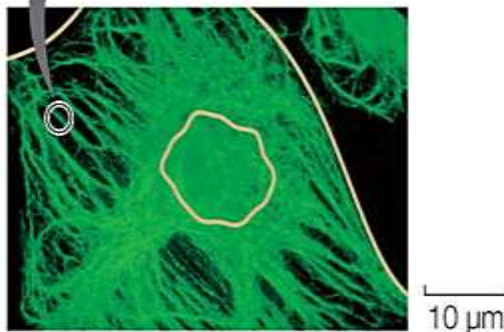
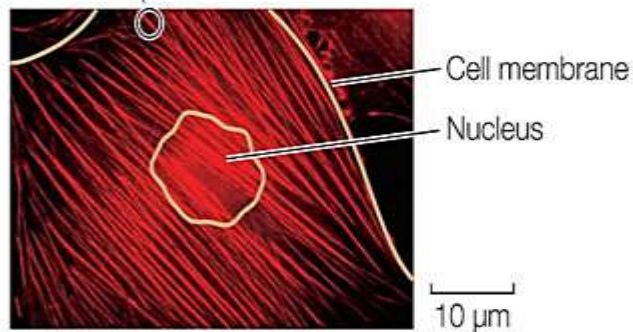
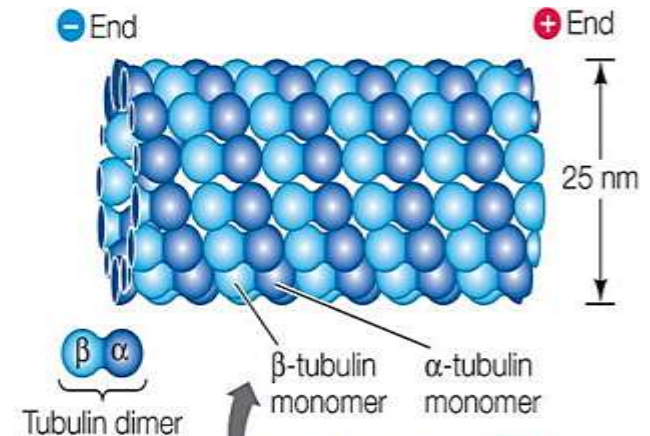
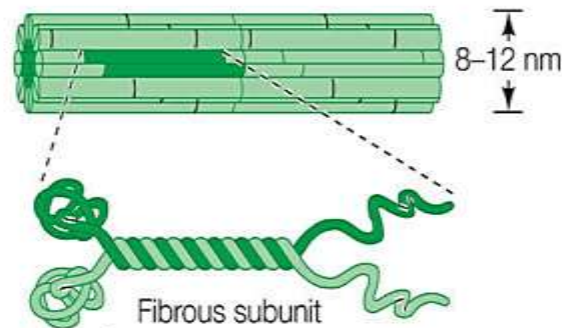
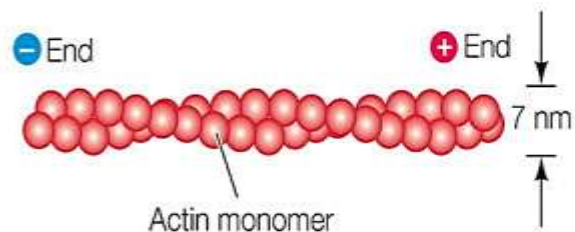


Filamenti Intermedi

- Unità: famiglia eterogenea di proteine
- 10nM
- Lamina nucleare, assoni, tessuti epiteliali

(a) Intermediate filaments
(vimentin)





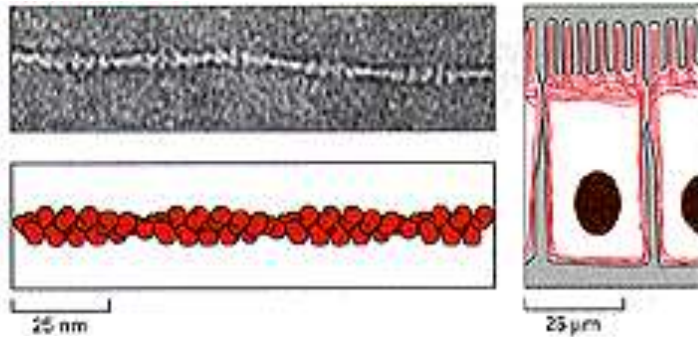
(A) Microfilaments
Made up of strands of the protein actin;
often interact with strands of other proteins.

(B) Intermediate filaments
Made up of fibrous proteins organized
into tough, ropelike assemblies that
stabilize a cell's structure and help
maintain its shape.

(C) Microtubules
Long, hollow cylinders made up of many
molecules of the protein tubulin. Tubulin
consists of two subunits, α-tubulin and
β-tubulin.

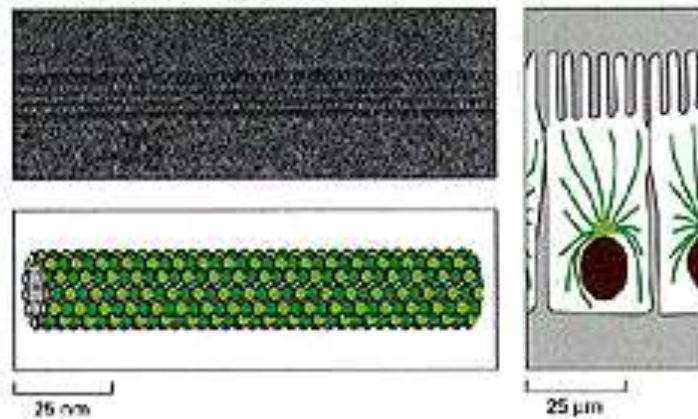
CIASCUN TIPO DI FILAMENTO HA PROPRIETA' E FUNZIONI SPECIFICHE

MICROFILAMENTI (ACTINA)



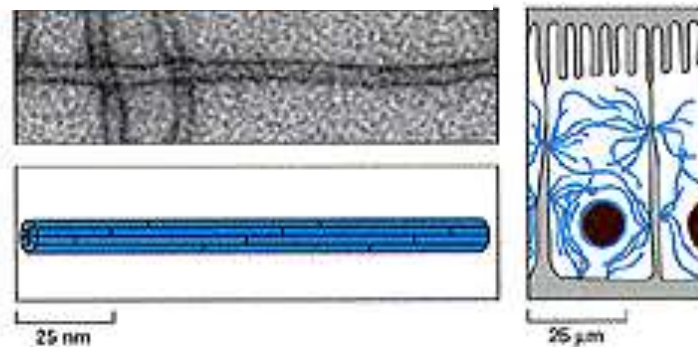
FORMA E MOVIMENTO DELLE CELLULE

MICROTUBULI (TUBULINA)

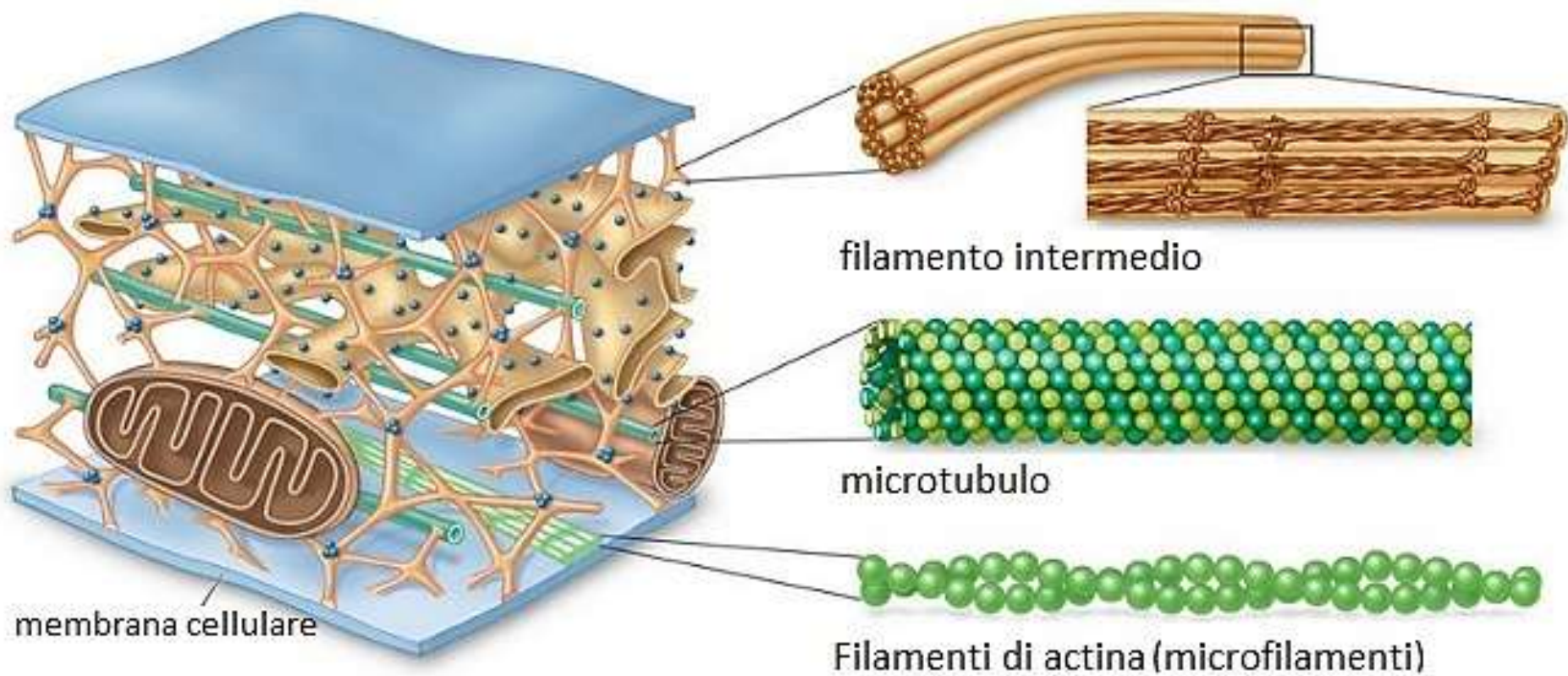


MITOSI E TRAFFICO DI VESCICOLE

FILAMENTI INTERMEDI



IMPALCATURA E ORGANIZZAZIONE DI TESSUTI



Le subunità in un filamento del citoscheletro sono tenute insieme da interazioni idrofobiche e legami non covalenti deboli; le posizioni e i tipi di contatti sono diversi per i diversi filamenti.

Processo di Nucleazione

Assemblaggio di subunità in un aggregato iniziale (o *nucleo*)



Stabilizzazione dei contatti subunità-subunità



Allungamento del polimero per aggiunta di altre subunità

NUCLEAZIONE:

- *Concentrazione critica*: la polimerizzazione dipende dalla concentrazione di subunità non polimeriche
- *Punto stazionario*: quando il tasso di associazione e dissociazione si equivalgono
- proteine speciali per catalizzare la nucleazione dei filamenti in siti specifici, determinando la posizione in cui si assemblano nuovi filamenti del citoscheletro

POLARITA' DEI FILAMENTI DEL CITOSCHELETRO:

- i filamenti, rispetto ai tassi di polimerizzazione e depolimerizzazione, sono strutture polari
- il terminale con il tasso di polimerizzazione maggiore è detto *terminale (+)* (“plus end”)
- il terminale con il tasso di polimerizzazione minore è detto *terminale (-)* (“minus end”)

FILAMENTI INTERMEDI

- Presenti soltanto in alcuni metazoi, fra i quali vertebrati, nematodi e molluschi
- anche in questi organismi non sono, comunque, necessari in tutte le cellule
- correlati alle *lamine nucleari* (proteine filamentose che formano un reticolo che ricopre la membrana interna dell'involucro nucleare, antenati dei filamenti intermedi)
- impartiscono forza fisica a cellule e tessuti
- Strutture dinamiche, la fosforilazione regola probabilmente il disassemblaggio.
- Famiglie diverse di filamenti intermedi, la più diversificata è quella delle

CHERATINE,

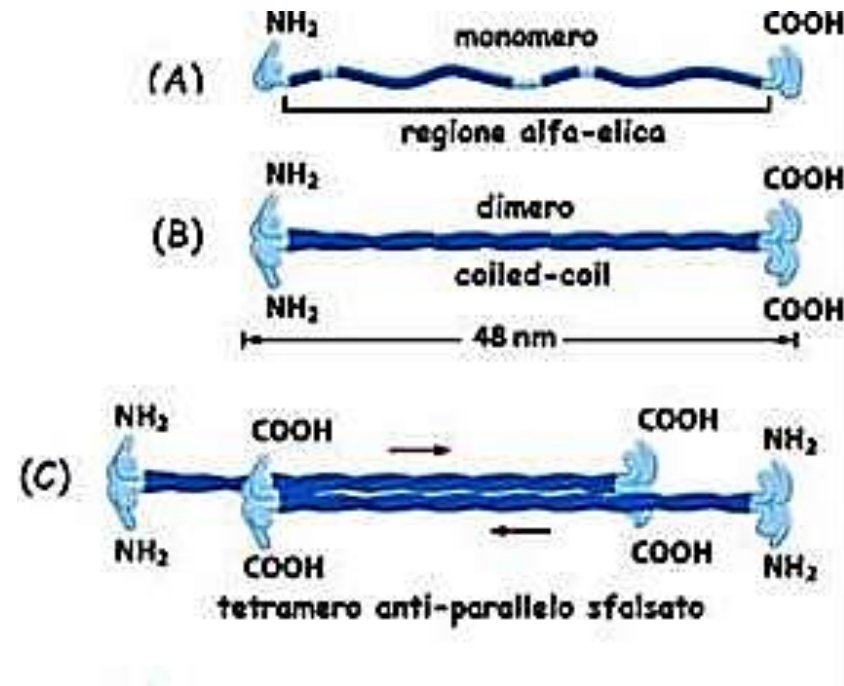
Una seconda famiglia è costituita dai **NEUROFILAMENTI**

I FILAMENTI INTERMEDI

Monomeri: molecole filamentose con dominio centrale esteso ad α -elica.

Dimeri: il dominio α -elica di due monomeri forma un coiled coil parallelo.

Tetramero: una coppia di dimeri si associa in modo antiparallelo e sfalsato. Il tetramero rappresenta la subunità solubile.



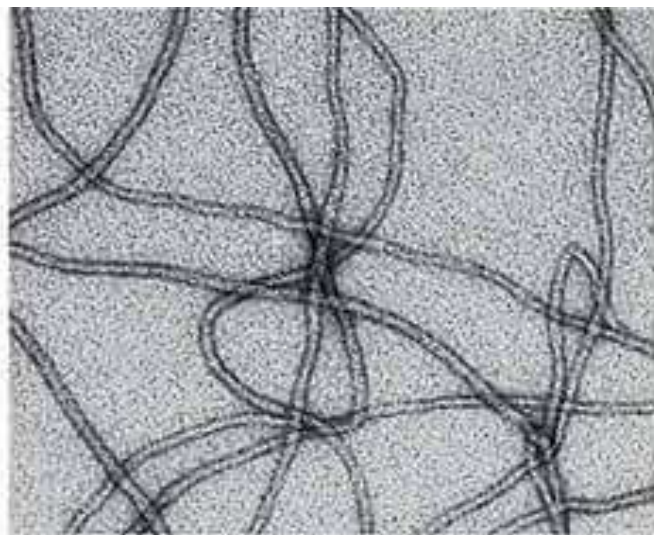
Protofilamento: i tetrameri si uniscono insieme lateralmente.



