

IL CITOSCHELETRO

Maraldi Tacchetti, cap. 10

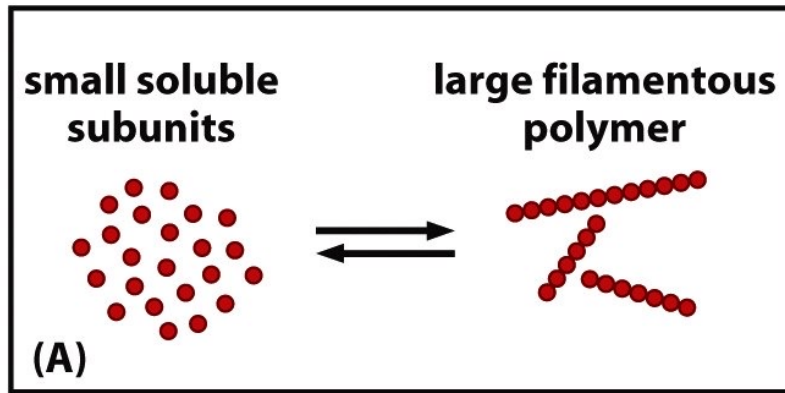
Alberts, cap. 16

Lewin, capp. 7, 8, 9

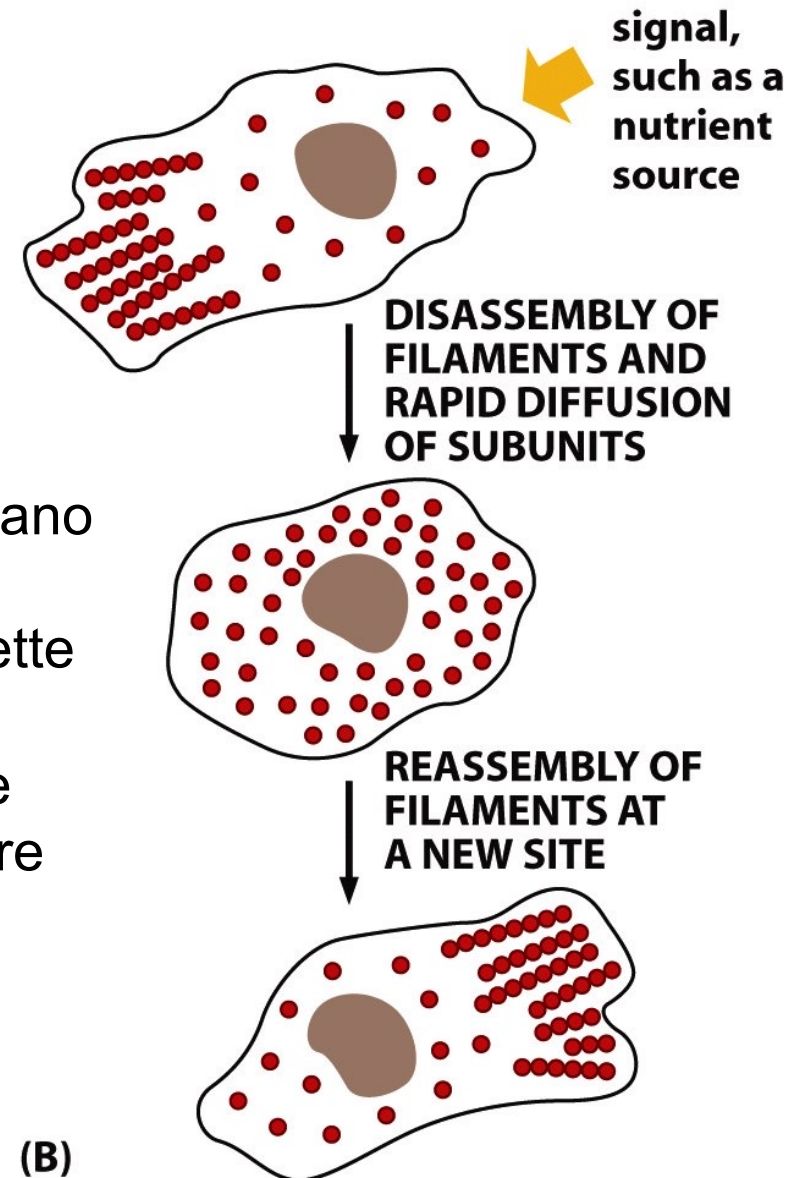
Karp, cap. 9

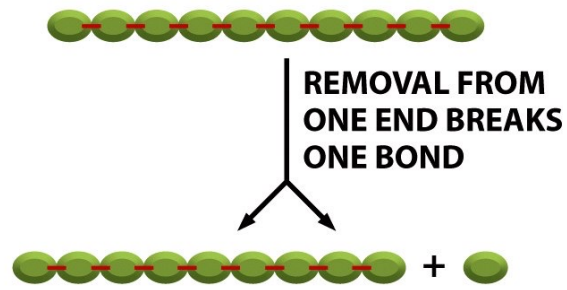
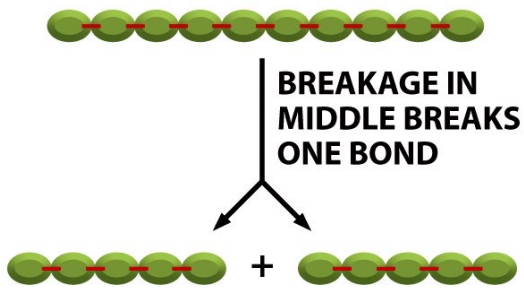
IL CITOSCHELETRO: concetti chiave

- 1: il citoscheletro e' formato da polimeri di proteine. Ogni polimero contiene molte migliaia di subunita' identiche.
- 2: il citoscheletro genera i movimenti cellulari, fornisce il sostegno meccanico alla cellula e ne coordina l'organizzazione spaziale.
3. Tutti i polimeri citoscheletrici sono dinamici, continuamente acquistano e perdono subunita' .
4. Ai filamenti sono associate centinaia di proteine accessorie responsabili della funzione, distribuzione e comportamento dinamico dei filamenti (inclusi i *motori proteici*).
5. Esistono 3 tipi di filamenti citoscheletrici: i microfilamenti, i filamenti intermedi e i microtubuli.



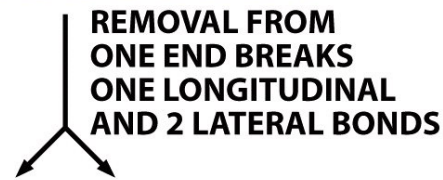
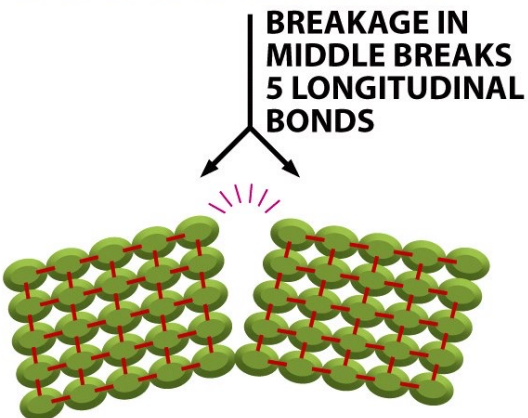
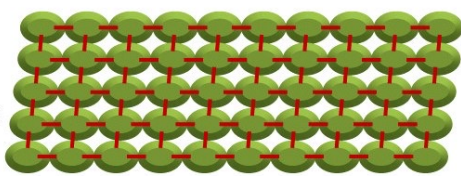
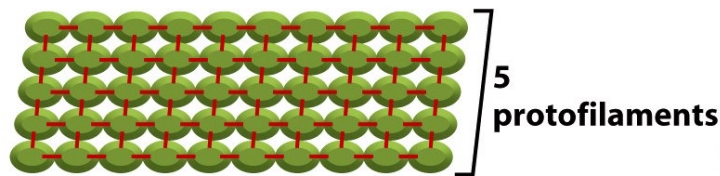
Il fatto che i filamenti citoscheletrici siano costituiti da subunità in grado di assemblarsi e disassemblarsi permette al citoscheletro di non essere una struttura statica, ma di rispondere alle modificazioni ambientali per modificare forma e funzione della cellula





Filamenti costituiti da subunità disposte in fila indiana sono sostanzialmente deboli

SINGLE PROTOFILAMENT: THERMALLY UNSTABLE

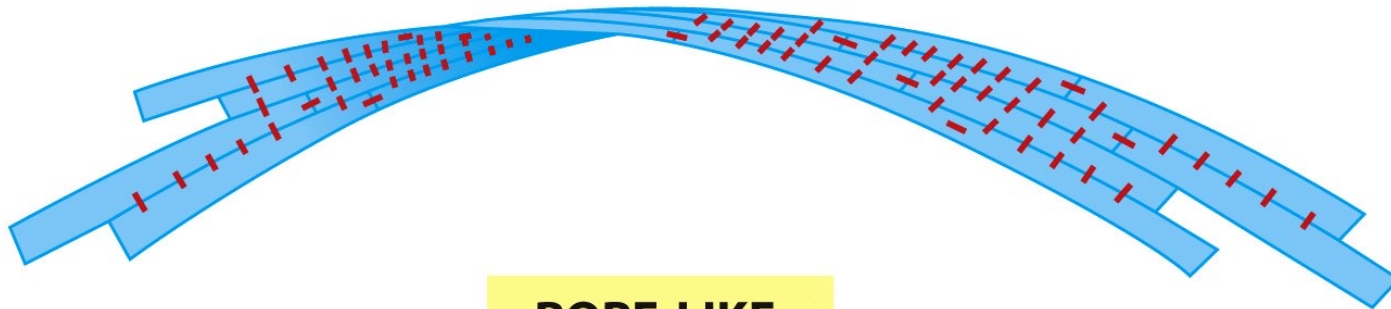
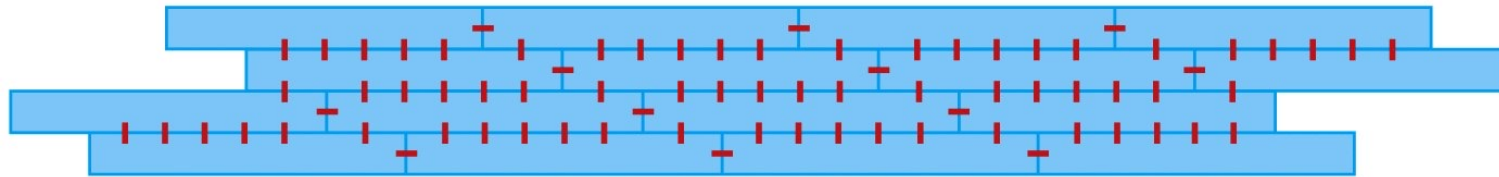


Quando vari filamenti si uniscono formando **legami laterali** tra loro, la struttura risultante sarà molto stabile e disponibile a perdere delle subunità solo dalle estremità

MULTIPLE PROTOFILAMENTS: THERMALLY STABLE

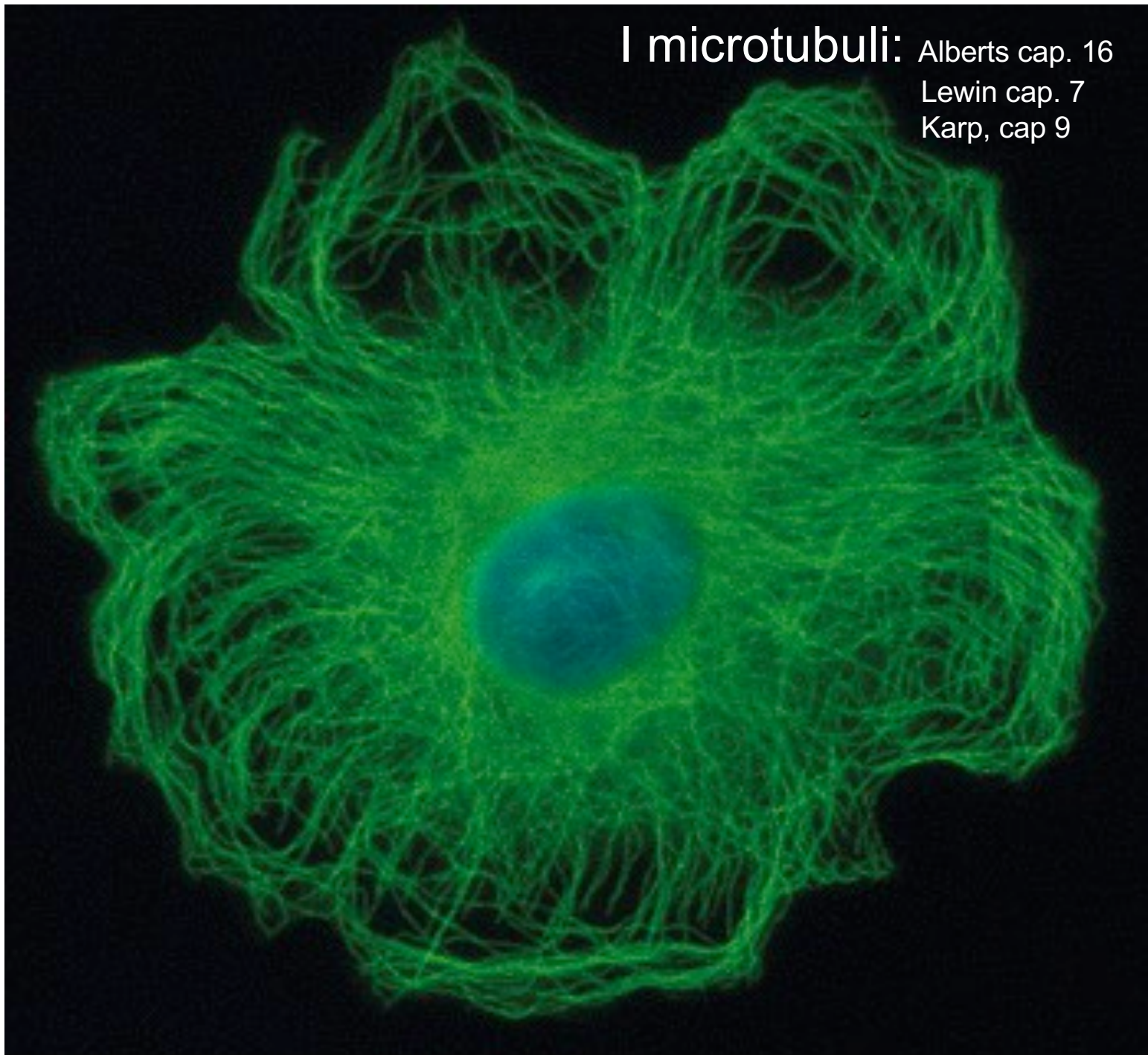
I legami laterali permettono ai filamenti di resistere anche alla torsione

staggered long subunits: lateral contacts dominate



**ROPE-LIKE
PROPERTIES**

I microtubuli: Alberts cap. 16
Lewin cap. 7
Karp, cap 9

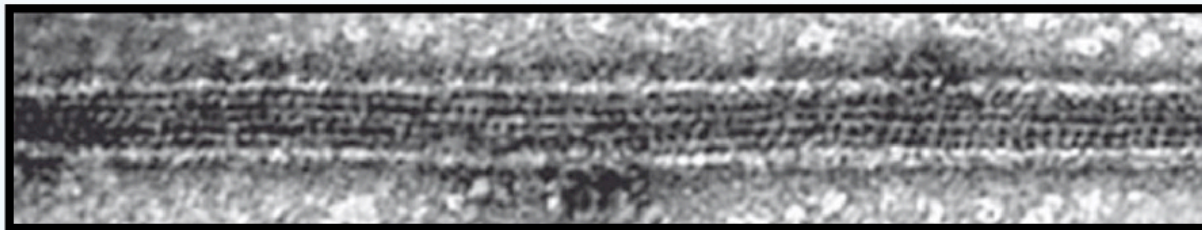


10 μ m

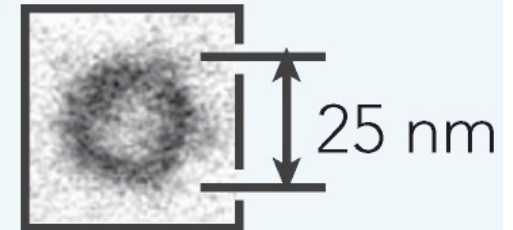
I MICROTUBULI: generalita' e funzioni

1. Sono dei tubuli di 25 nm di diametro privi di ramificazioni

Vista laterale

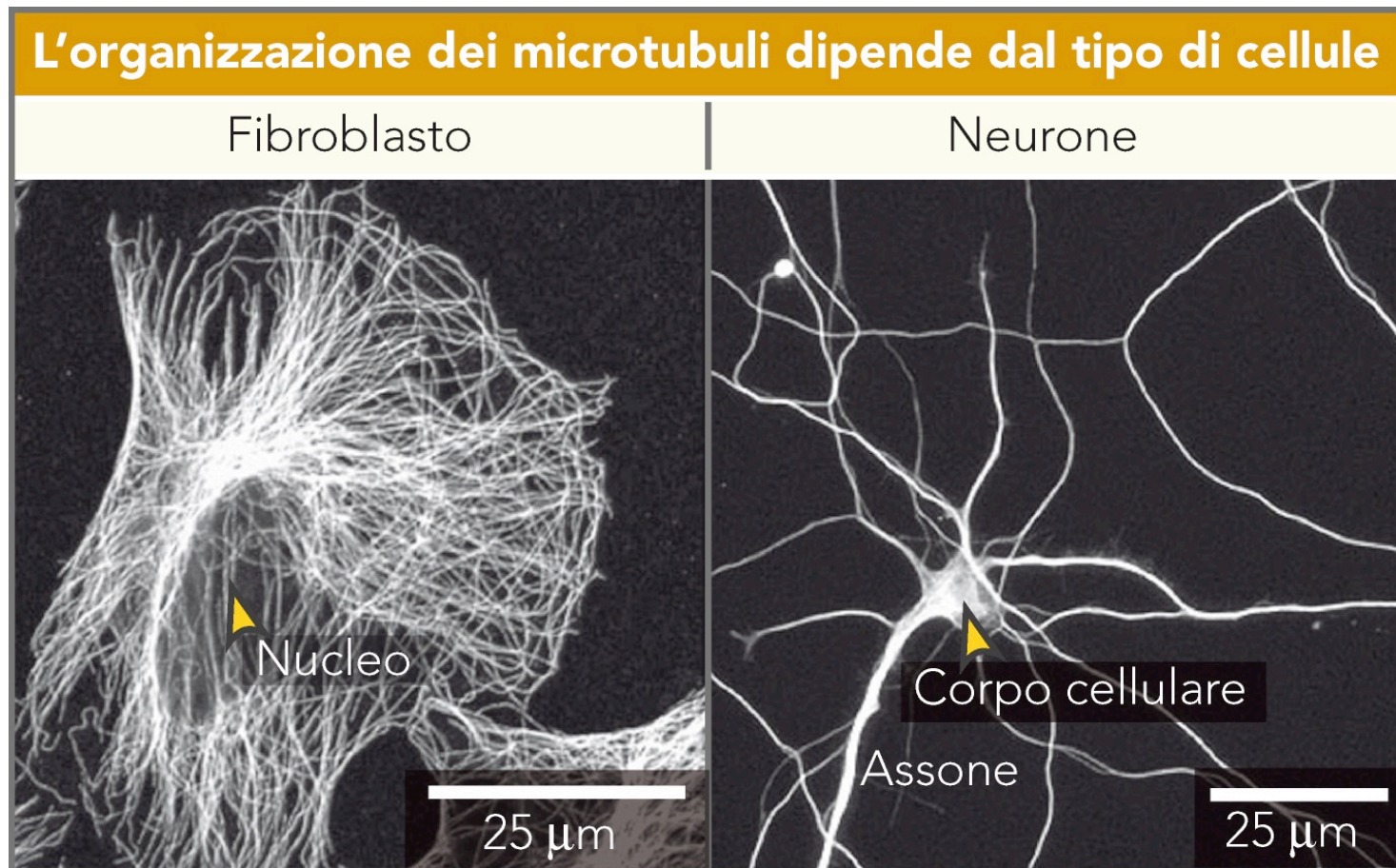


Sezione trasversale

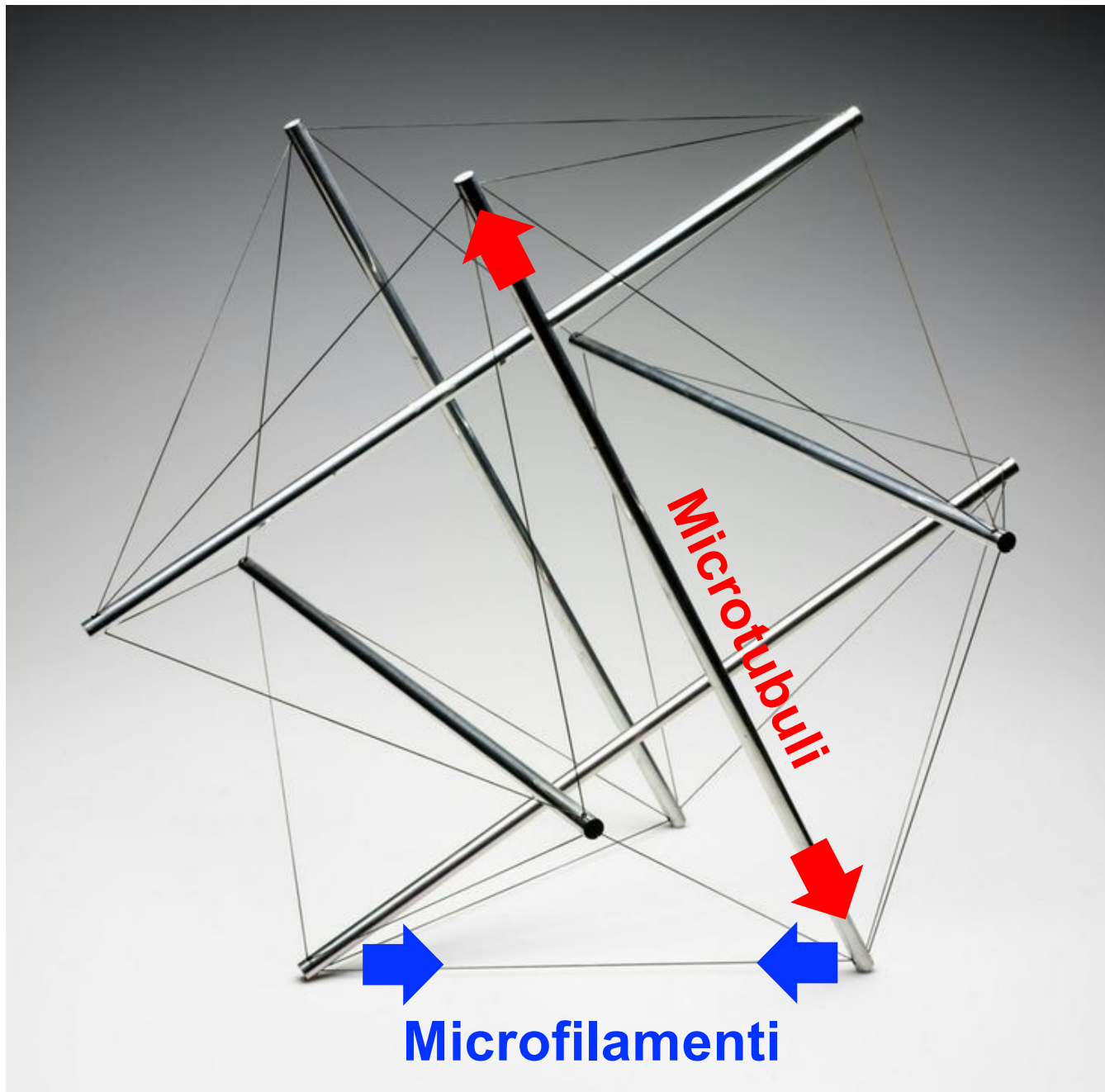


I MICROTUBULI: generalita' e funzioni

1. Sono dei tubuli di 25 nm di diametro privi di ramificazioni
2. Svolgono molteplici funzioni:
 - a. sono un'impalcatura che resiste alla deformazione per il mantenimento della forma della cellula.