Filamento: associazione di 8 protofilamenti paralleli.

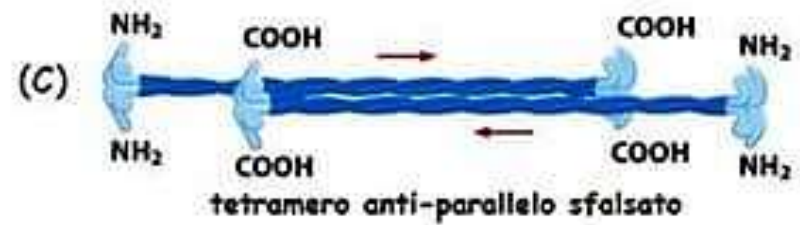


Ogni filamento intermedio ha una sezione trasversale di 32 singoli avvolgimenti ad α -elica



(F)

0.1 μm



I filamenti intermedi non sono polari

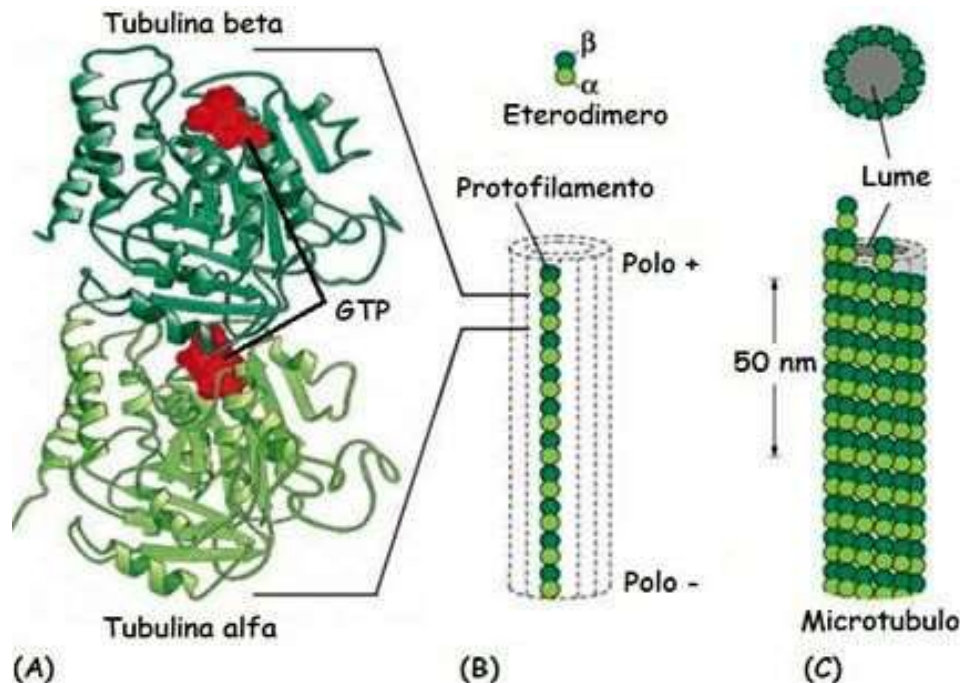
MICROTUBULI

- sono strutture altamente conservate in tutte le cellule eucariotiche
- possono riarrangiarsi rapidamente a formare il *fuso mitotico*, durante la divisione cellulare, *ciglia e flagelli* o “binari cellulari” per il trasporto di molecole
- strutture cilindroidi, non ramificate, con un diametro esterno di circa 25 nm ed un canale centrale aperto
- sono costituiti da subunità proteiche globulari di TUBULINA che si associano a formare dei protofilamenti
- 13 protofilamenti paralleli si associano a costituire il microtubulo (struttura elicoidale regolare)

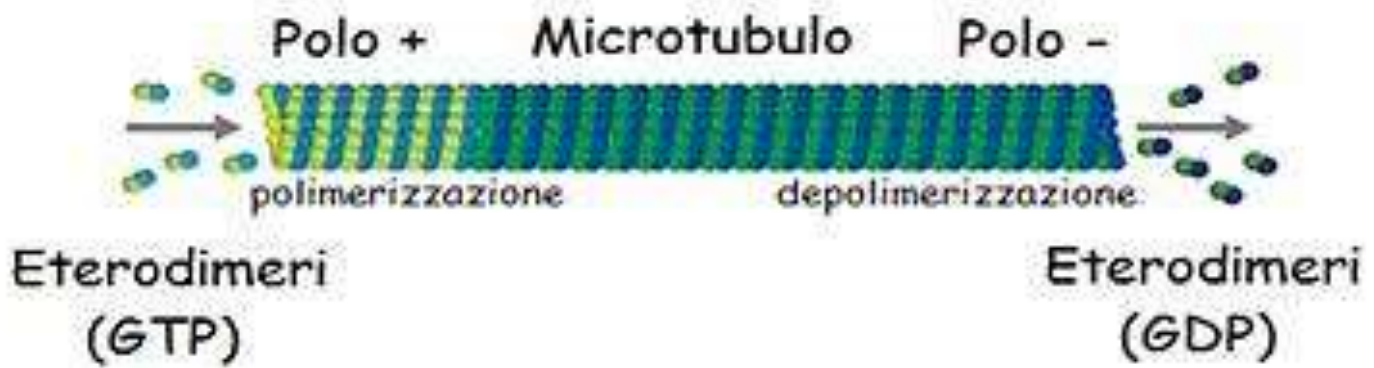
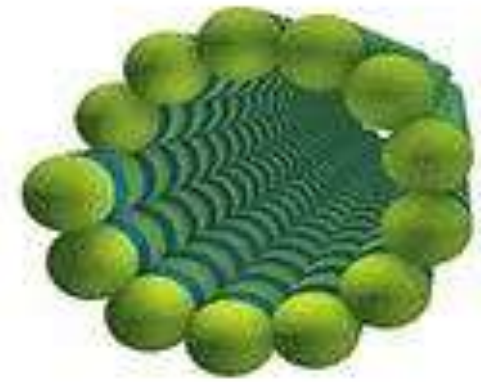


LA TUBULINA:

- Costituisce le subunità sferiche dei microtubuli
- è un eterodimero formato da due proteine globulari strettamente correlate: α -TUBULINA e β -TUBULINA, unite da legami non covalenti
- ciascun monomero ha un sito di legame per una molecola di GTP
- gli eterodimeri si allineano testa-coda longitudinalmente e costituiscono il protofilamento, costituito da subunità che puntano tutte nella stessa direzione (anche i protofilamenti sono allineati allo stesso modo)
- 13 protofilamenti si associano a formare il microtubulo cavo



«Il guanosintrifosfato o GTP è un ribonucleotide trifosfato formato dalla guanina (una base azotata), dal ribosio (uno zucchero pentoso) e da tre gruppi fosfato.»

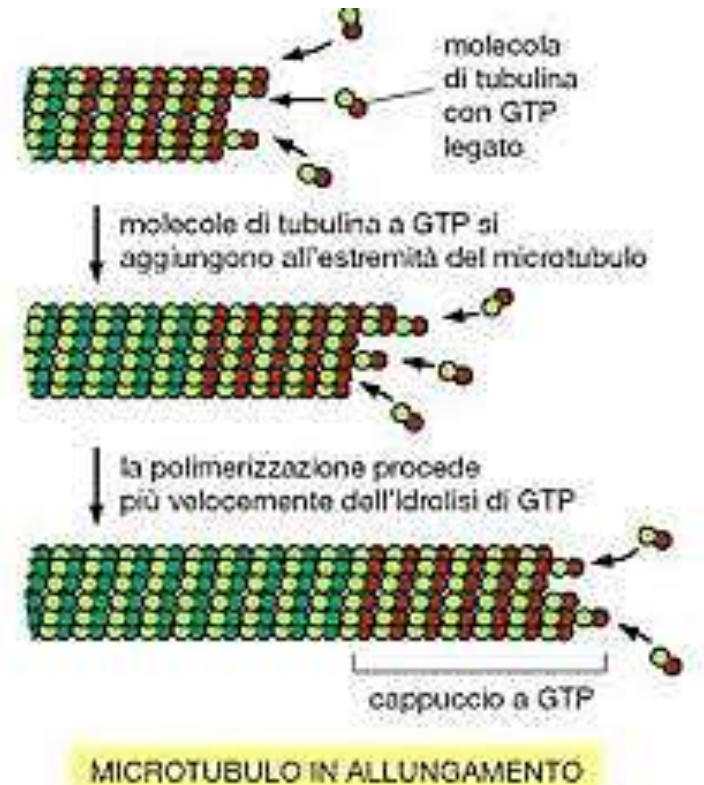


I microtubuli sono filamenti polari

LA POLIMERIZZAZIONE DELLE TUBULINE:

- i microtubuli si formano da un pool citoplasmatico di eterodimeri.
- equilibrio finemente bilanciato
- i dimeri di tubulina in forma libera legano il GTP (in ciascun eterodimero, una molecola di GTP si lega all' α -TUBULINA, mentre una seconda alla β -TUBULINA)

- il legame del GTP induce un cambiamento conformazionale dell'eterodimero che favorisce la polimerizzazione (spostamento dell'equilibrio)
- l'idrolisi del GTP avviene dopo che si è instaurato il legame tra gli eterodimeri nel polimero
- l'idrolisi del GTP non è necessaria per la polimerizzazione.



INSTABILITA' DINAMICA:

Sia actina che tubulina possono idrolizzare i nucleotidi che hanno legato; per le subunità libere, questa idrolisi procede molto lentamente, ma è accelerata quando le subunità sono incorporate nei filamenti.

La polimerizzazione o la depolimerizzazione dipendono dall'integrità strutturale del “**cappuccio**” di subunità, recanti il nucleotide non idroizzato, posto al terminale (+) del microtubulo.

Se il cappuccio è completo, l'associazione eterodimerica è favorita (conformazione favorevole) POLIMERIZZAZIONE

Se l'idrolisi del GTP procede così velocemente da lasciare esposte subunità con GDP legato, al terminale (+), qui si instaura una DEPOLIMERIZZAZIONE



TREADMILLING:

Allo stato stazionario è possibile che le subunità tubuliniche fluiscano lungo il microtubulo; gli eterodimeri che si associano al terminale (+) vengono spinti verso il terminale (-) dalla continua associazione di subunità al terminale in crescita.

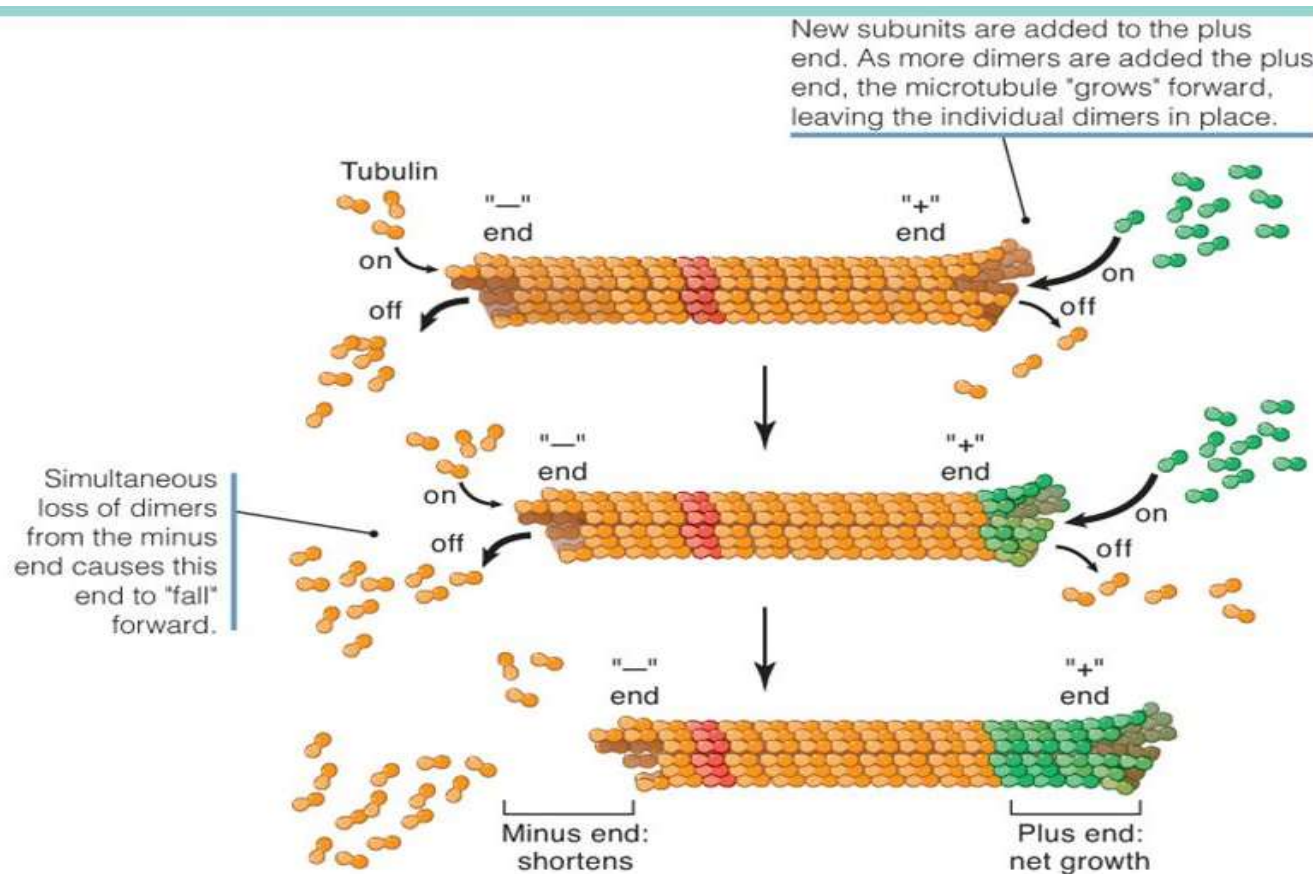
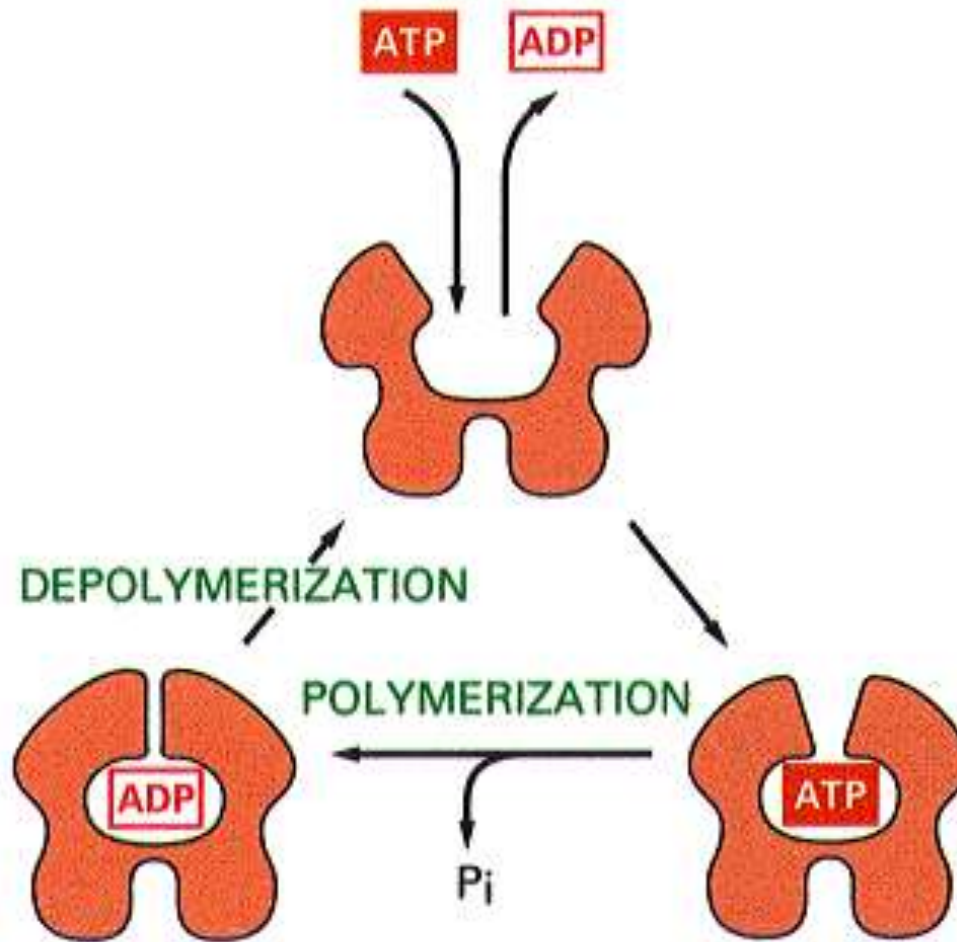


Figure 05.16: Treadmilling in microtubules.