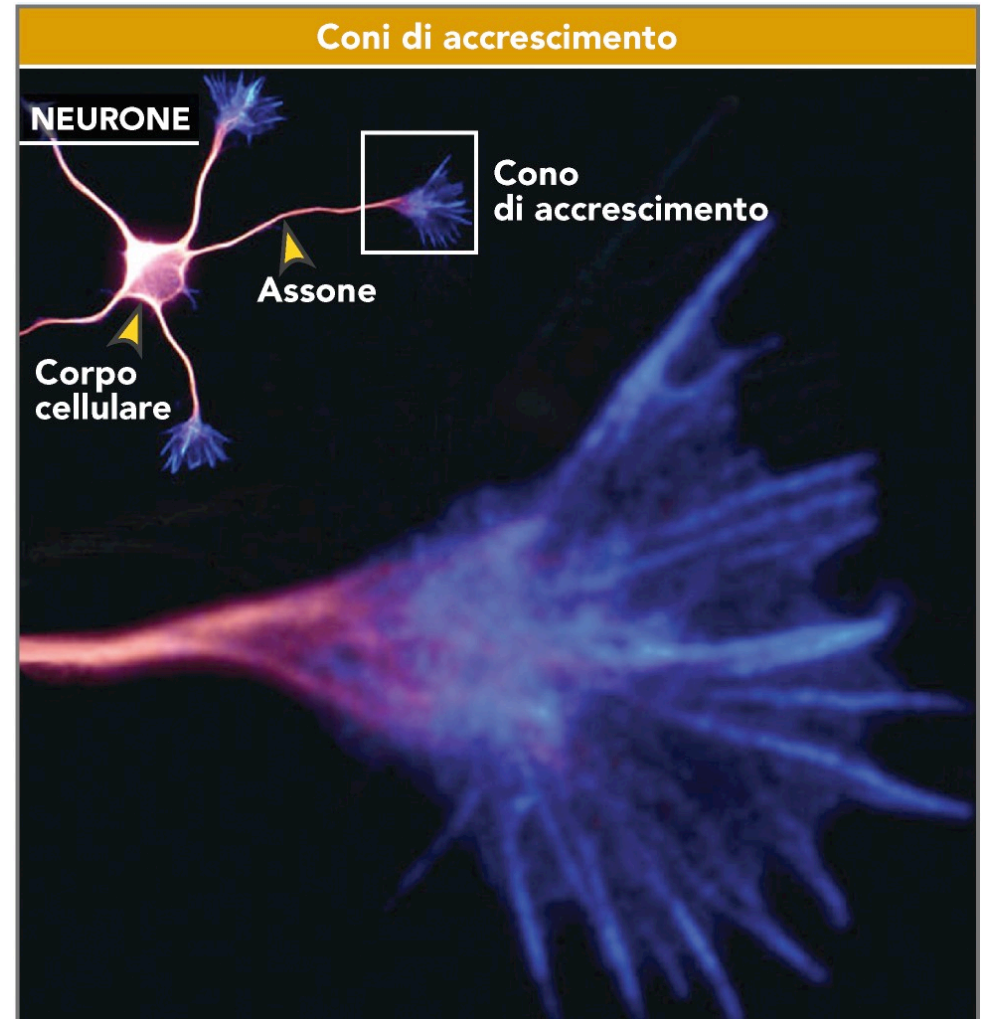
Un modello della cellula basato sul concetto di “tensegrity”



equilibrio tra
forze
compressive e
sistemi di
resistenza

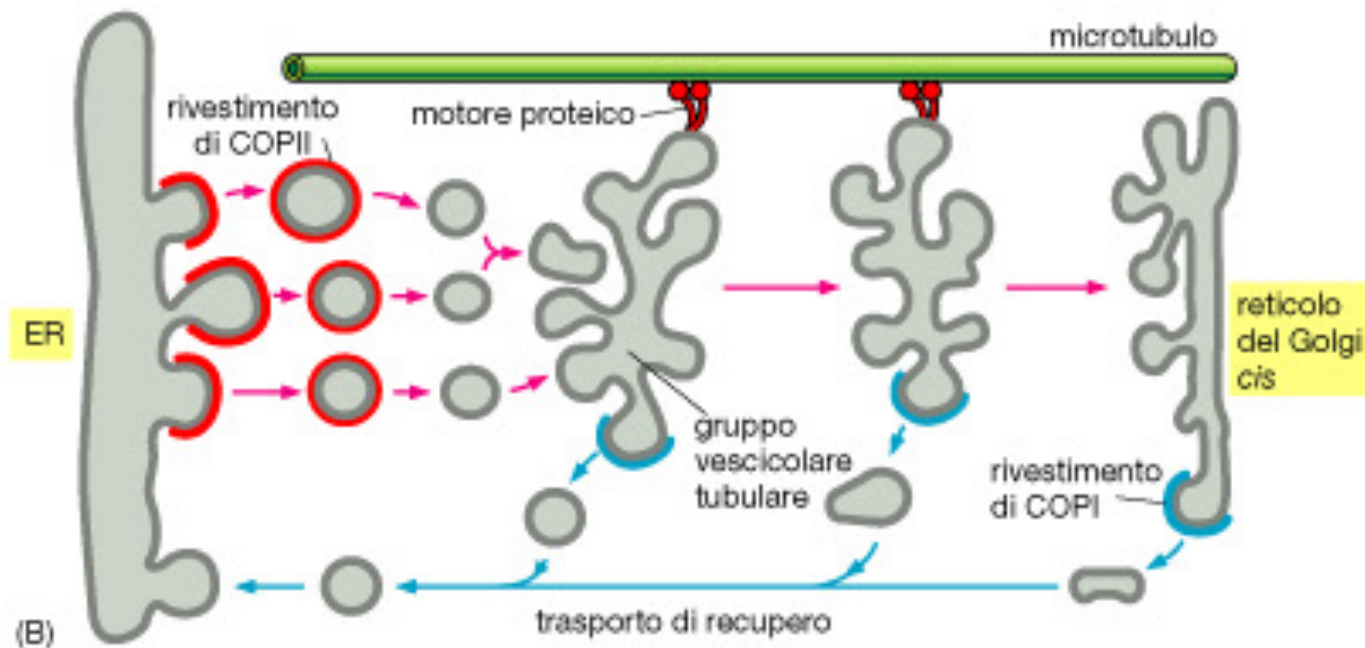
I MICROTUBULI: generalita' e funzioni

- b. sono strutture estremamente dinamiche, cosa che permette la rapida modificazione della forma della cellula.



I MICROTUBULI: generalita' e funzioni

- c. formano dei “binari” per i sistemi intracellulari di trasporto di organelli e piccole molecole grazie ai motori proteici ad essi associati.



I MICROTUBULI: generalita' e funzioni

- d. **formano strutture transitorie durante le divisioni mitotiche e meiotiche (“fusi”), che garantiscono**

il movimento ordinato dei cromosomi

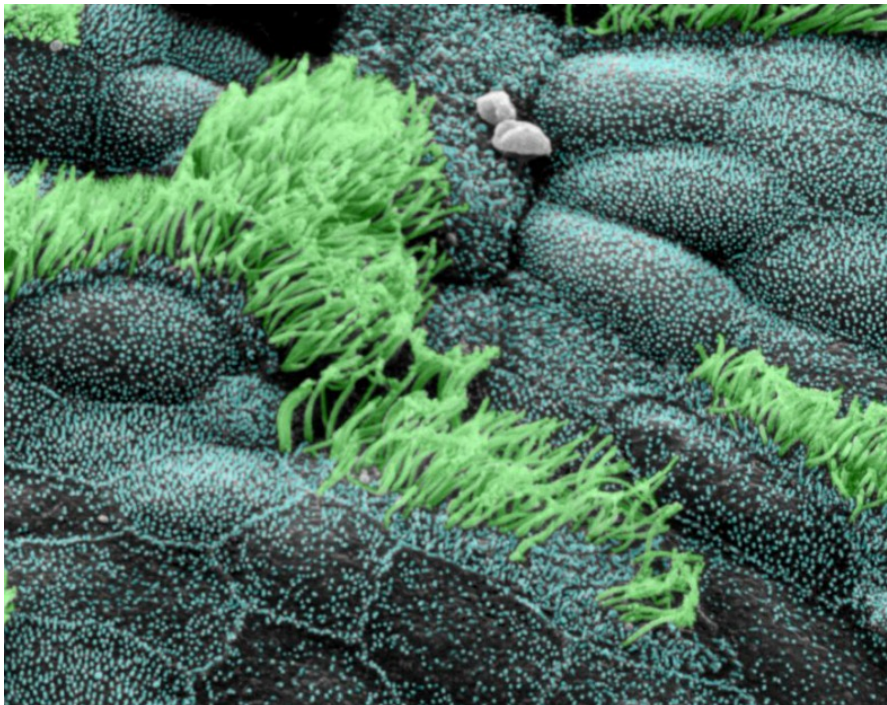
il posizionamento della piastra equatoriale (allineamento dei cromosomi)

la distribuzione dei cromosomi tra le cellule figlie



I MICROTUBULI: generalita' e funzioni

e. costituiscono gli elementi assili delle ciglia e dei flagelli. Proteine motrici associate ai microtubuli garantiscono il movimento associato a queste strutture. Questo argomento sara' il soggetto di una lezione successiva.



Struttura di un microtubulo e delle sue subunità

estremità +



estremità -

Le subunità che compongono i microtubuli (tubulina) sono costituite da un **eterodimero di α -tubulina e β -tubulina**.

Ambedue le proteine sono legate al **GTP**, ma quello dell' α -tubulina è nascosto dal legame con la β -tubulina, mentre quello della β -tubulina è esposto ad una estremità della proteina.

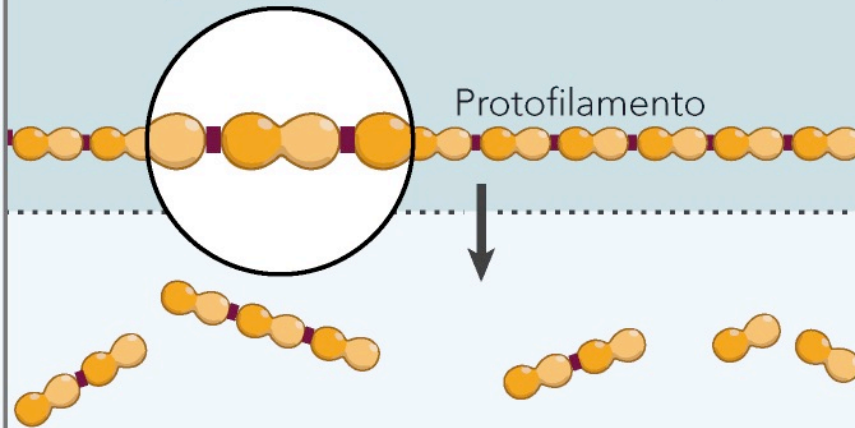
Questo determina una **polarità dell'eterodimero e dei filamenti**: l'estremità con la β -tubulina si dice estremità +, l'altra estremità -.

La β -tubulina può idrolizzare il GTP, ma questo fenomeno non è direttamente coinvolto nella formazione dei filamenti.

I legami laterali rendono resistente un microtubulo

■ Legame **longitudinale**

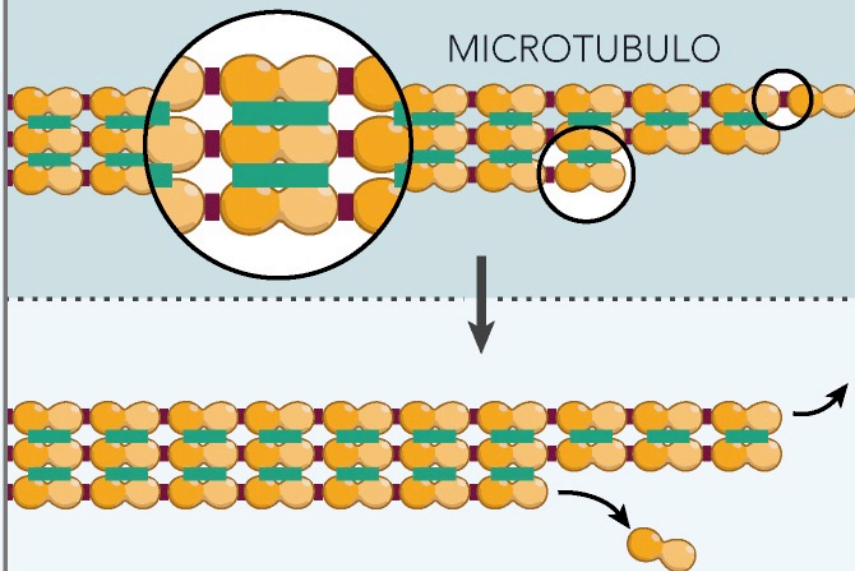
■ Legame **laterale**



Protofilamento

In un protofilamento isolato tutti i legami hanno la stessa forza e la stessa probabilità di rompersi

Frammentazione



MICROTUBULO

In un microtubulo, le subunità situate alle estremità sono mantenute in posizione da un numero minore di legami rispetto a quelle che si trovano nella porzione centrale

Le subunità vengono addizionate e sottratte soltanto a livello delle estremità

PROPRIETÀ DEI MICROTUBULI

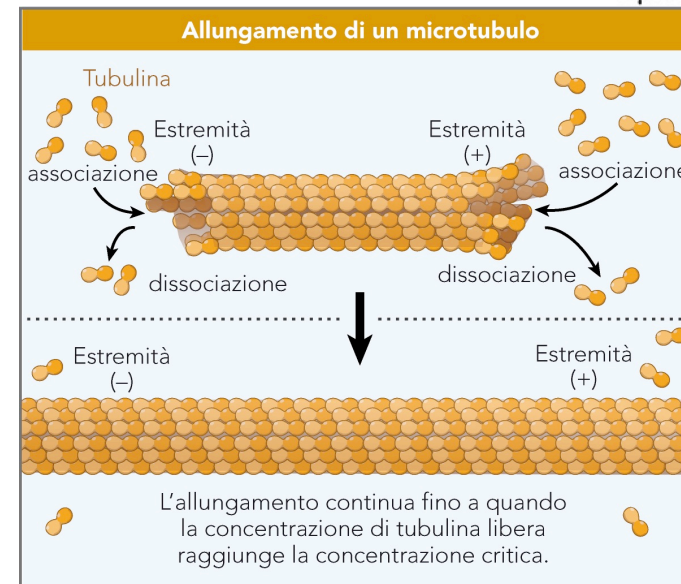
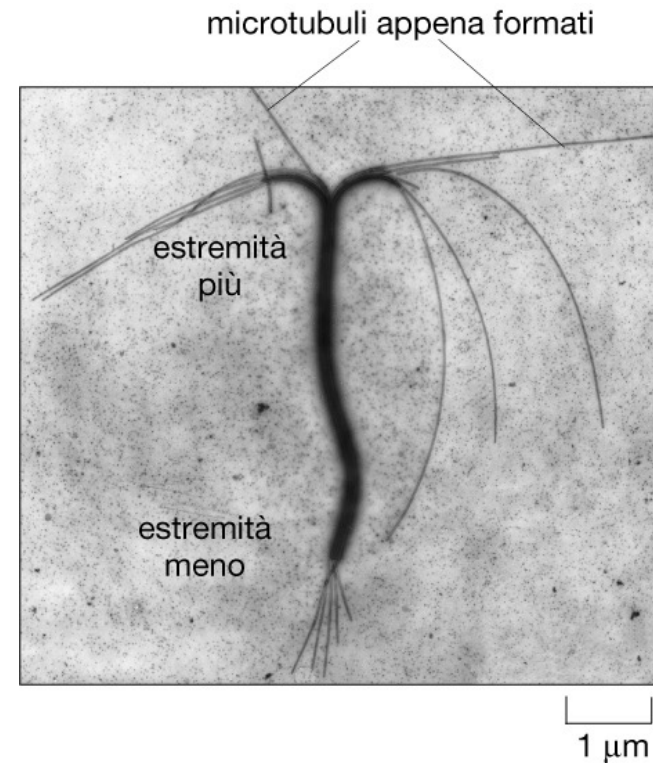
AUTOASSEMBLAGGIO:

Eterodimeri di tubulina purificata sono in grado di formare spontaneamente microtubuli in vitro.

POLARITÀ:

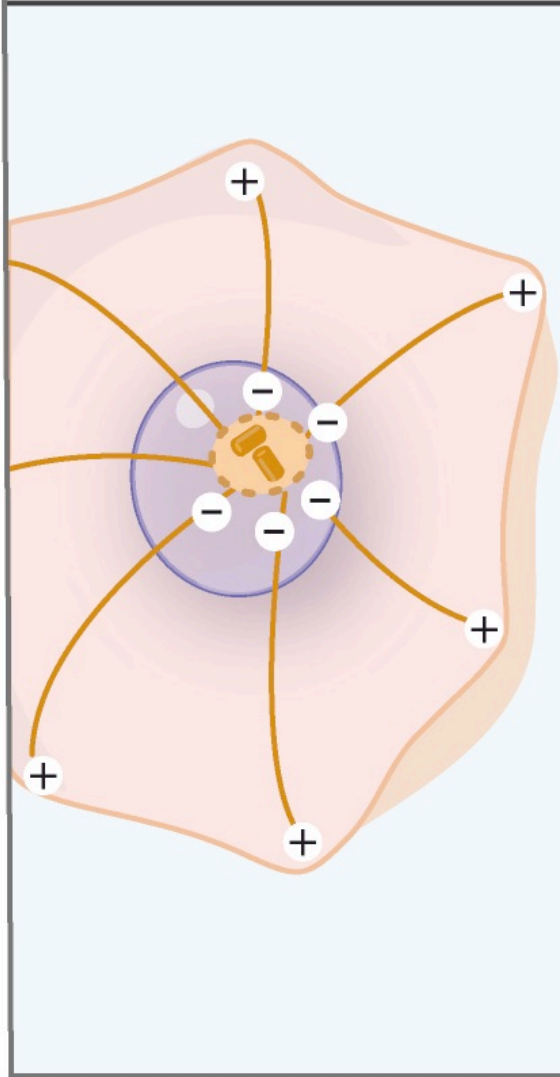
tutti gli eterodimeri all'interno di un filamento hanno lo stesso orientamento:

L'estremità + ha una velocità di polimerizzazione e dissociazione di subunità superiore all'estremità -.