FILAMENTI DI ACTINA

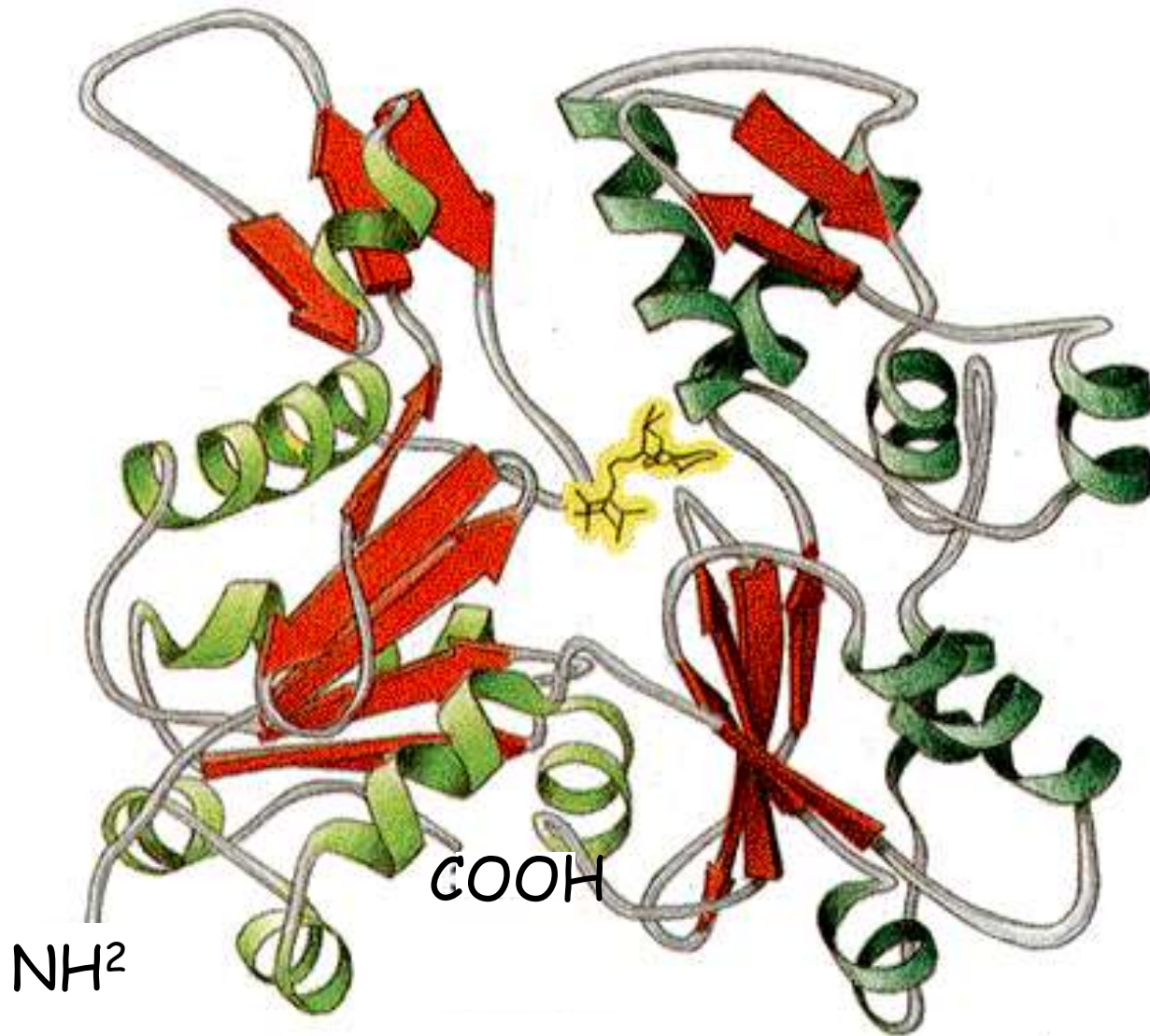
- sono formati da subunità compatte e globulari di ACTINA
- le subunità si assemblano testa-coda formando filamenti con una polarità strutturale distinta
- ciascuna subunità ha un sito di legame per un nucleotide: ATP (o ADP)
- **filamento di actina** è composto da due protofilamenti paralleli che si avvolgono l'uno sull'altro dando un'elica destrorsa
- sono filamenti più flessibili
- possono essere uniti in senso trasversale da una varietà di proteine accessorie che aumentano la forza e stabilità delle strutture
- formano molti tipi di proiezioni della superficie cellulare, sia dinamiche (*lamellipodi* e *filopodi*), che stabili (fasci regolari di *stereociglia*)
- dentro le cellule formano disposizioni stabili che permettono alcuni movimenti (contrazione del muscolo)

IL MONOMERO DI ACTINA LEGA ATP



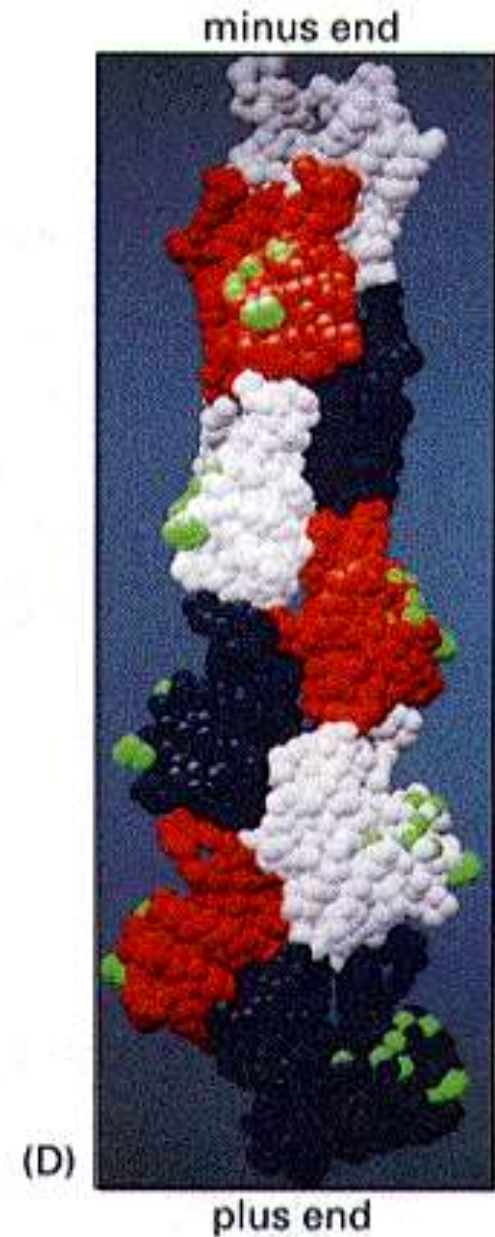
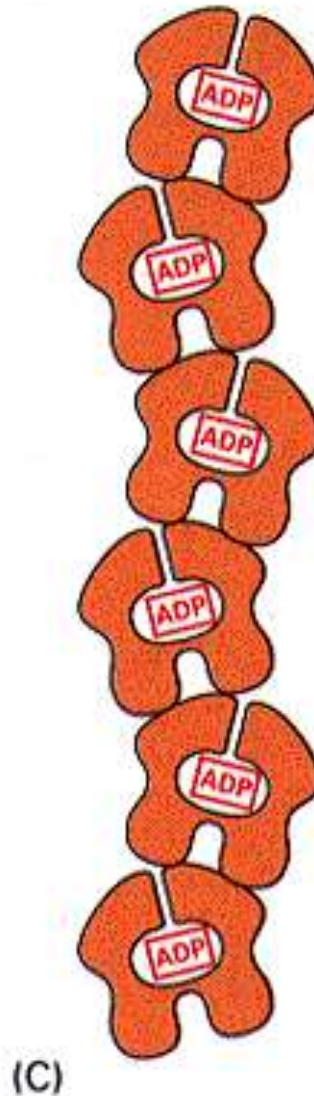
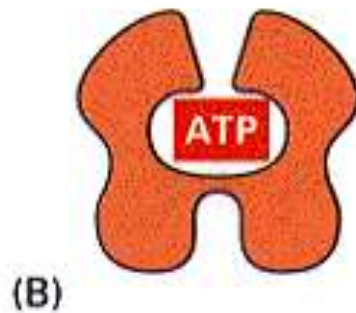
I MONOMERI DI ACTINA SONO SIMMETRICI

ESTREMITA' -

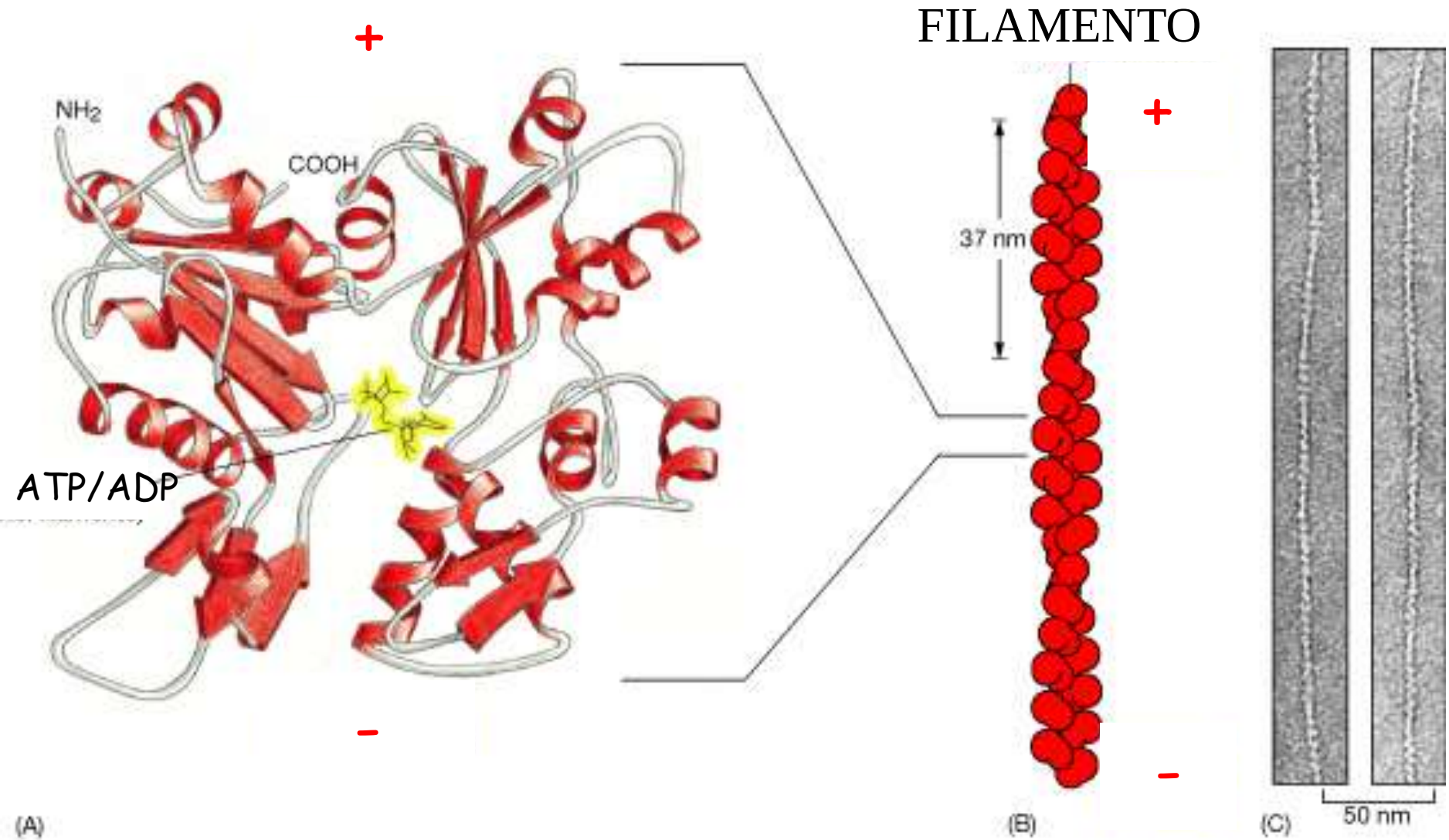


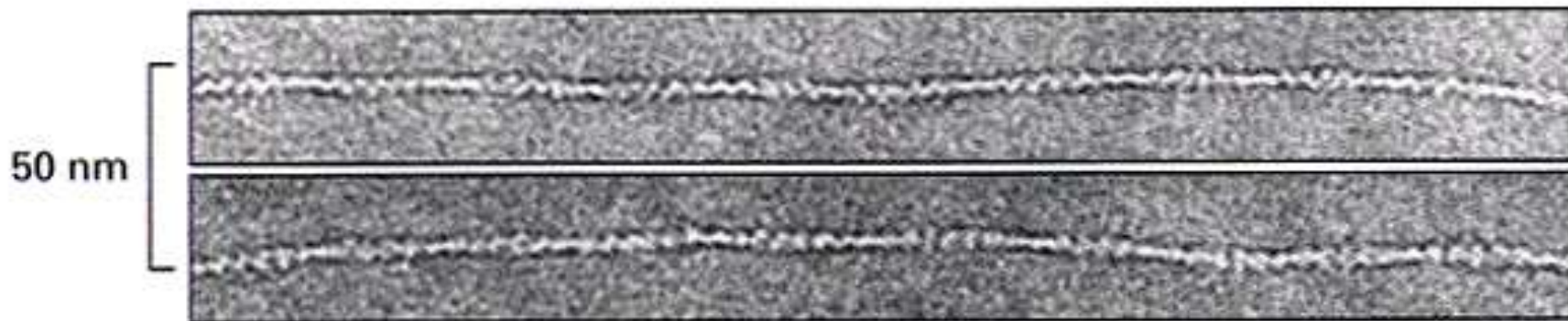
ESTREMITA' +

I MICROFILAMENTI SONO POLIMERI DI ACTINA

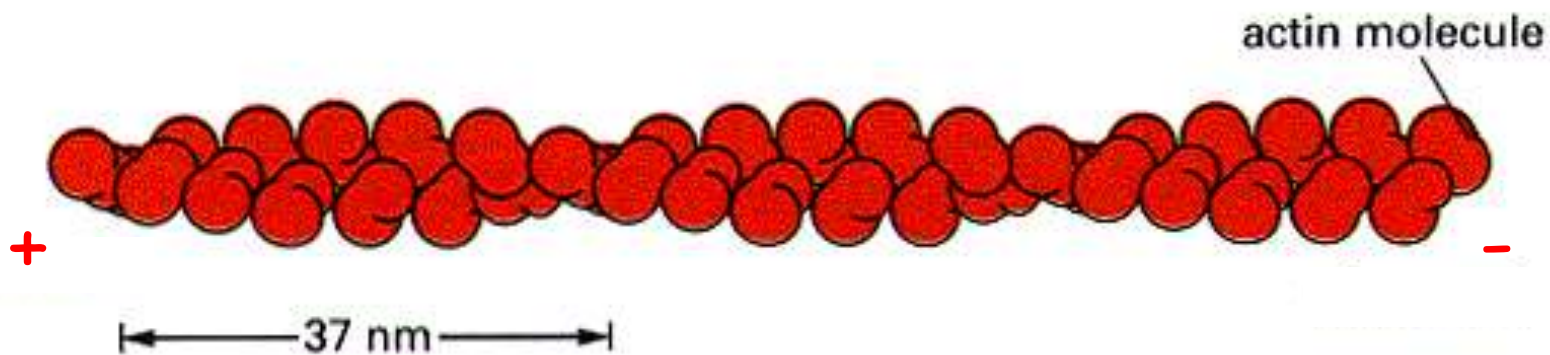


I FILAMENTI DI ACTINA HANNO UNA POLARITA'