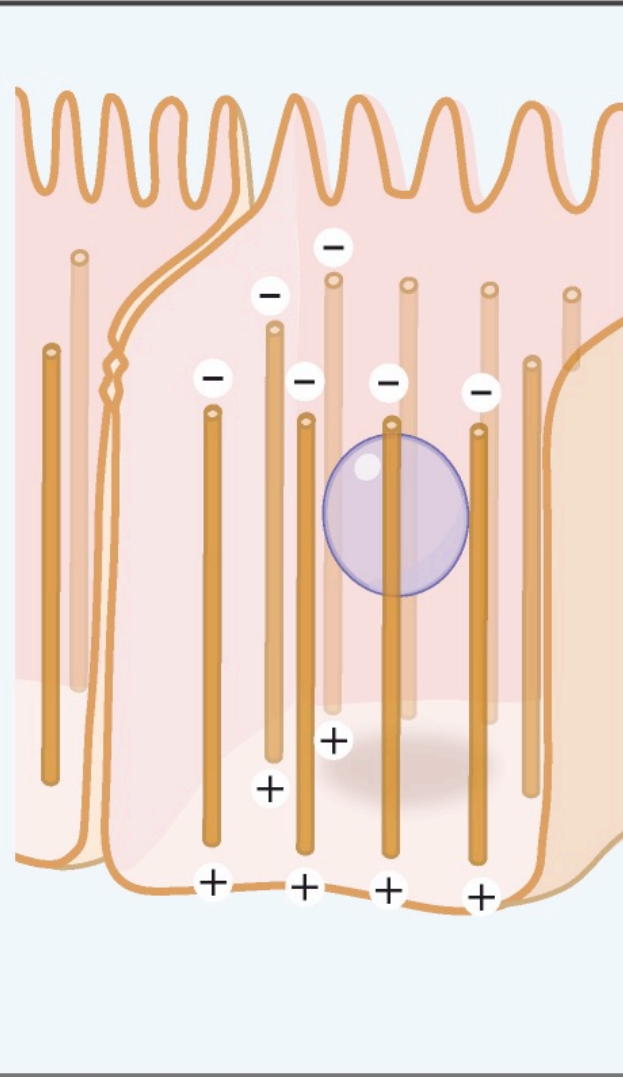


Polarità dei microtubuli nelle cellule

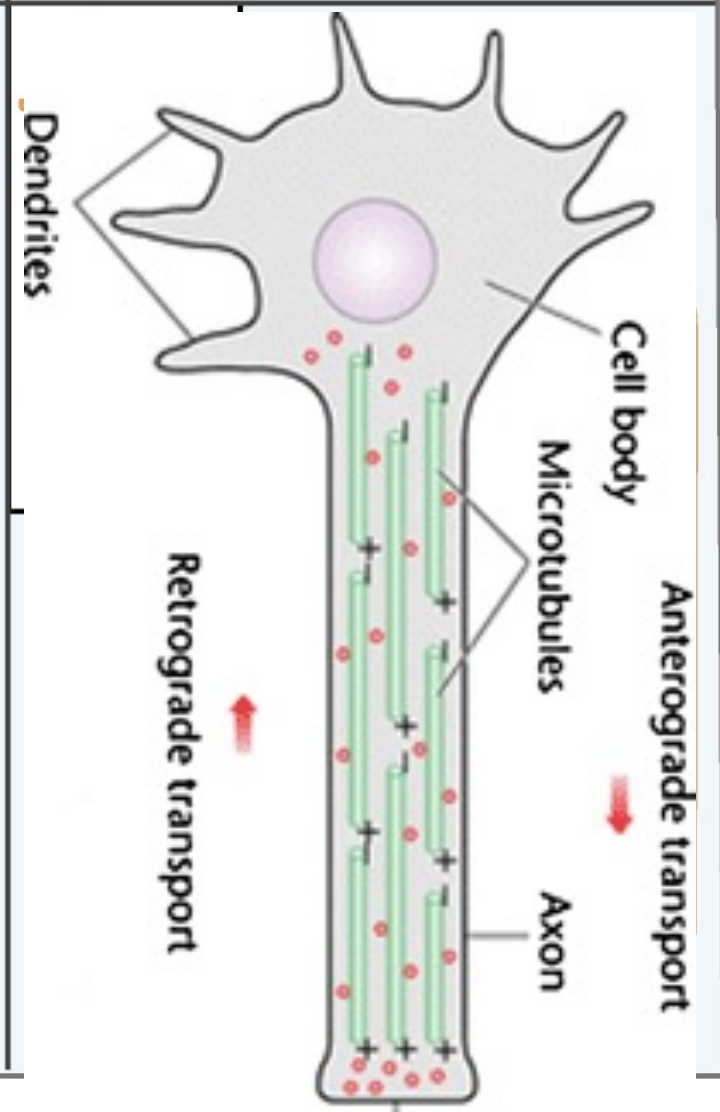
Fibroblasto



Cellula epiteliale

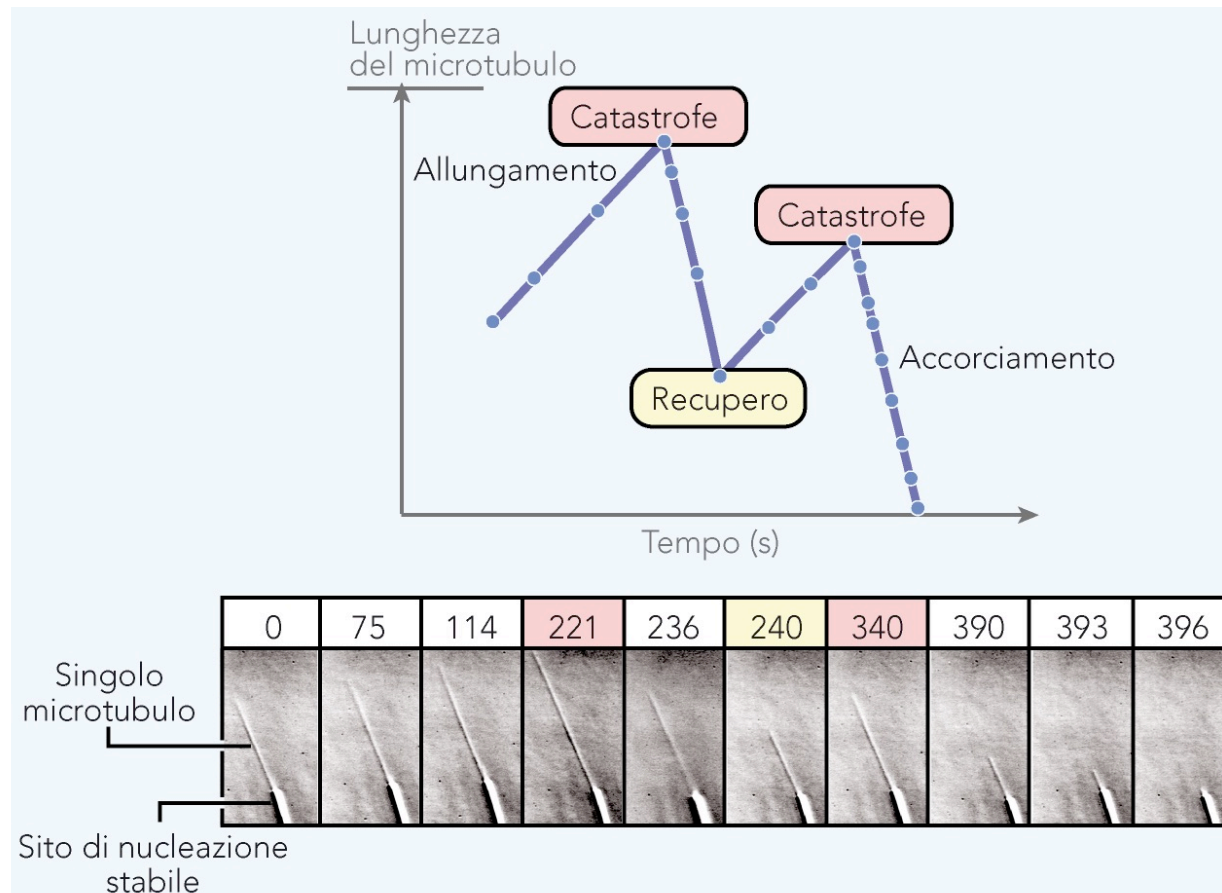


Neurone



Assemblaggio e disassemblaggio dei microtubuli avviene attraverso un processo unico chiamato **INSTABILITA' DINAMICA**

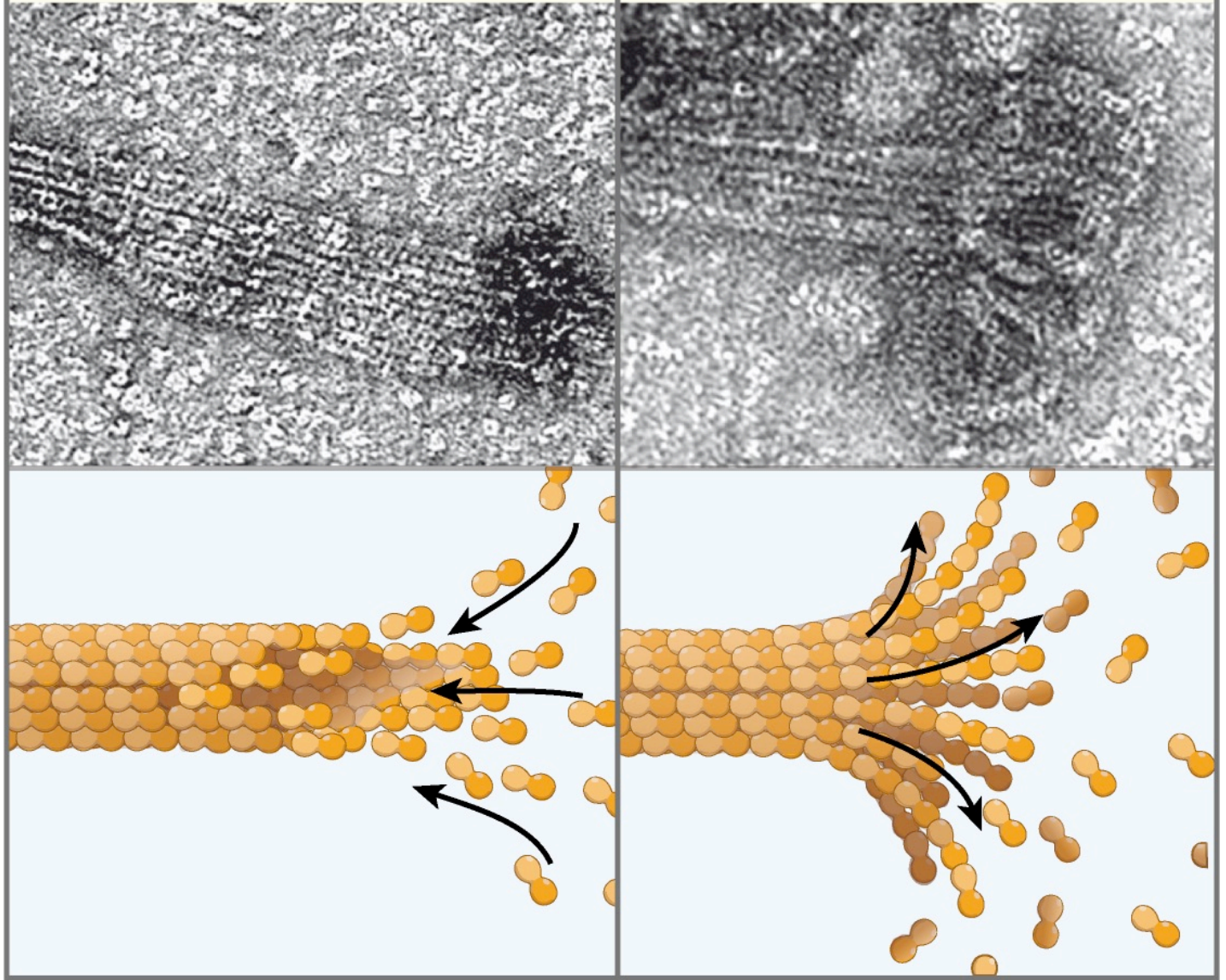
I microtubuli si alternano costantemente tra una fase di allungamento e di accorciamento (INSTABILITA' DINAMICA): le fasi di transizione sono definite come catastrofe (accorciamento) e recupero (allungamento).



Estremità di microtubuli

In allungamento

In accorciamento

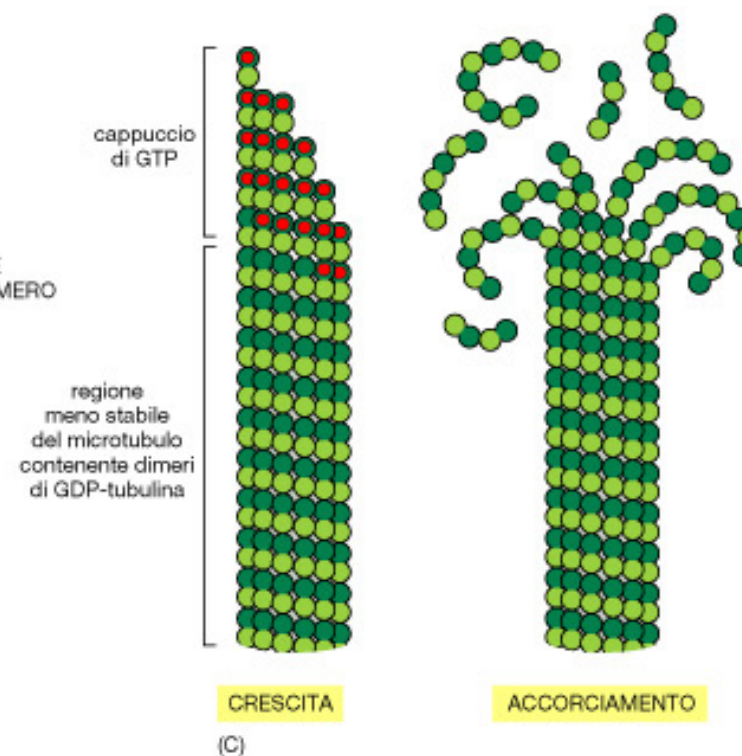
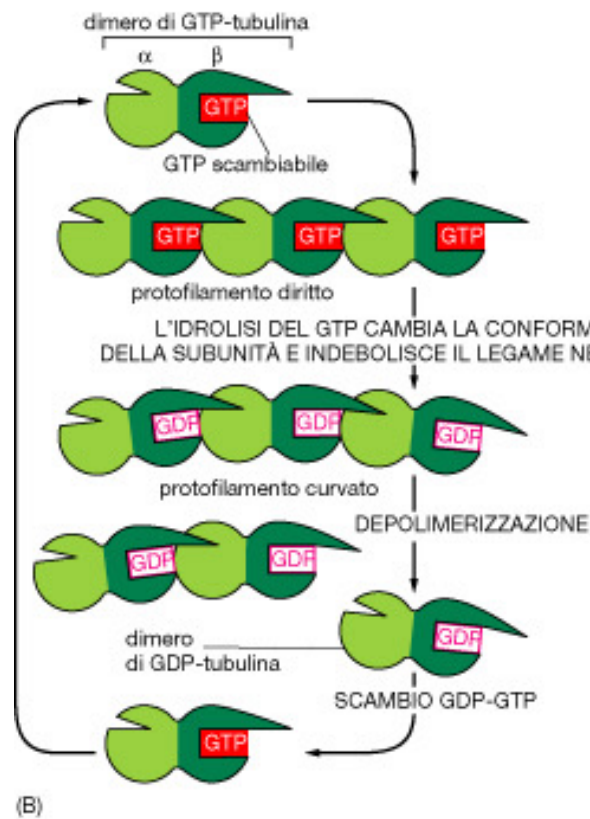


I microtubuli passano improvvisamente da uno stato in cui tutti i protofilamenti sono allineati e sempre nuove subunità vengono aggiunte (allungamento) ad uno in cui i protofilamenti si incurvano all'estremità e vengono persi i legami laterali, rendendo instabile il microtubulo (catastrofe)

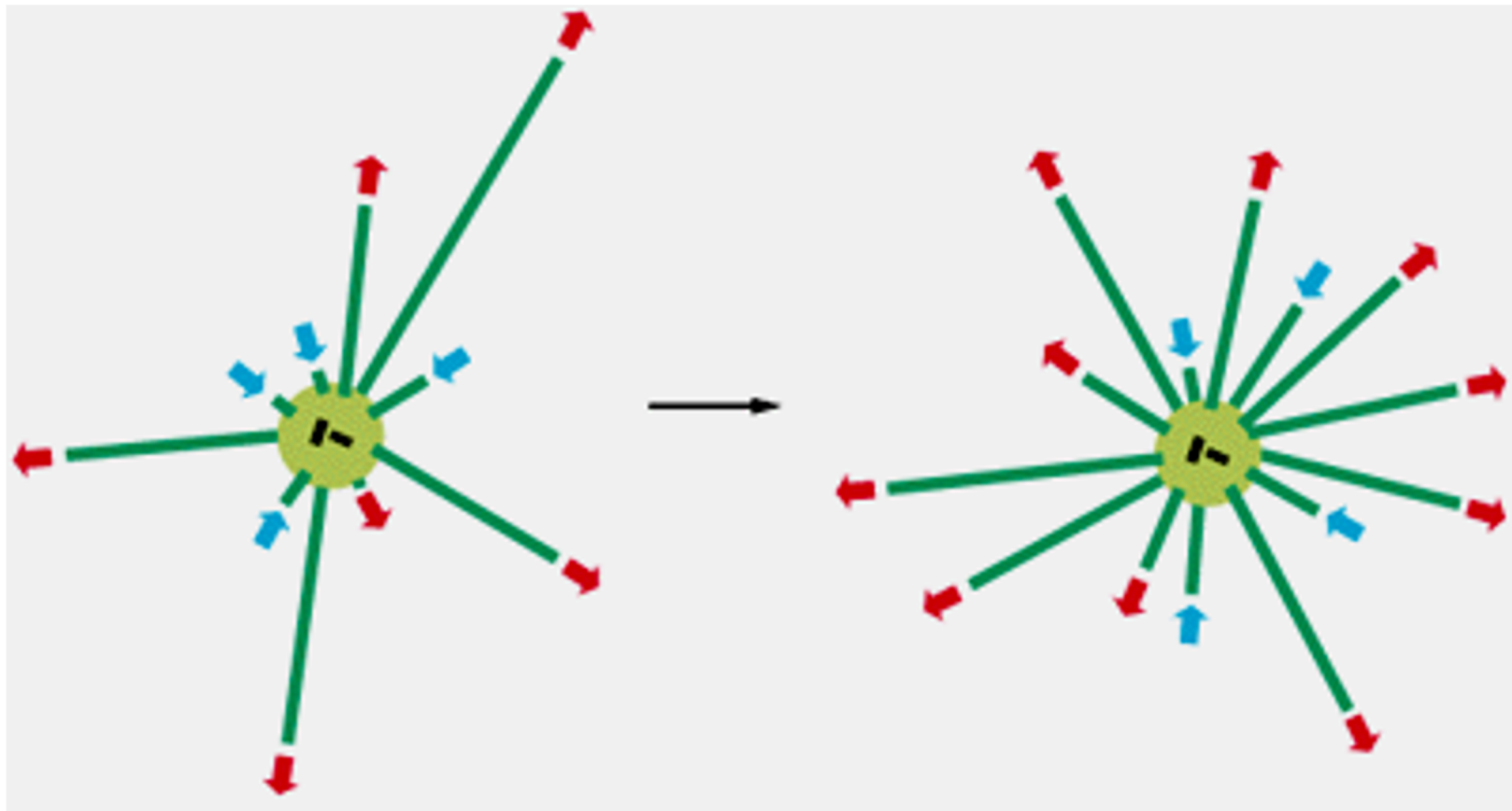


Un cappuccio di subunità' GTP-tubulina regola le transizioni dell' instabilità dinamica.

Quando il microtubulo è in fase di crescita, le nuove subunità si accumulano all'estremità + conservando il GTP legato alla β -tubulina. Questa parte è detta **cappuccio di GTP**. Se la velocità di aggiunta di nuove subunità si riduce, l'idrolisi del GTP in GDP prende il sopravvento, per cui i protofilamenti si incurvano rompendo i legami laterali. A questo punto i protofilamenti si spezzano e si ha la catastrofe.



A livello di popolazione i microtubuli si polimerizzano e depolimerizzano in modo asincrono.

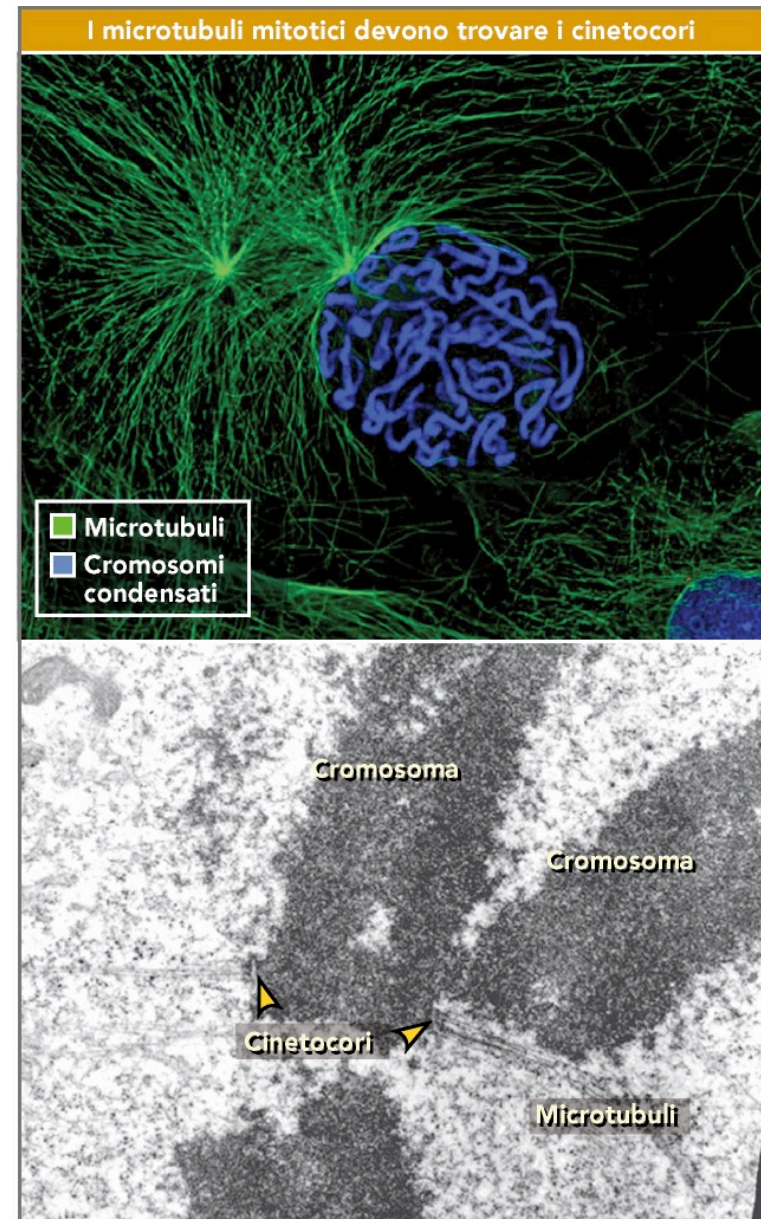


PERCHE' LE CELLULE HANNO BISOGNO DI MICROTUBULI DINAMICI?

Un polimero dinamico consuma molta energia, ma questo e' un "buon prezzo" da pagare per adattare la forma e funzione della cellula per nuovi scopi:

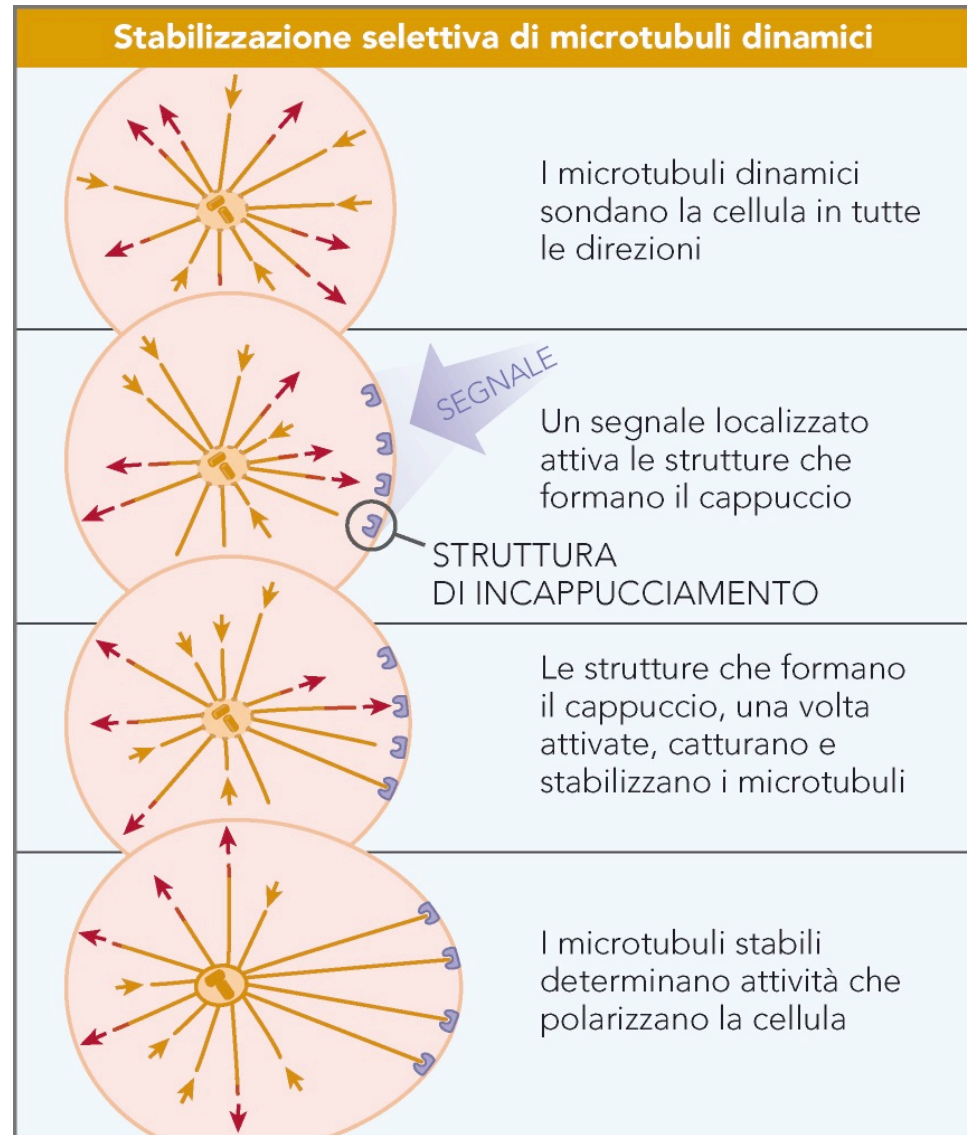
1. i microtubuli dinamici possono sondare lo spazio intracellulare e trovare bersagli indipendentemente dalla loro posizione

es: cinetocori dei cromosomi metafasici



PERCHE' LE CELLULE HANNO BISOGNO DI MICROTUBULI DINAMICI?