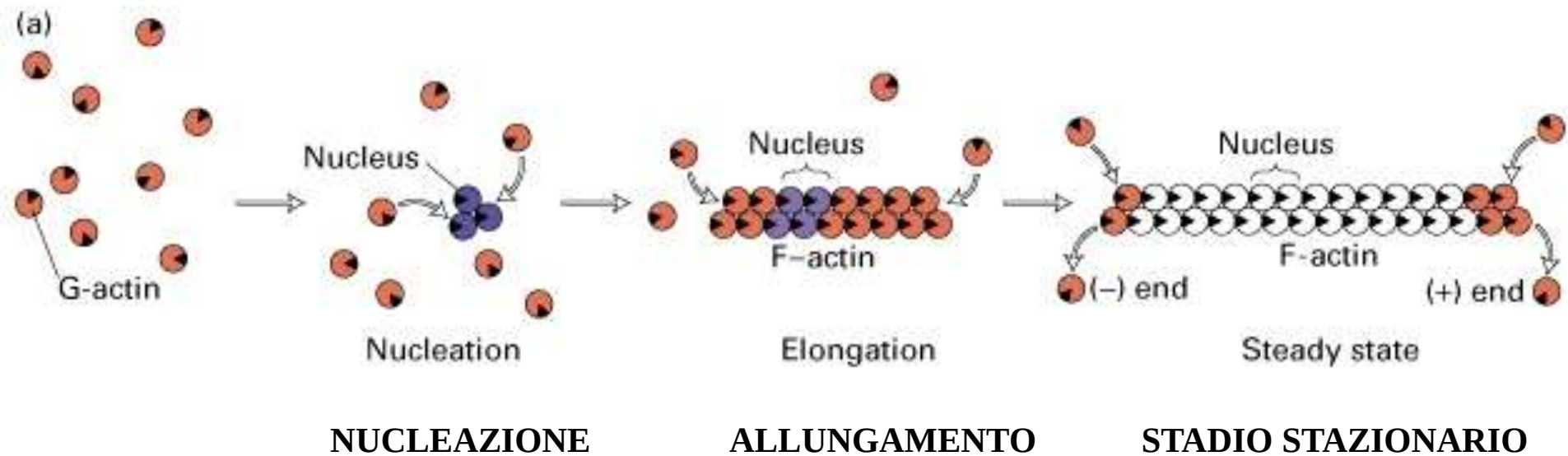


(A)



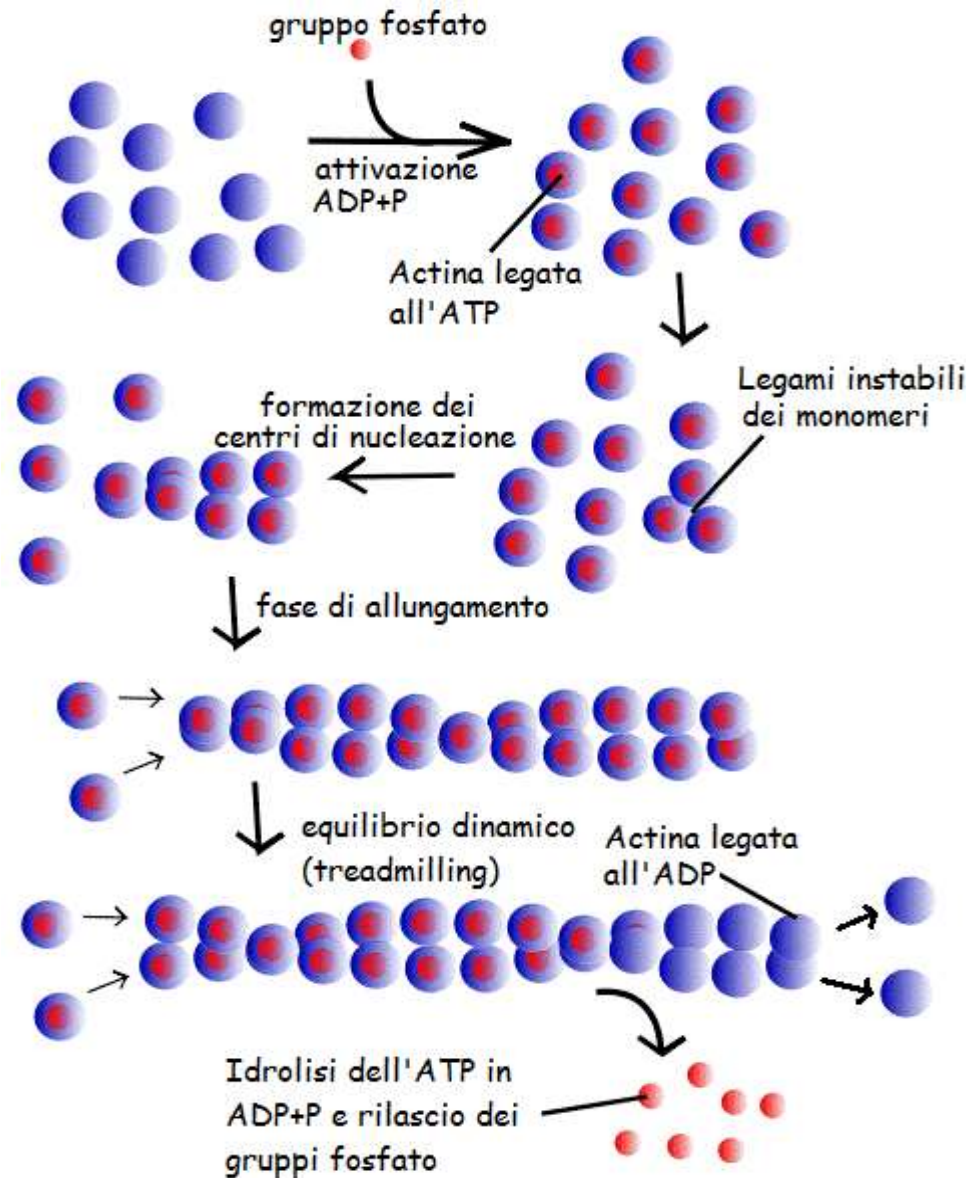
(B)

LA POLIMERIZZAZIONE DEI FILAMENTI DI ACTINA SI REALIZZA ATTRAVERSO 3 FASI

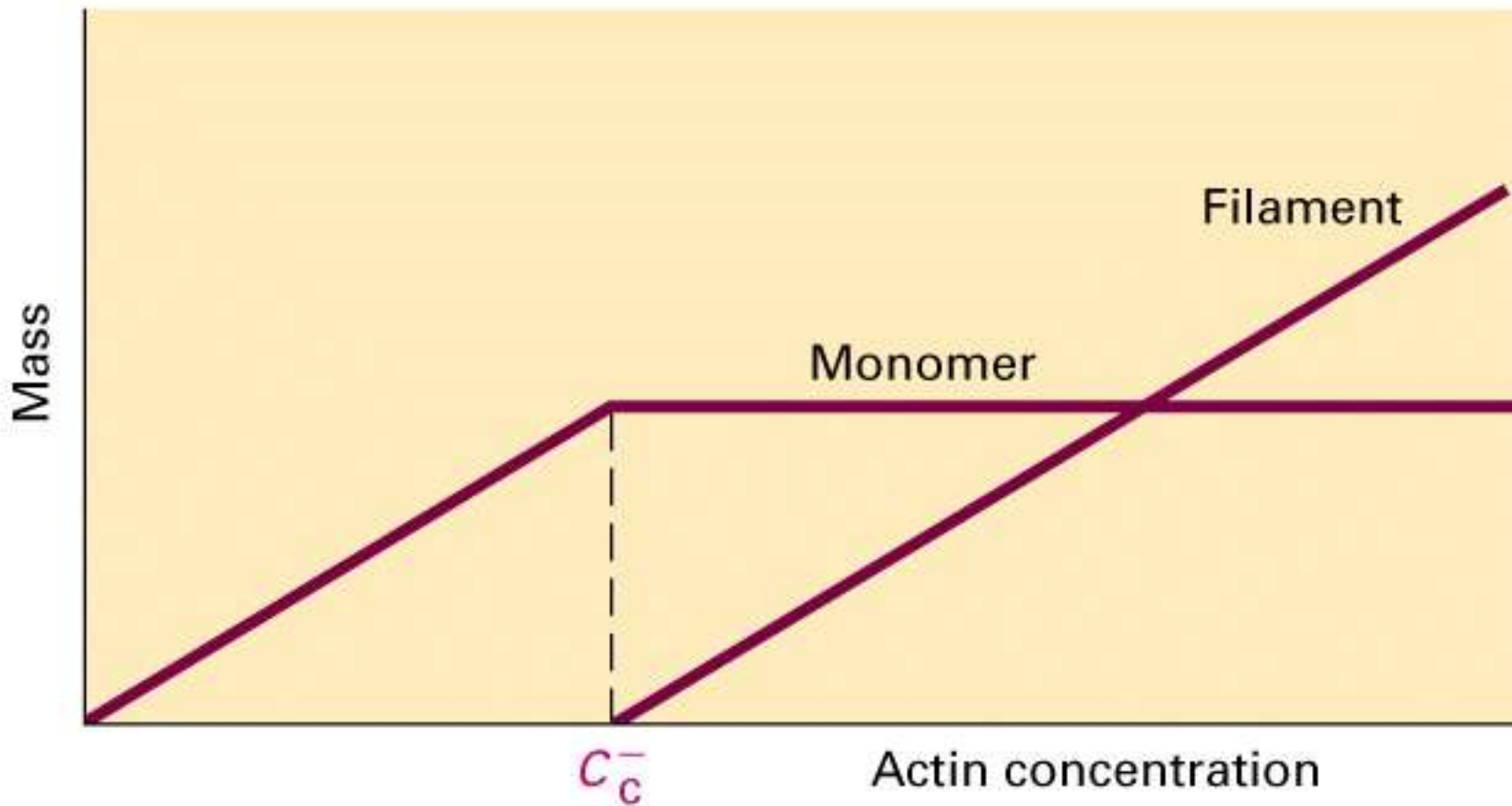


NUCLEAZIONE DEI FILAMENTI DI ACTINA

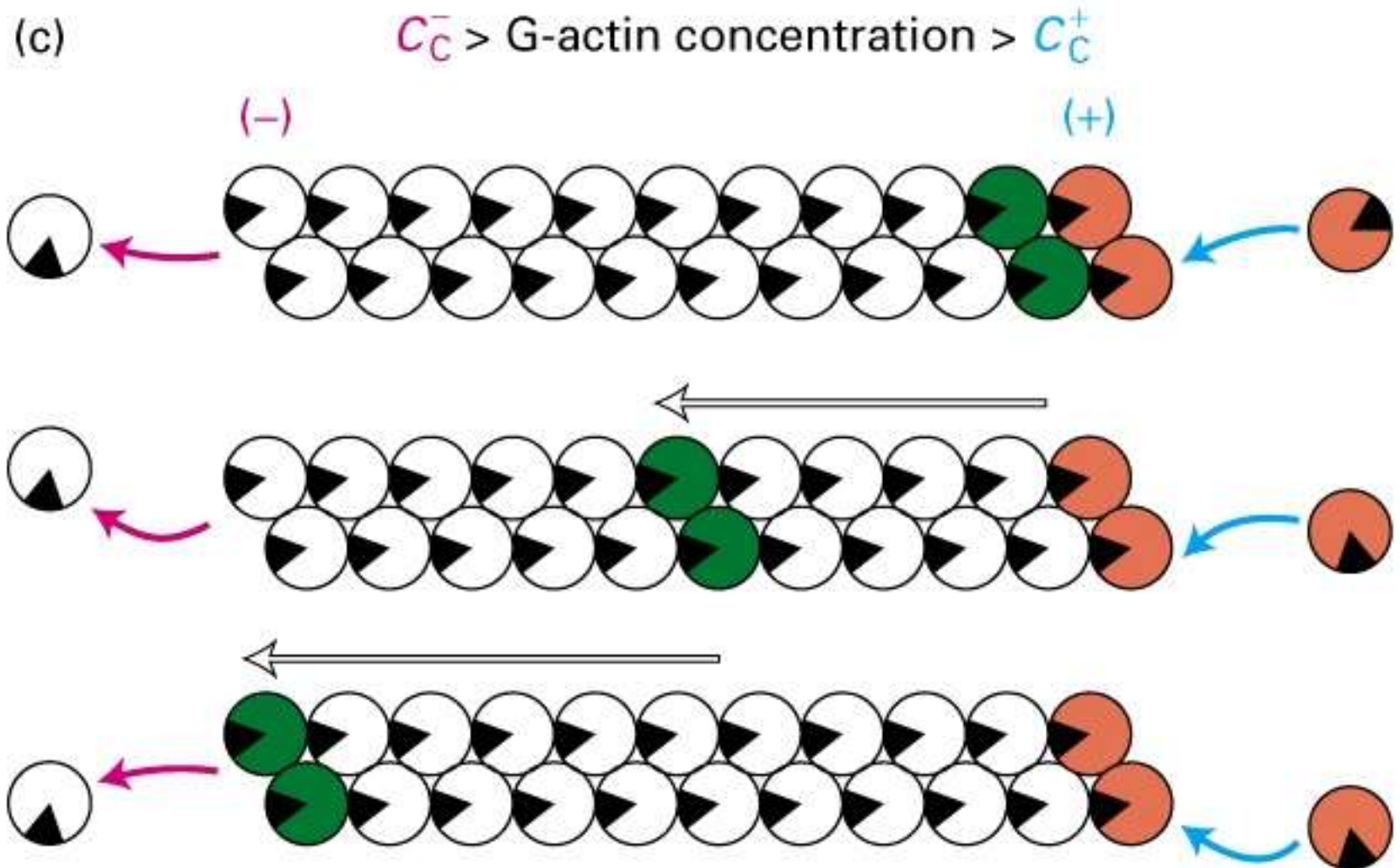
- La **nucleazione** dei filamenti di actina avviene alla **membrana plasmatica**
- la nucleazione è spesso regolata da segnali esterni ed è catalizzata da complessi proteici diversi
- la stabilizzazione o destabilizzazione è mediata dall'interazione con proteine accessorie (es. **MAP** per i microtubuli, **cofilina** per actina)



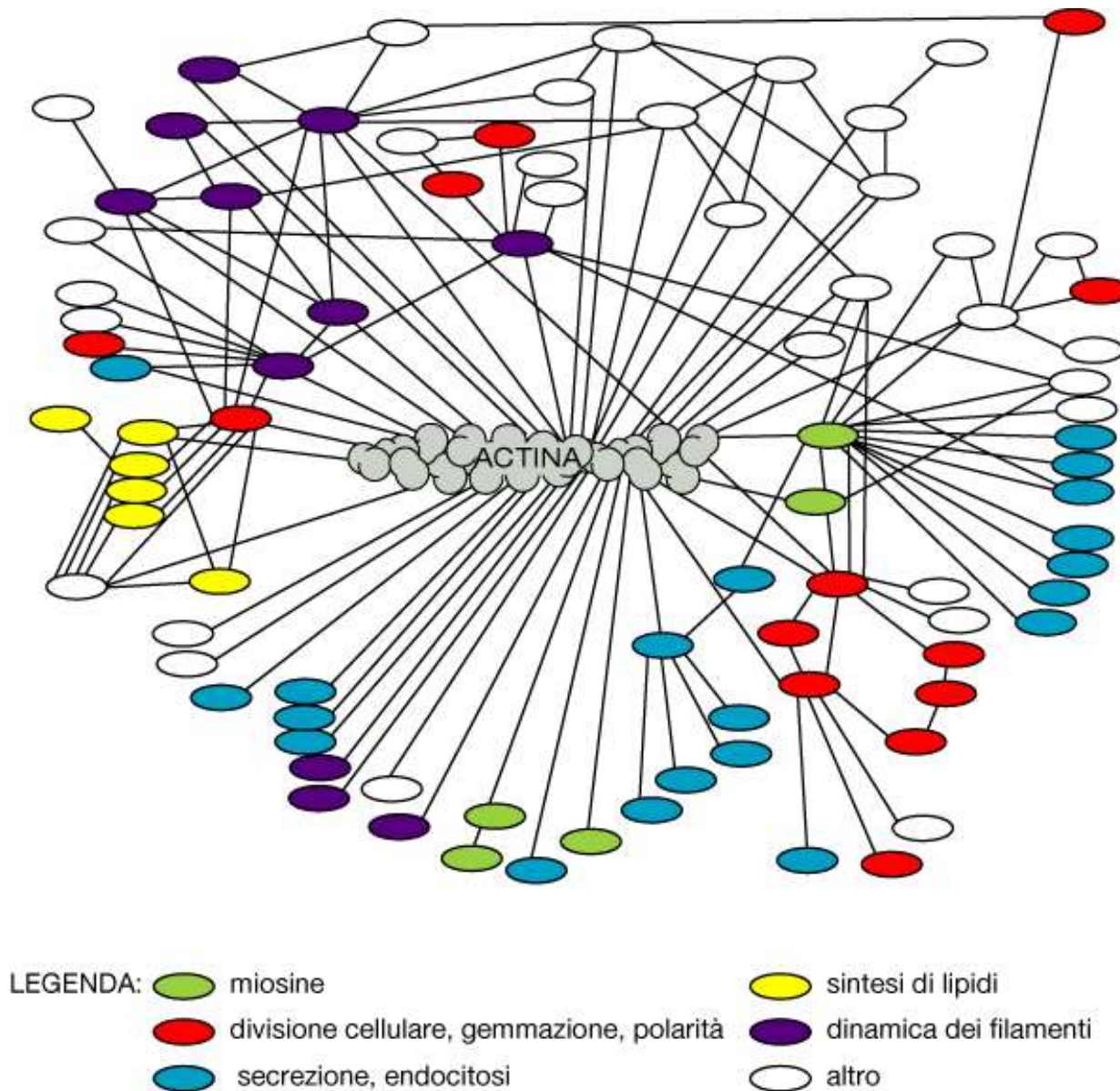
LA POLIMERIZZAZIONE HA LUOGO QUANDO LA G-ACTINA E' AL DI SOPRA DELLA CONCENTRAZIONE CRITICA



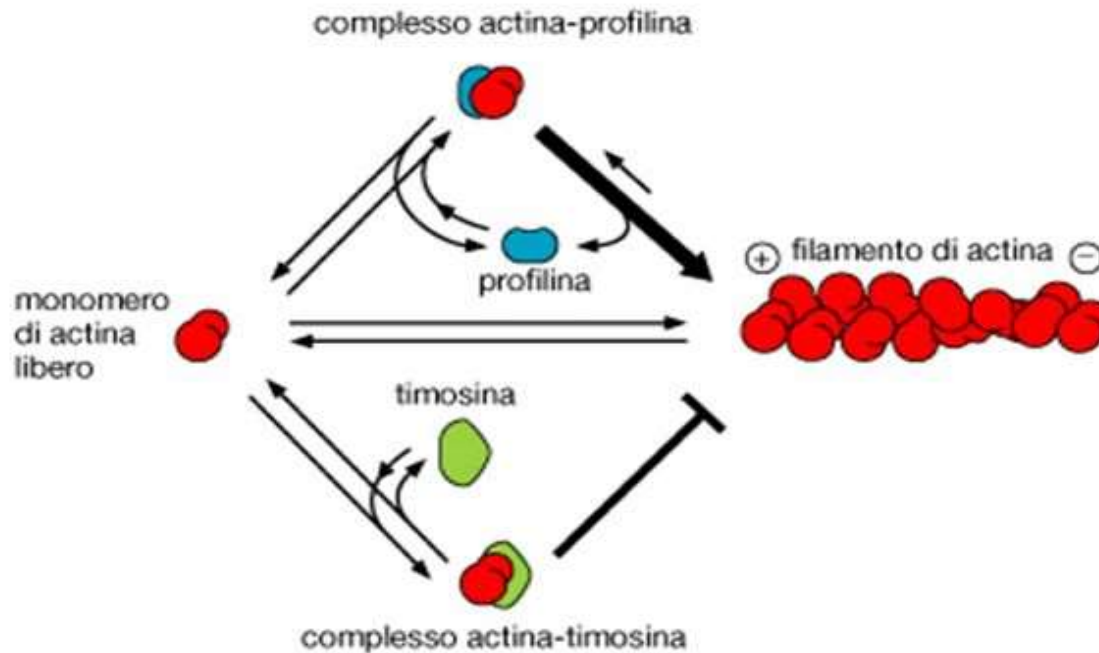
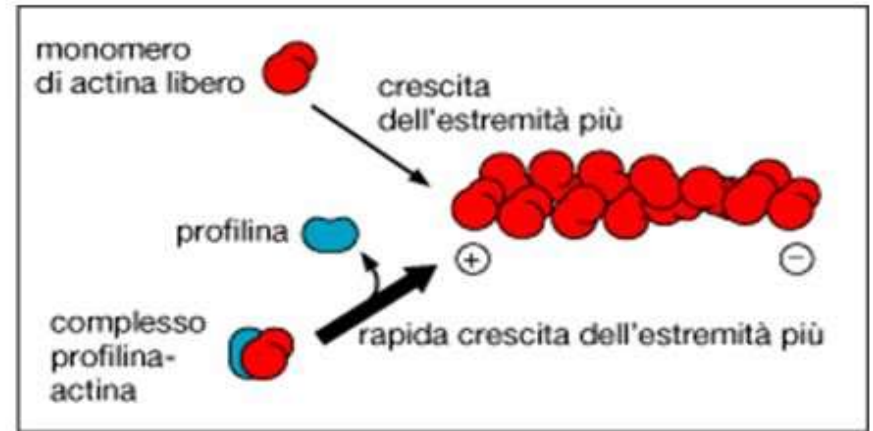
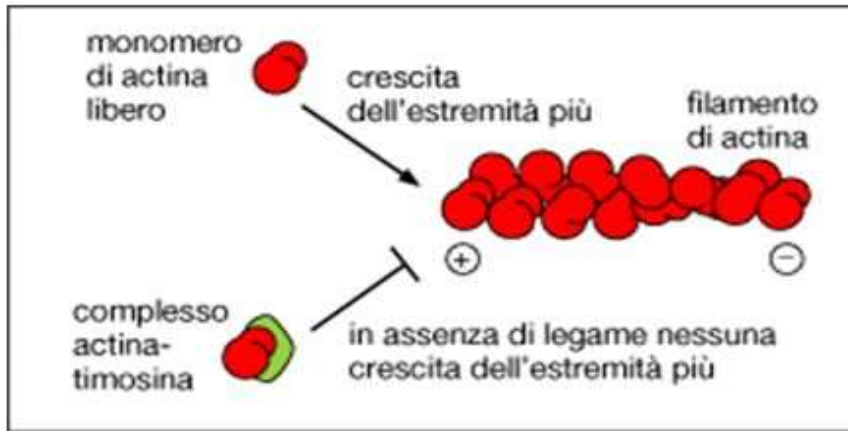
CERTE CONCENTRAZIONI DI G-ACTINA POSSONO DETERMINARE 'TREADMILLING'



L'ACTINA INTERAGISCE CON MOLTE PROTEINE



Proteine accessorie: profilina e timosina



LA PROFILINA COMPETE CON LA TIMOSINA PER L'ATTACCO A MONOMERI DI ACTINA E PROMUOVE L'ASSEMBLAGGIO

TIMOSINA $\beta 4$

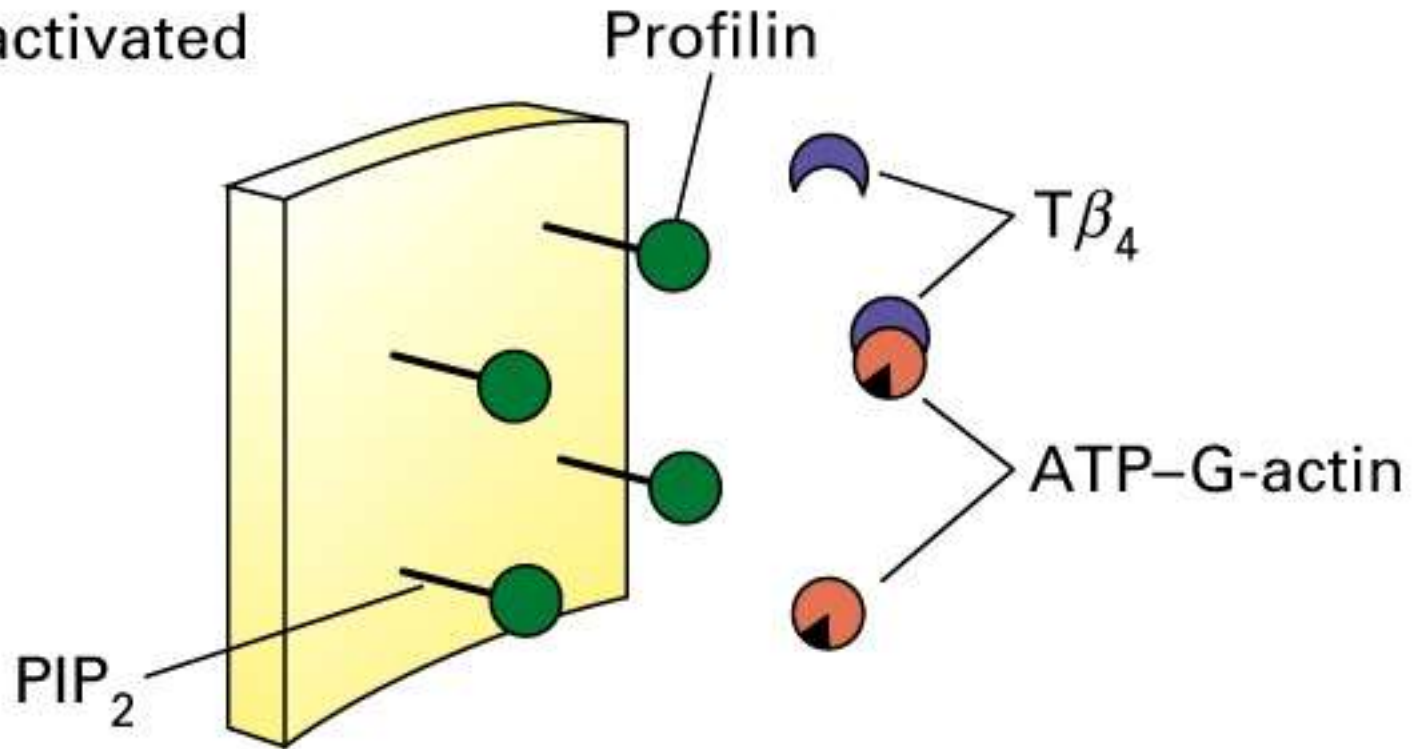
LA TIMOSINA $\beta 4$ LEGA IL MONOMERO DI ACTINA IMPEDENDO AL MONOMERO DI ASSOCIARSI ALLE ESTREMITA' DEL FILAMENTO.

PROFILINA

SI LEGA AL MONOMERO, AL LATO OPPOSTO ALLA FESSURA DI LEGAME PER L'ATP. IL COMPLESSO PROFILINA-ACTINA PUO' LEGARSI AD UN FILAMENTO DI ACTINA. UN CAMBIO DI CONFORMAZIONE FA DISTACCARE LA PROFILINA. LA PROFILINA COMPETE CON LA TIMOSINA $\beta 4$.