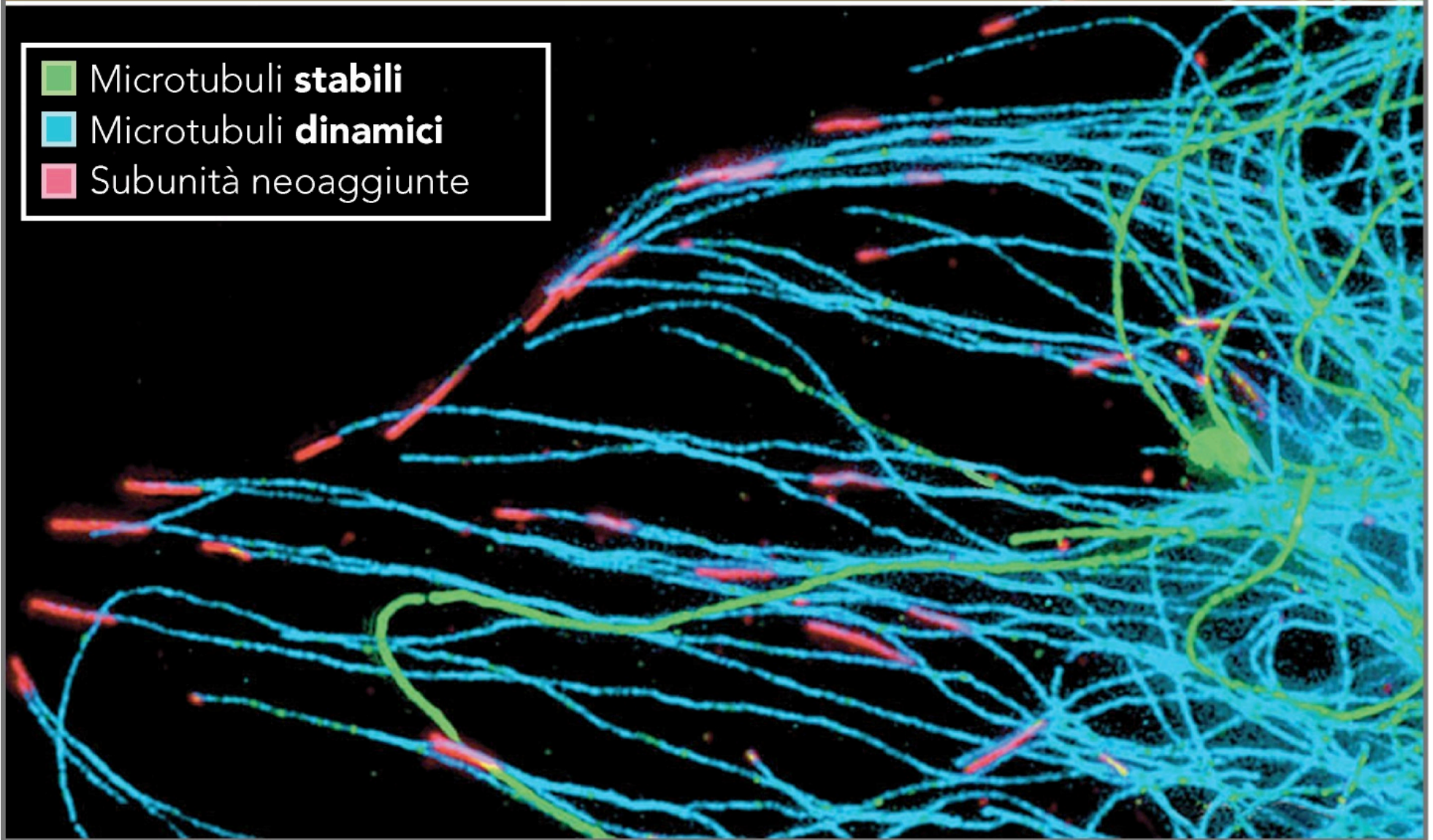
2. i microtubuli dinamici permettono alle cellule di rispondere a variazioni del loro ambiente, modificando la polarita' cellulare



**Circa il 50% dei microtubuli delle cellule sono stabili:
l'instabilità dinamica è regolata**

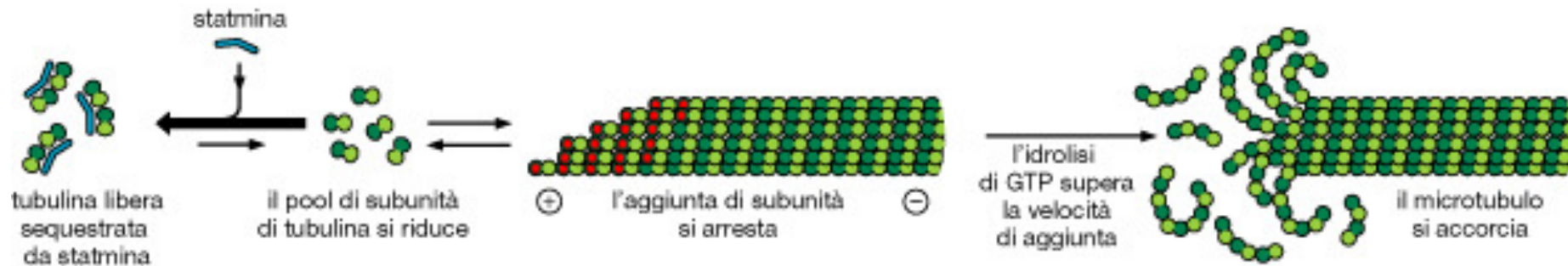
Le cellule contengono due popolazioni di microtubuli

- Microtubuli **stabili**
- Microtubuli **dinamici**
- Subunità neoaggiunte



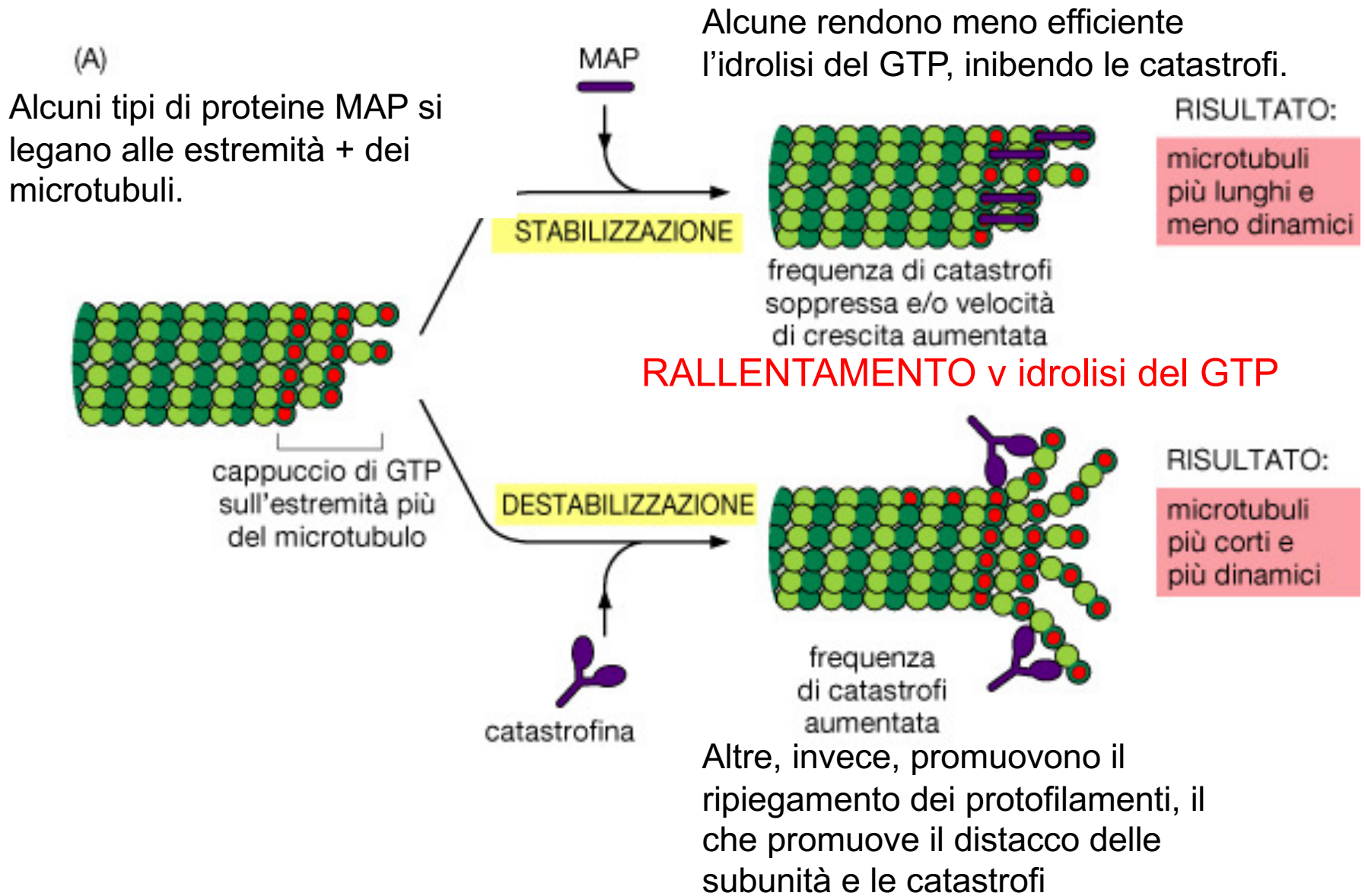
L'instabilità dinamica dei microtubuli è regolata da proteine interagenti con essi

La **statmina** lega la tubulina libera. Questa non può associarsi con le estremità + dei microtubuli. In queste estremità, quindi la velocità dell'idrolisi del GTP diventa maggiore di quella dell'aggiunta di nuove subunità, e si ha la catastrofe.



$v \text{ aggiunta monomeri} < v \text{ idrolisi del GTP}$

L'instabilità dinamica dei microtubuli è regolata da proteine interagenti con essi

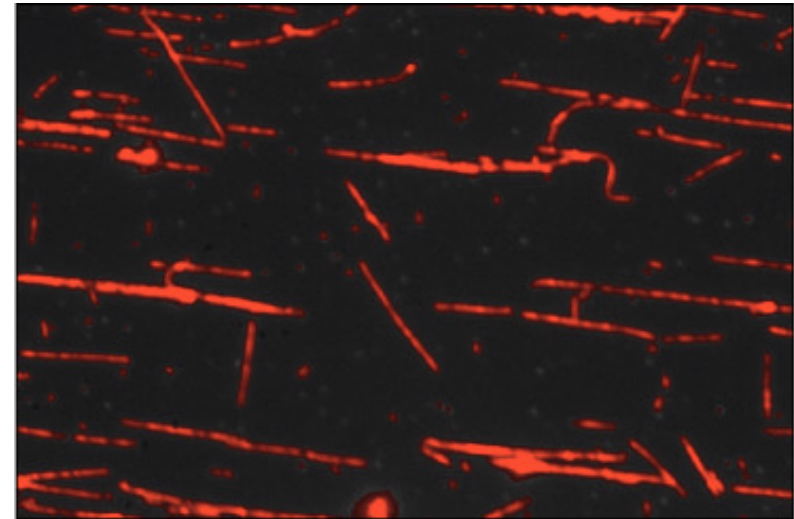
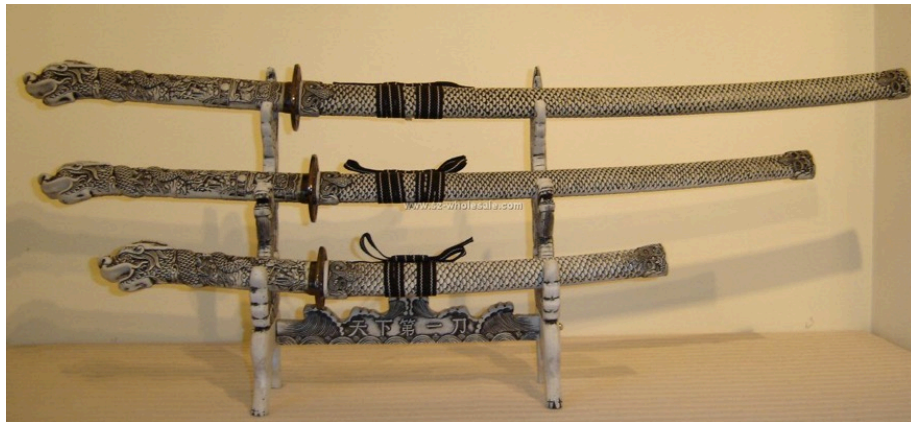