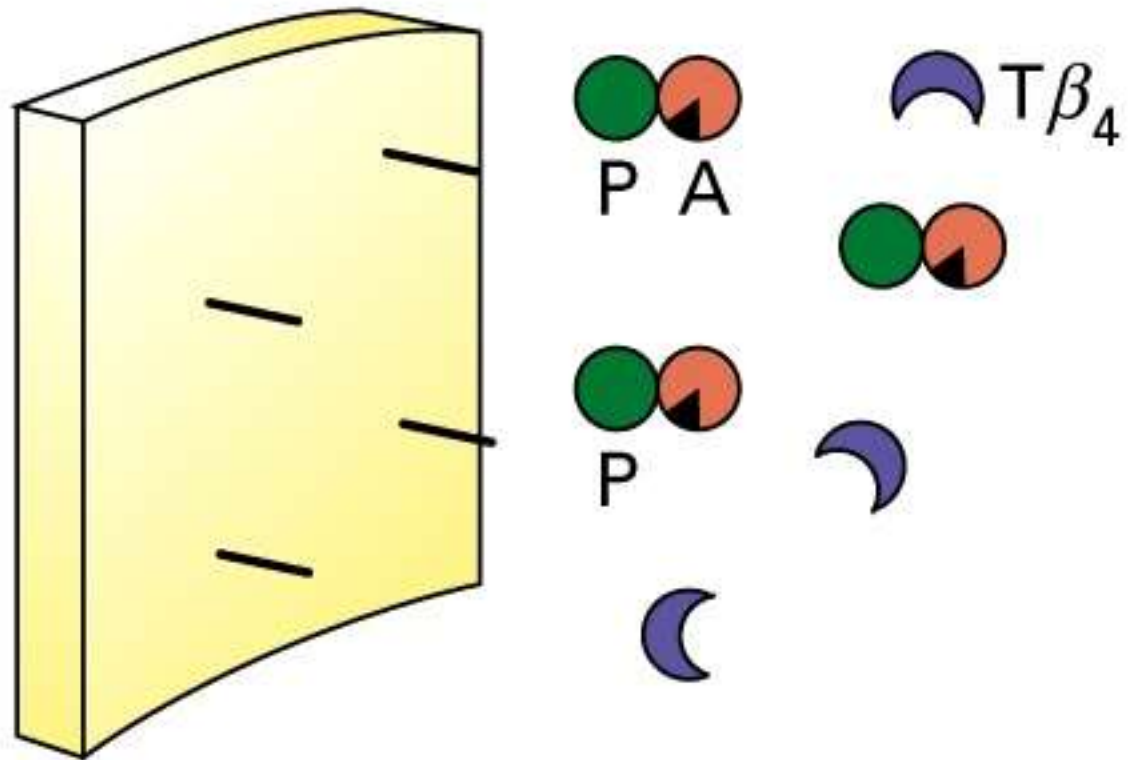
LA PROFILINA E' FREQUENTEMENTE LEGATA A LIPIDI DI MEMBRANA

(a) Unactivated



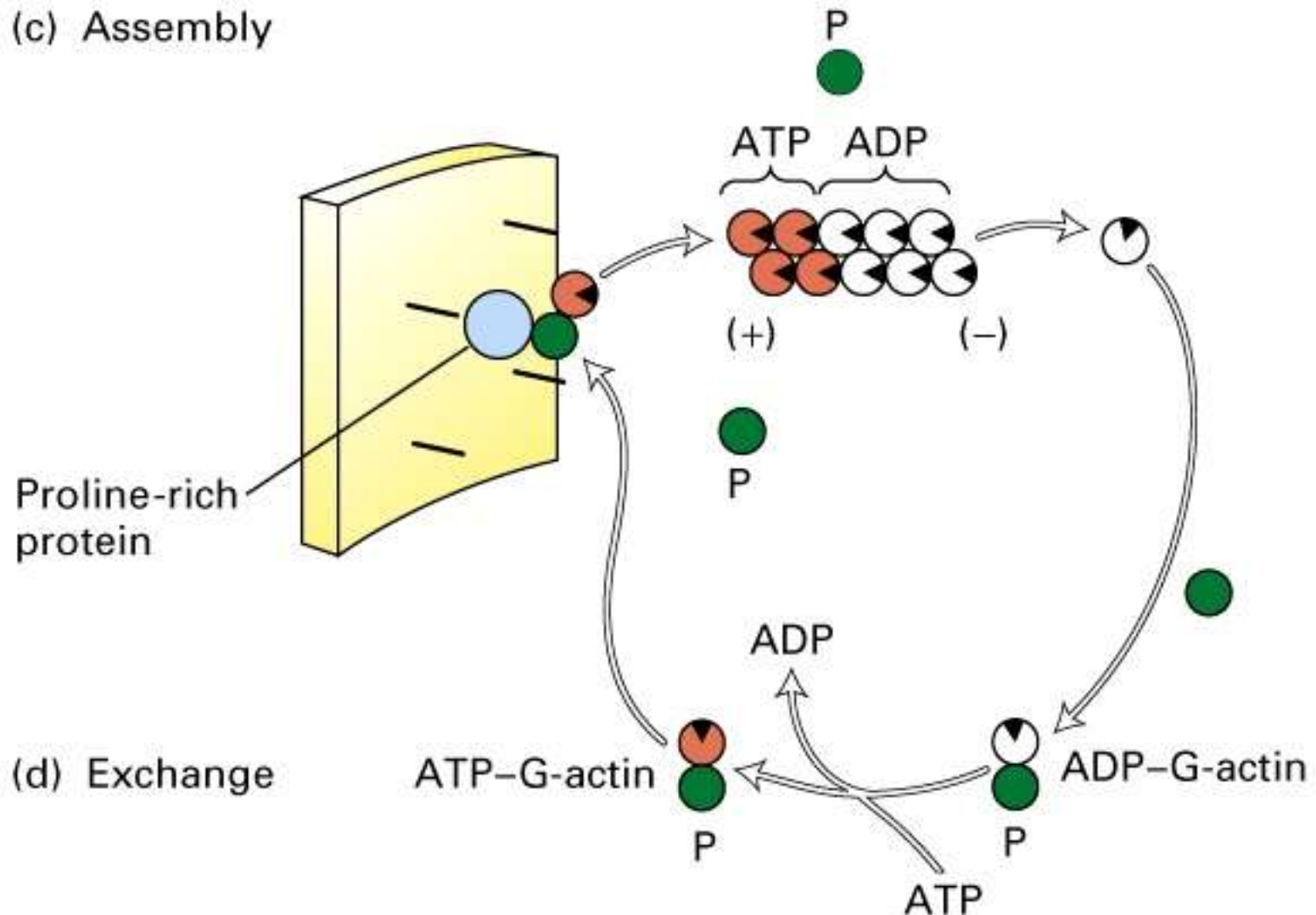
SEGNALI EXTRACELLULARI POSSONO ATTIVARE LA PROFILINA CHE ANTAGONIZZA LA TIMOSINA β_4

(b) Activated

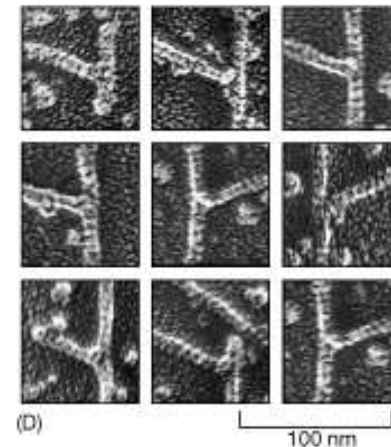
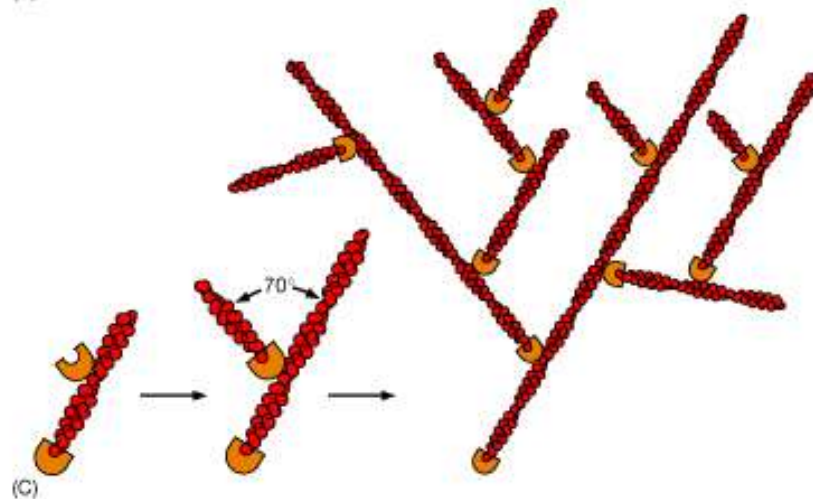
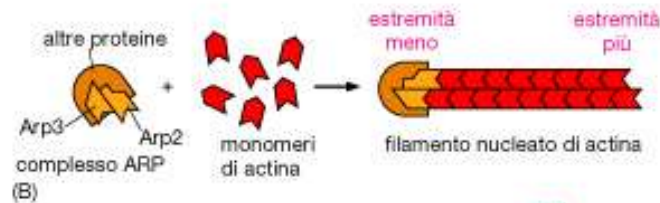
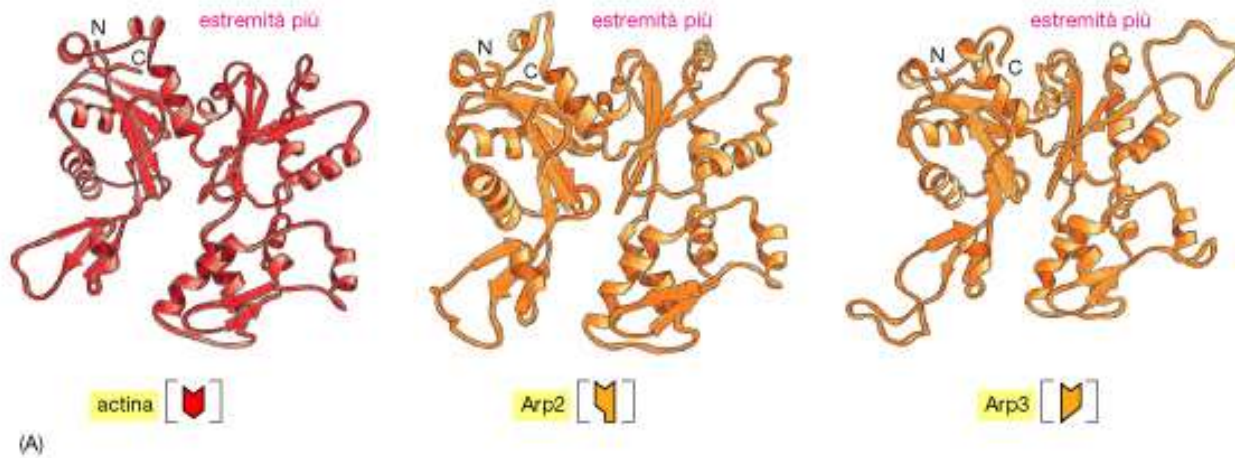


PROTEINE RICCHE IN PROLINA POSSONO CONTRIBUIRE AD ATTIVARE LOCALMENTE LA PROFILINA

(c) Assembly

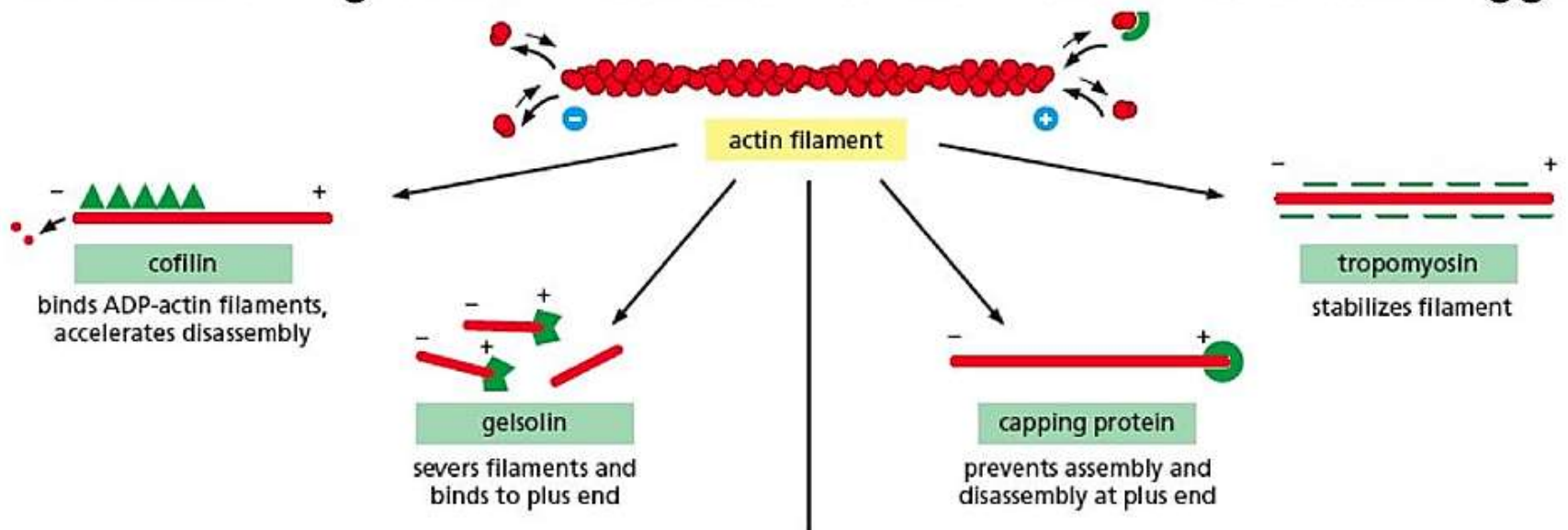


LE PROTEINE **ARP** PROMUOVONO LA NUCLEAZIONE DI FILAMENTI DI ACTINA DALLA MEMBRANA PLASMATICA



PROTEINE CHE CONTROLLANO LA LUNGHEZZA DEI FILAMENTI DI ACTINA MEDIANTE FRAMMENTAZIONE O “L’ INCAPPUCCIAMENTO”.

Cofilina si lega alla F-Actina e ne favorisce il disassemblaggio

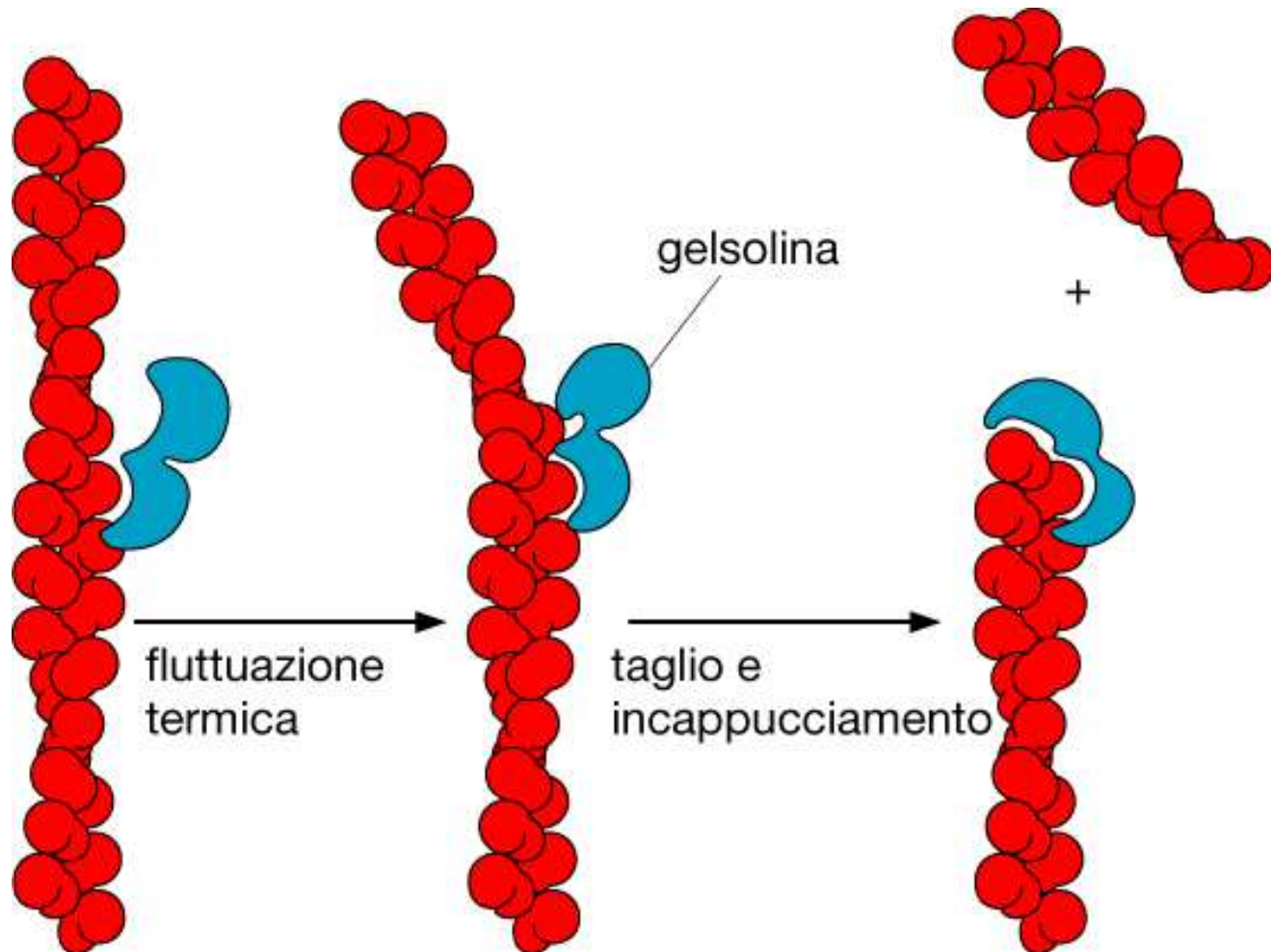


Gelsolina taglia i filamenti e si lega all'estremità +

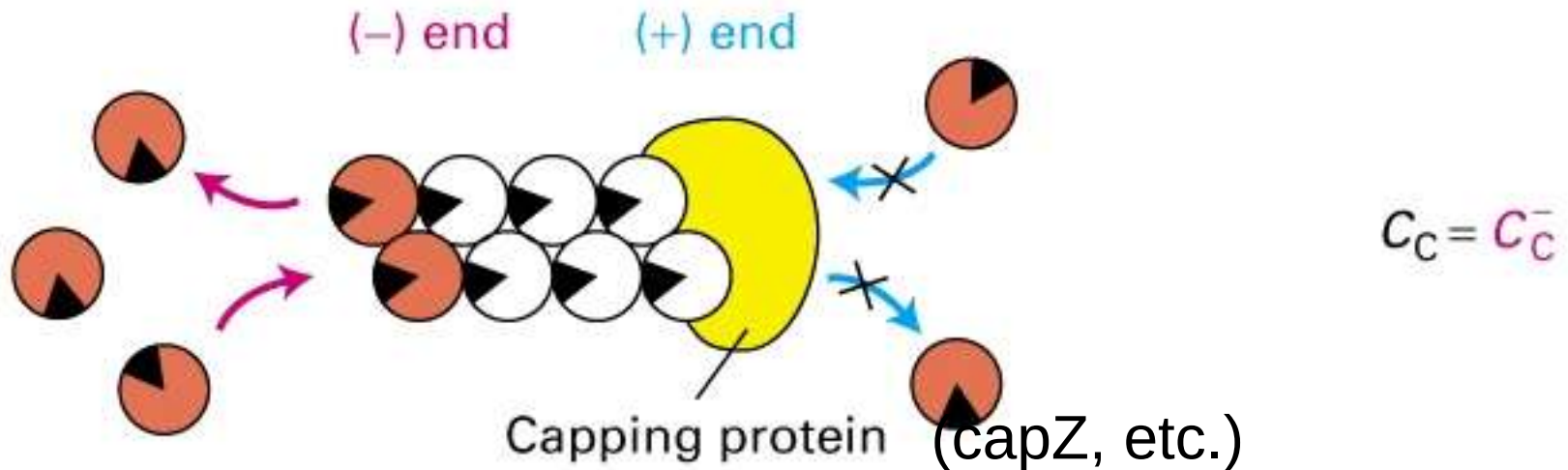
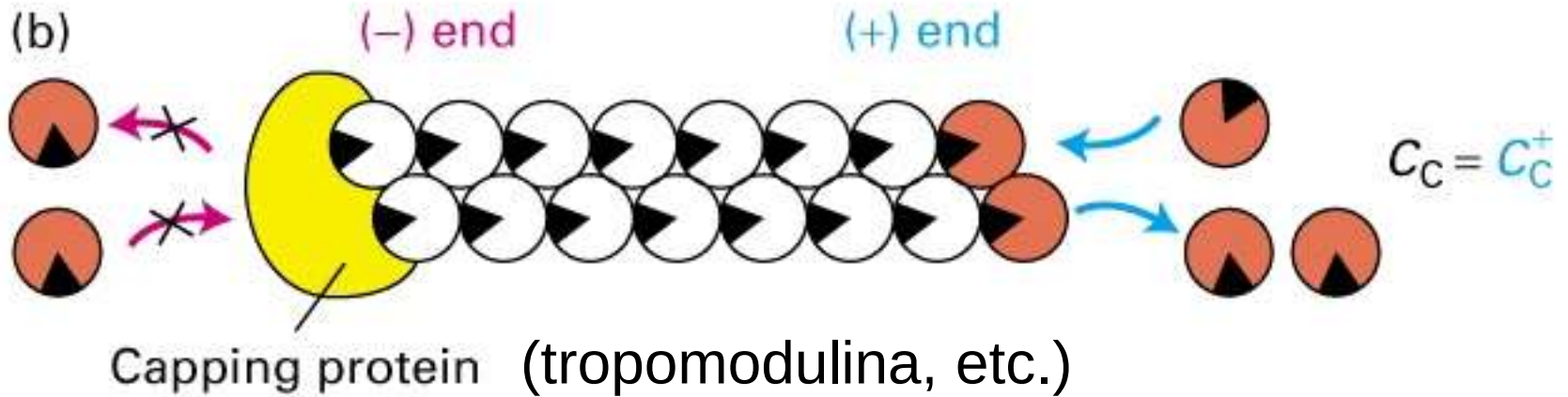
Proteina del cappuccio impedisce l'assemblaggio ed il disassemblaggio all'estremità +

Tropomiosina lega e stabilizza il filamento

LA GELSOLINA TAGLIA ED INCAPPUCCIA I FILAMENTI DI ACTINA

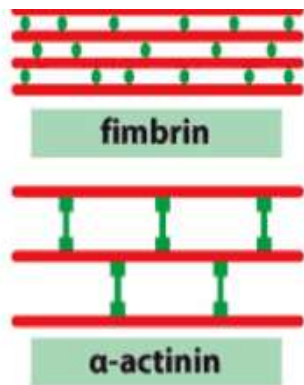


LE PROTEINE CAPPING INCAPPUCCIANO UNA ESTREMITA' DEI FILAMENTI DI ACTINA

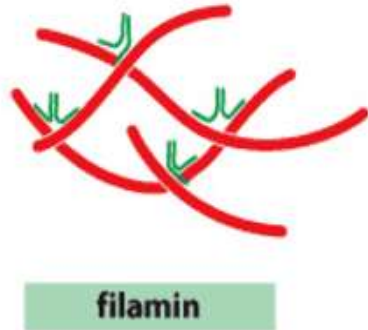


PROTEINE CHE DETERMINANO IL TIPO DI ORGANIZZAZIONE DEI FILAMENTI DI ACTINA.

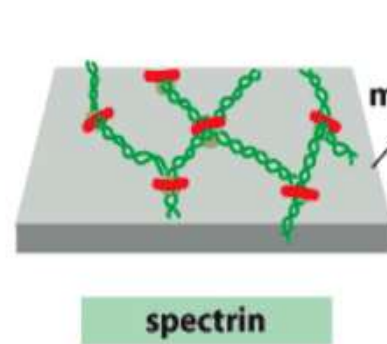
Fimbrina
 α -actinina



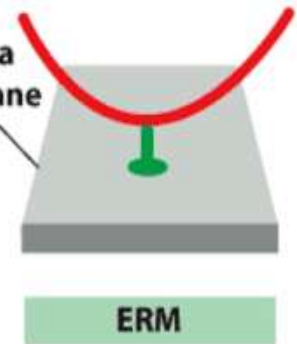
Filamina



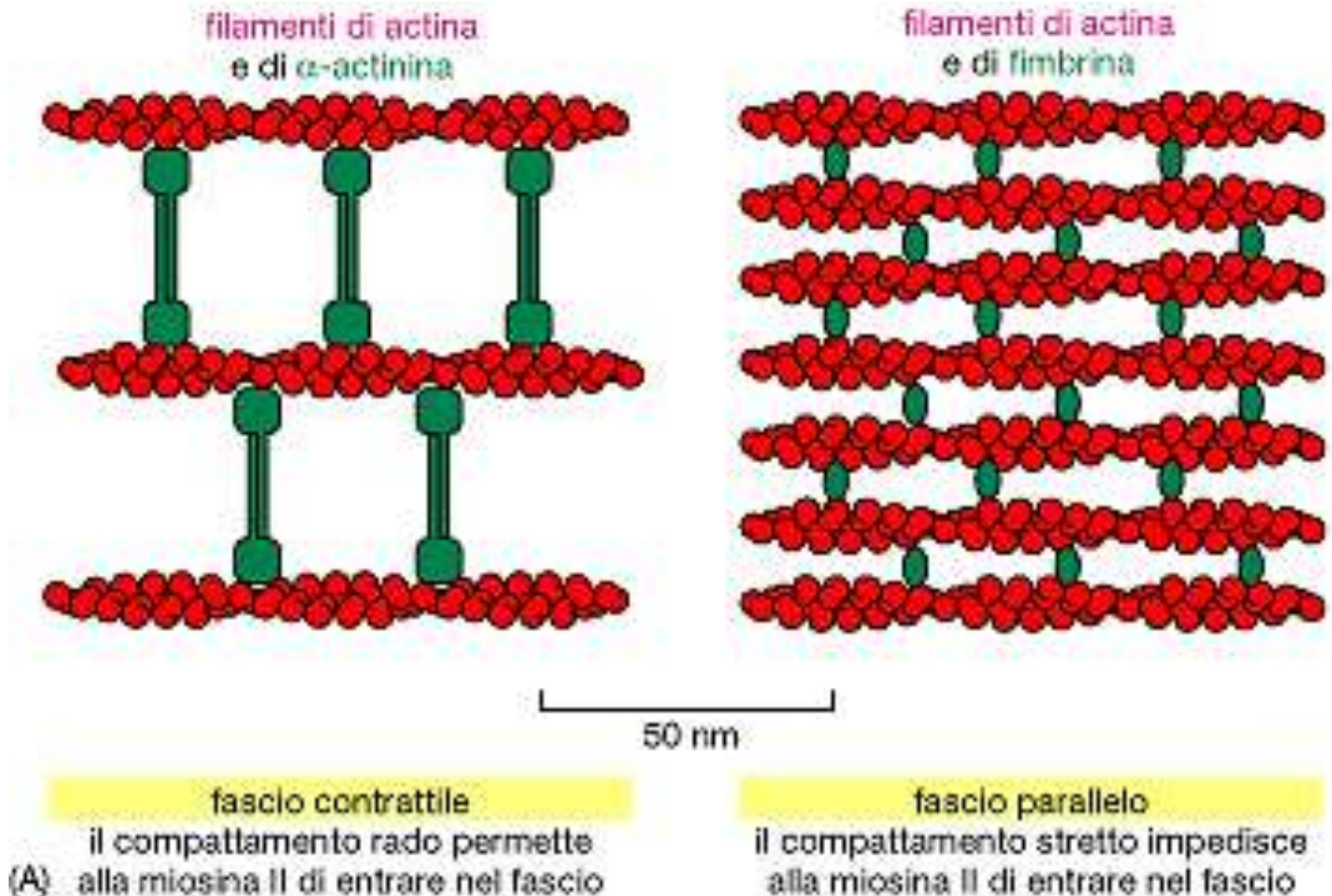
Spettrina



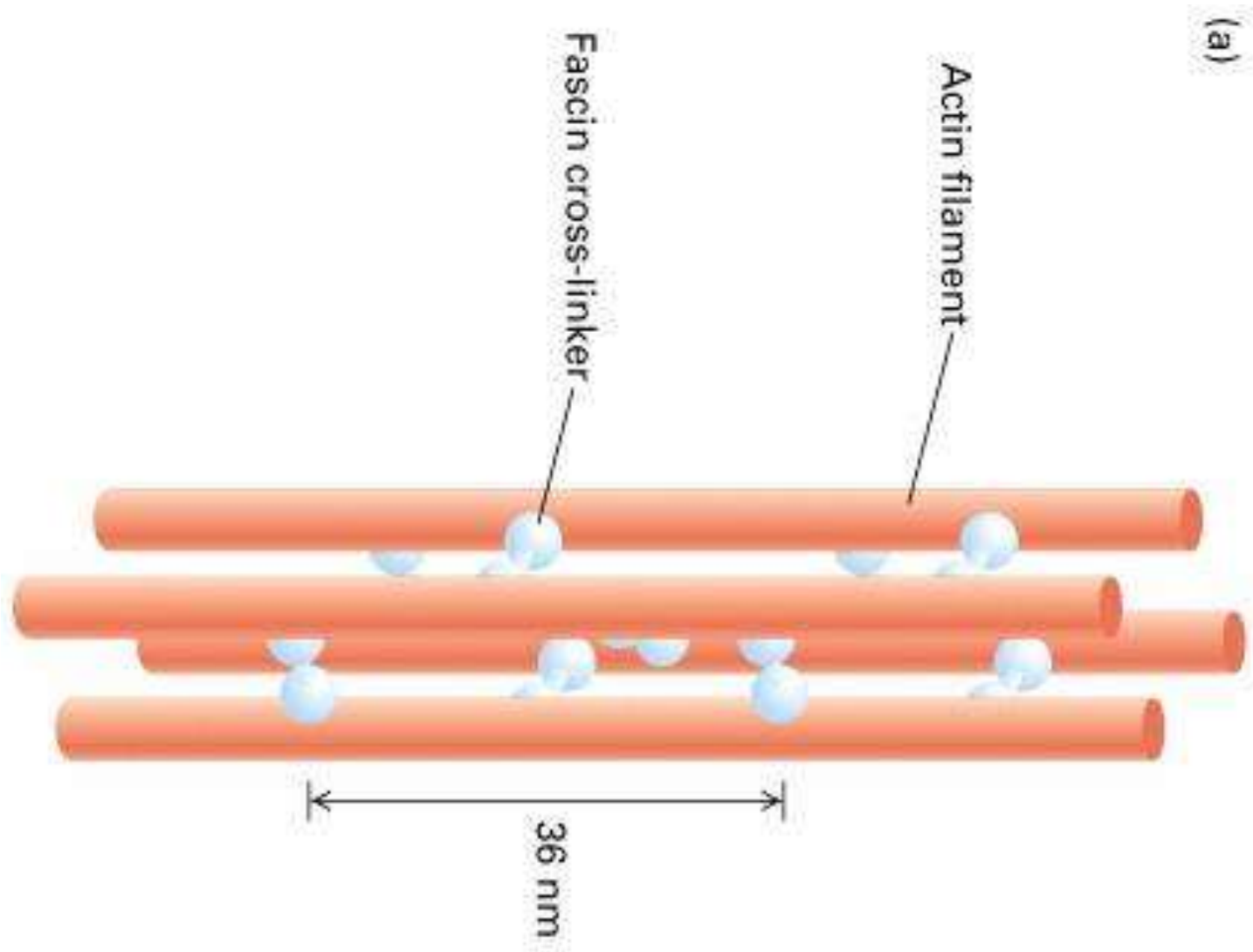
ERM



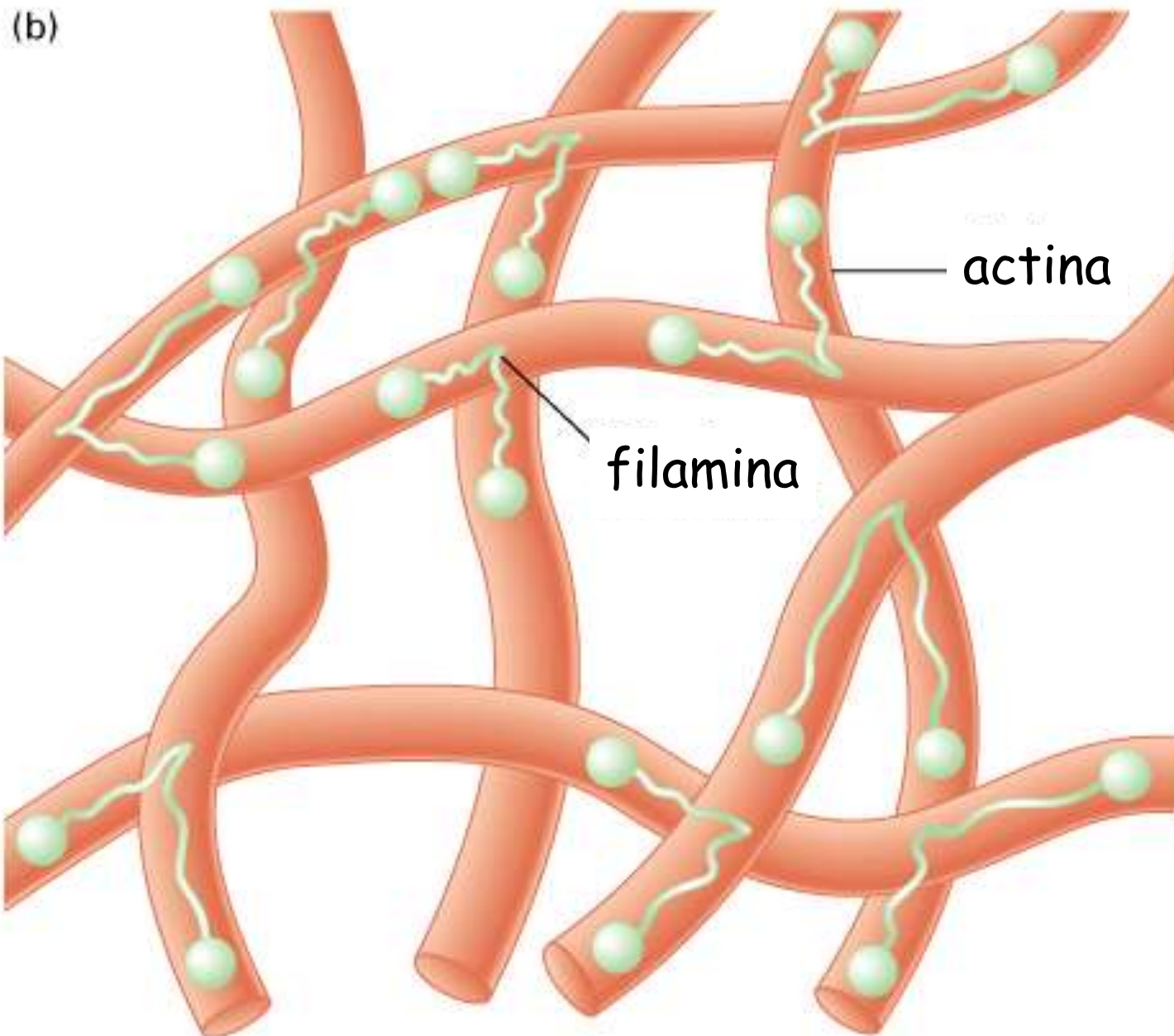
α -ACTININA E FIMBRINA PROMUOVONO LA FORMAZIONE DI FASCI DI ACTINA



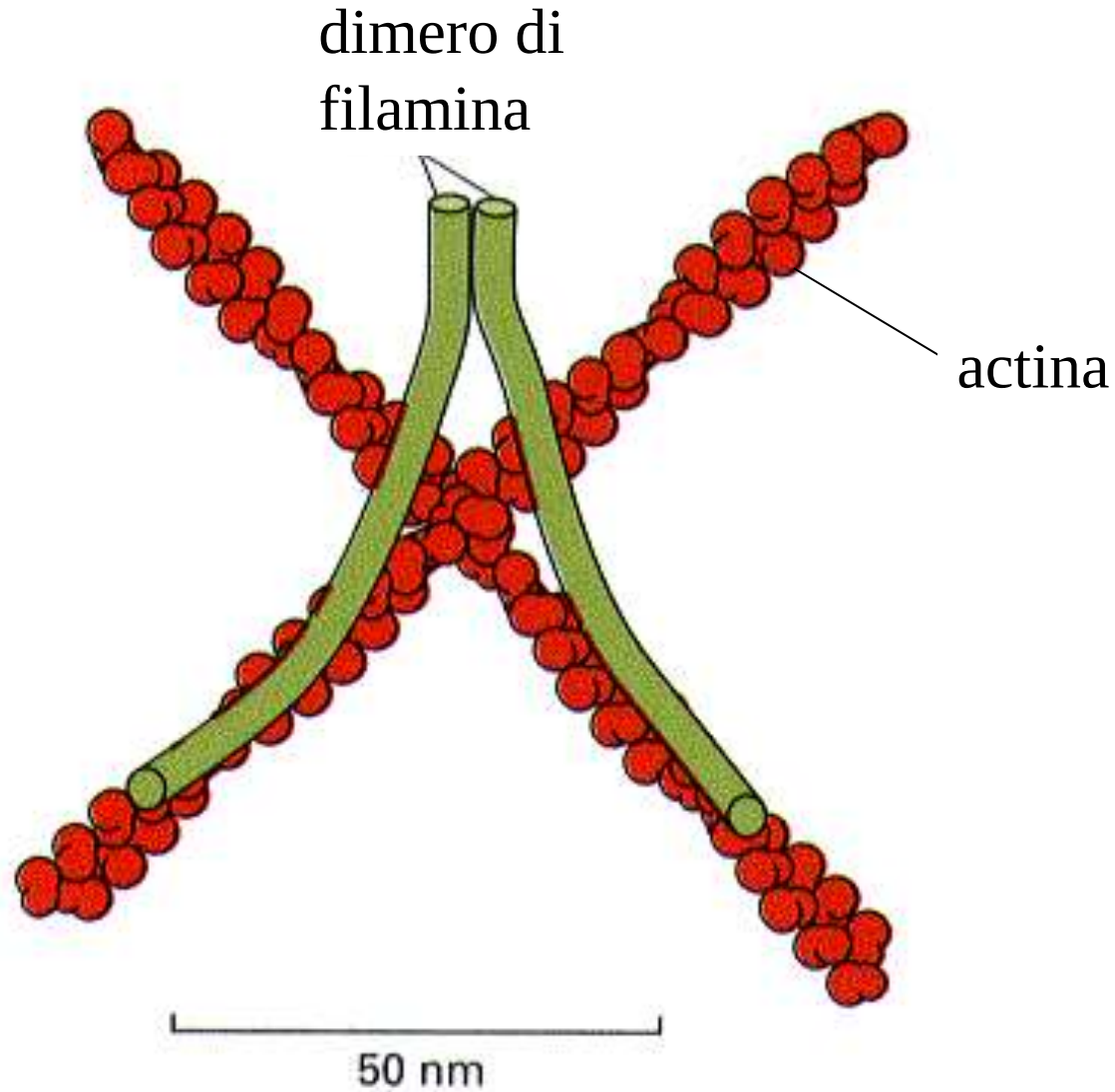
FASCINA PROMUOVE LA FORMAZIONE DI FASCI DI ACTINA



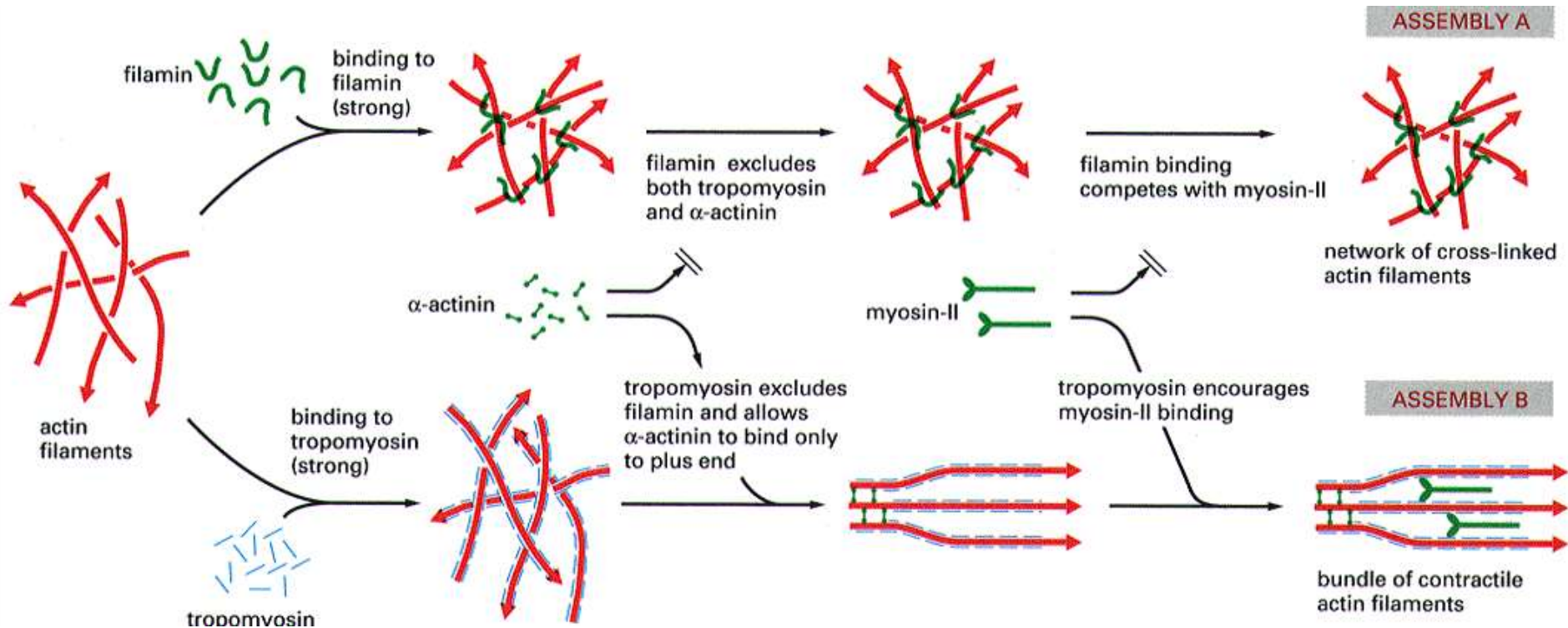
LA FILAMINA INDUCE LA FORMAZIONE DI UN GEL



IL DIMERO DI FILAMINA LEGA DUE FILAMENTI DI ACTINA



FILAMINA E TROPOMIOSINA SI LEGANO ALLA ACTINA IN MODO ESCLUSIVO



I filamenti del citoscheletro possono organizzarsi in strutture di ordine superiore:

- I filamenti intermedi formano legami crociati e si associano in fasci molto forti; associazione mediata anche da proteine come la *filaggrina* (forma fasci di filamenti di cheratina), la *plectina* (forma fasci di vimentina)
- i filamenti di actina possono organizzarsi con *proteine che formano fasci* (legami crociati tra filamenti di actina) e *proteine che formano gel* (tengono insieme due filamenti di actina angolati tra loro)

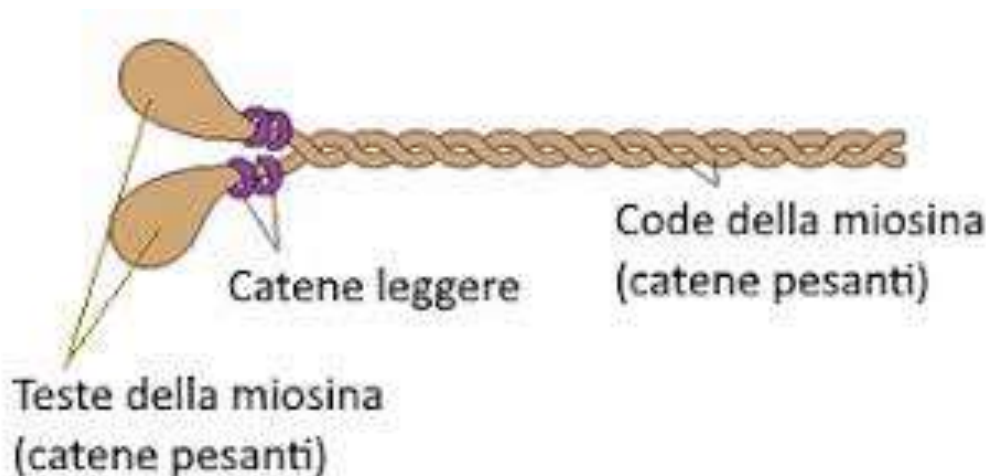
PROTEINE MOTRICI

- Motori molecolari che si associano ad un filamento del citoscheletro e usano l'energia derivata dall'idrolisi dell'ATP per muoversi in modo costante lungo di essi
- diverse per il filamento a cui si attaccano, per la direzione in cui si muovono e per il cargo che portano
- possono trasportare organelli (es mitocondri), fanno scivolare i filamenti del citoscheletro l'uno sull'altro
- si associano ai filamenti del citoscheletro tramite un *dominio motore* che si lega all'ATP e lo idrolizza
- dopo aver svolto l'azione motoria possono staccarsi dal filamento.

PROTEINE MOTRICI ASSOCIATE AI FILAMENTI DI ACTINA

MIOSINA:

- prima proteina motrice identificata
- responsabile della generazione della forza per la contrazione muscolare
- esistono diversi tipi di miosina, differenti per strutture e tessuto in cui sono presenti;
- la più diffusa è quella del muscolo scheletrico, detta [miosina II](#).



MIOSINA II

- Proteina allungata formata da 2 catene pesanti e 2 copie di 2 tipi di catene leggere.
- Ogni catena pesante ha un dominio di testa globulare all'N-terminale (motore) e una lunga sequenza aa che forma un coiled-coil (media la dimerizzazione).
- Le 2 catene leggere si legano vicino alle teste.
- Le code possono formare un fascio con altre molecole di miosina (interazioni coda-coda= *filamenti spessi* bipolari)
- interazione con filamenti di actina (*filamenti sottili* nel muscolo scheletrico) mediante le teste



CONTRAZIONE MUSCOLARE

PROTEINE MOTRICI ASSOCIATE AI MICROTUBULI

CHINESINA

DINEINA



PROTEINE MOTRICI ASSOCIATE AI MICROTUBULI

CHINESINA

Le chinesine hanno una testa, formata da una coppia di domini globulari, e una coda, costituita da catene proteiche con conformazione ad elica avvolte insieme. La testa e la coda svolgono funzioni specifiche: la prima si lega ai microtubuli e possiede attività

ATPasica (cioè è in grado di idrolizzare il ATP); la seconda (la coda) lega il carico che può essere rappresentato da vescicole intracellulari o anche da organelli (come i mitocondri) e ne permette così il trasporto lungo il microtubulo.

Il movimento è unidirezionale e avviene verso l'estremità (+) del microtubulo.

DINEINA

La dineina è un "motore proteico" funzionalmente e strutturalmente collegato alla miosina e alla chinesina. Accoppiare l'idrolisi dell'ATP con la generazione di energia meccanica di movimento.

Le dineine vengono suddivise in due classi funzionali: le dineine citosoliche, coinvolte nel trasporto di vescicole, organuli e cromosomi, e le dineine dell'assonema, che entrano in gioco nel movimento di ciglia e flagelli.

Il movimento della dineina avviene verso l'estremità (-) del microtubulo, mediando così il trasporto retrogrado.