RALLENTAMENTO v idrolisi del GTP

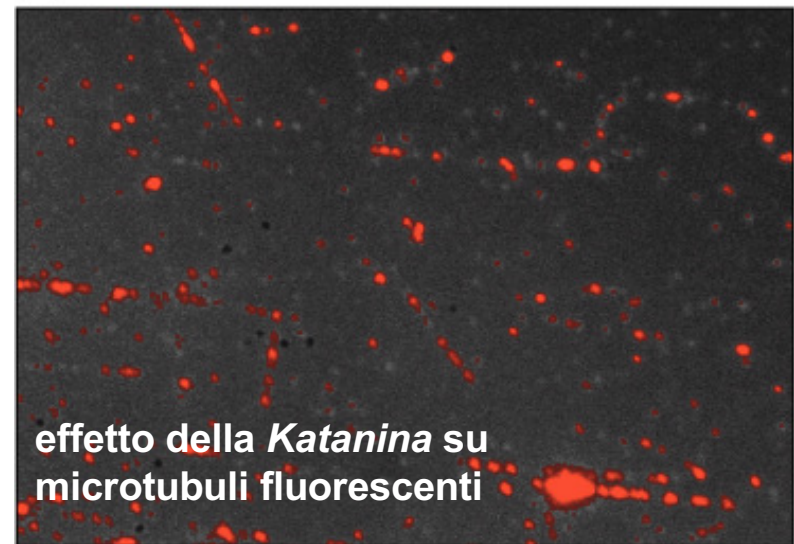
Destabilizzazione indipendente da GTP

L'instabilità dinamica dei microtubuli e' regolata da proteine interagenti con essi

La **katanina** è una proteina che rompe i legami longitudinali dei microtubuli determinando la formazione di due filamenti più corti. Uno dei due filamenti avrà l'estremità + priva di cappuccio di GTP, ed andrà incontro a catastrofe.



(A)



(B)

20 μm

Le cellule richiedono l'instabilità dinamica:

Microtubuli troppo instabili = morte cellulare

Microtubuli troppo stabili = morte cellulare

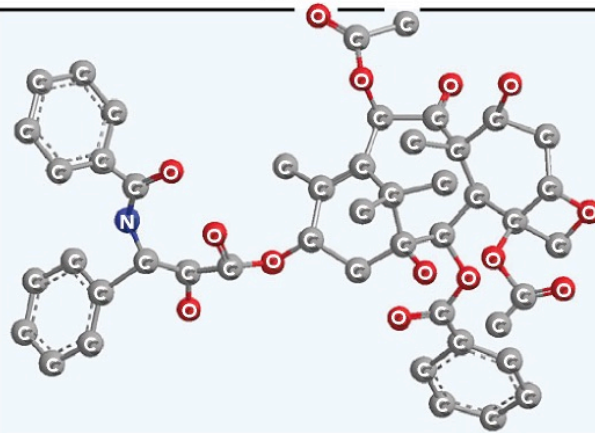
Le cellule richiedono equilibrio tra stabilità ed instabilità dei
microtubuli

Piccole molecole organiche che interferiscono con la polimerizzazione dei microtubuli vengono utilizzate in medicina



Farmaci che interagiscono con i microtubuli

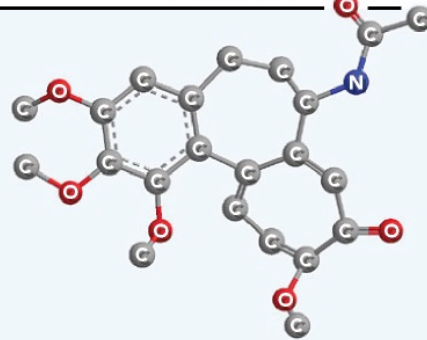
Taxol™



Taxolo:
microtubulo **piu'** stabile
perche' impedisce la
dissociazione dei microtubuli

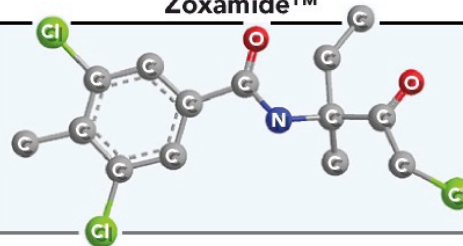


Colchicina



Colchicina:
microtubulo **meno** stabile
perche' impedisce 'aggiunta
di nuove subunita'

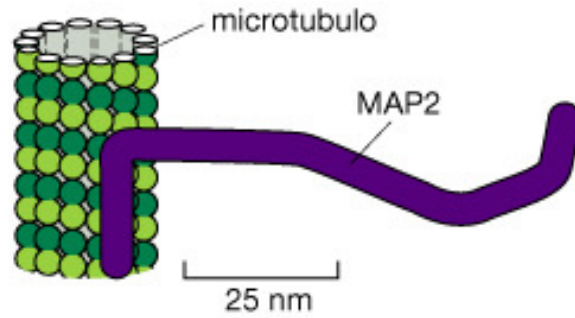
Zoxamide™



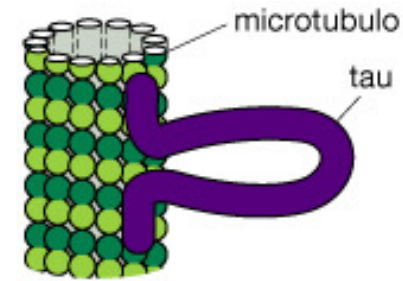
Zoxamide:
destabilizza specificamente la
tubulina dei funghi. e' usato
come fungicida

La struttura del citoscheletro di microtubuli

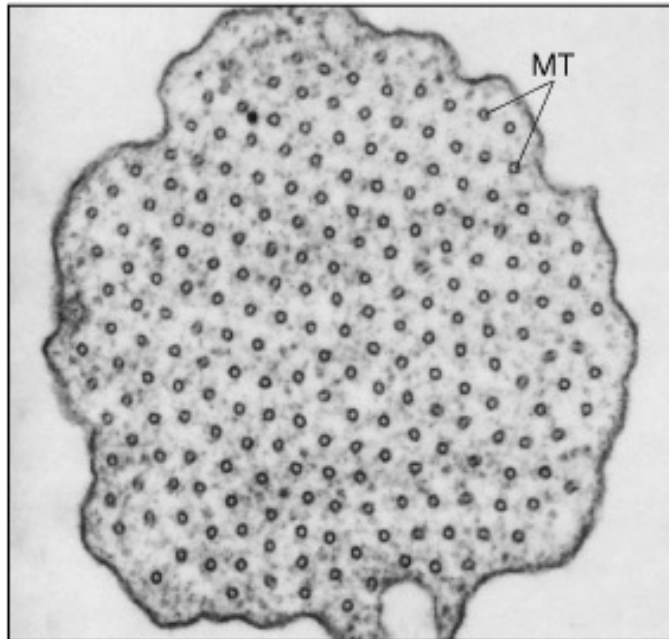
Alcune proteine MAP permettono ai microtubuli di interagire con microtubuli adiacenti, formando **legami crociati**, e consentendo la formazione di fasci di microtubuli. Questi fasci saranno più o meno lassi a seconda del tipo di proteina MAP coinvolta



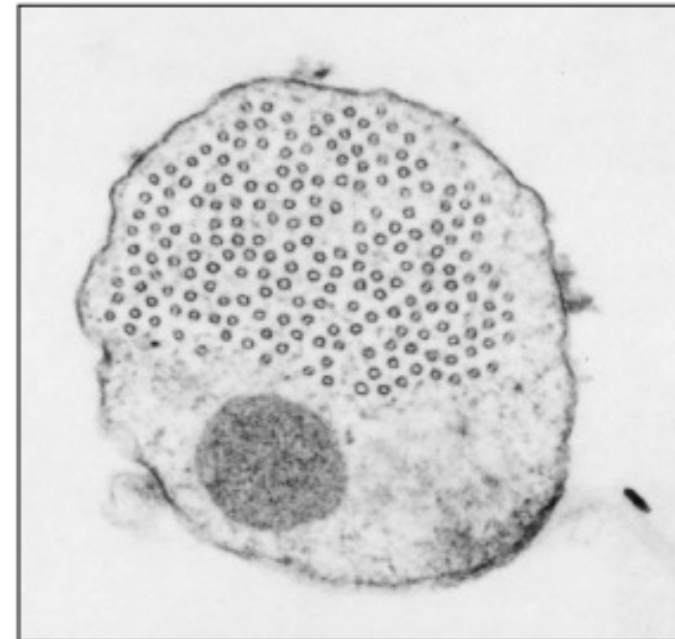
(A)



(B)



(C)

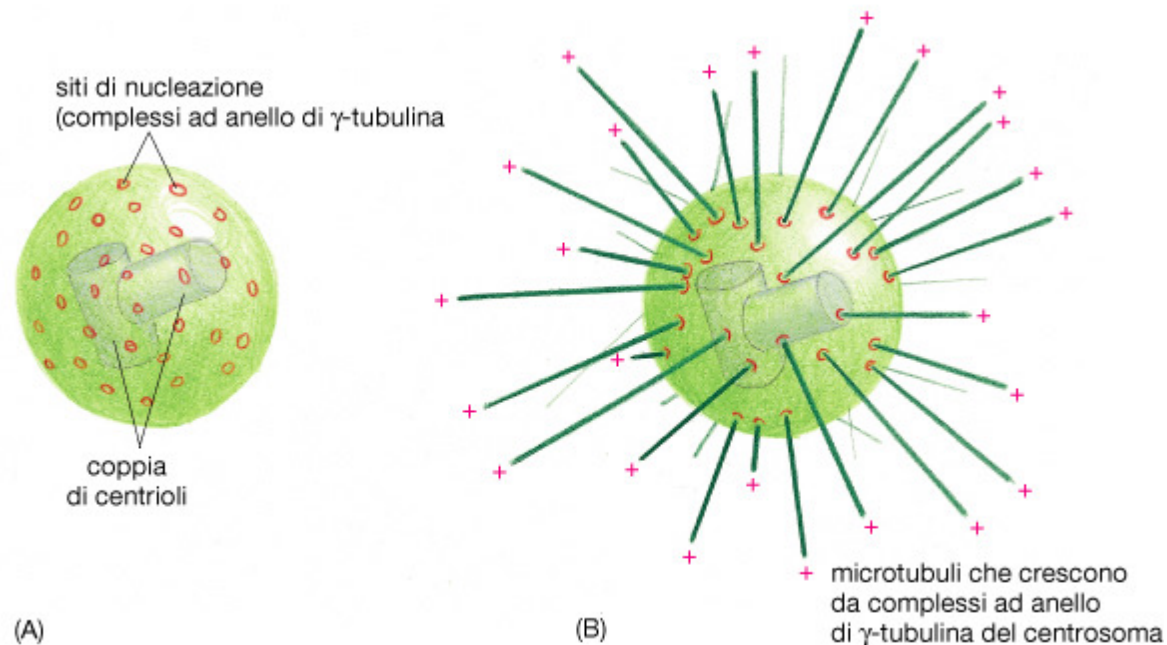


(D)

300 nm

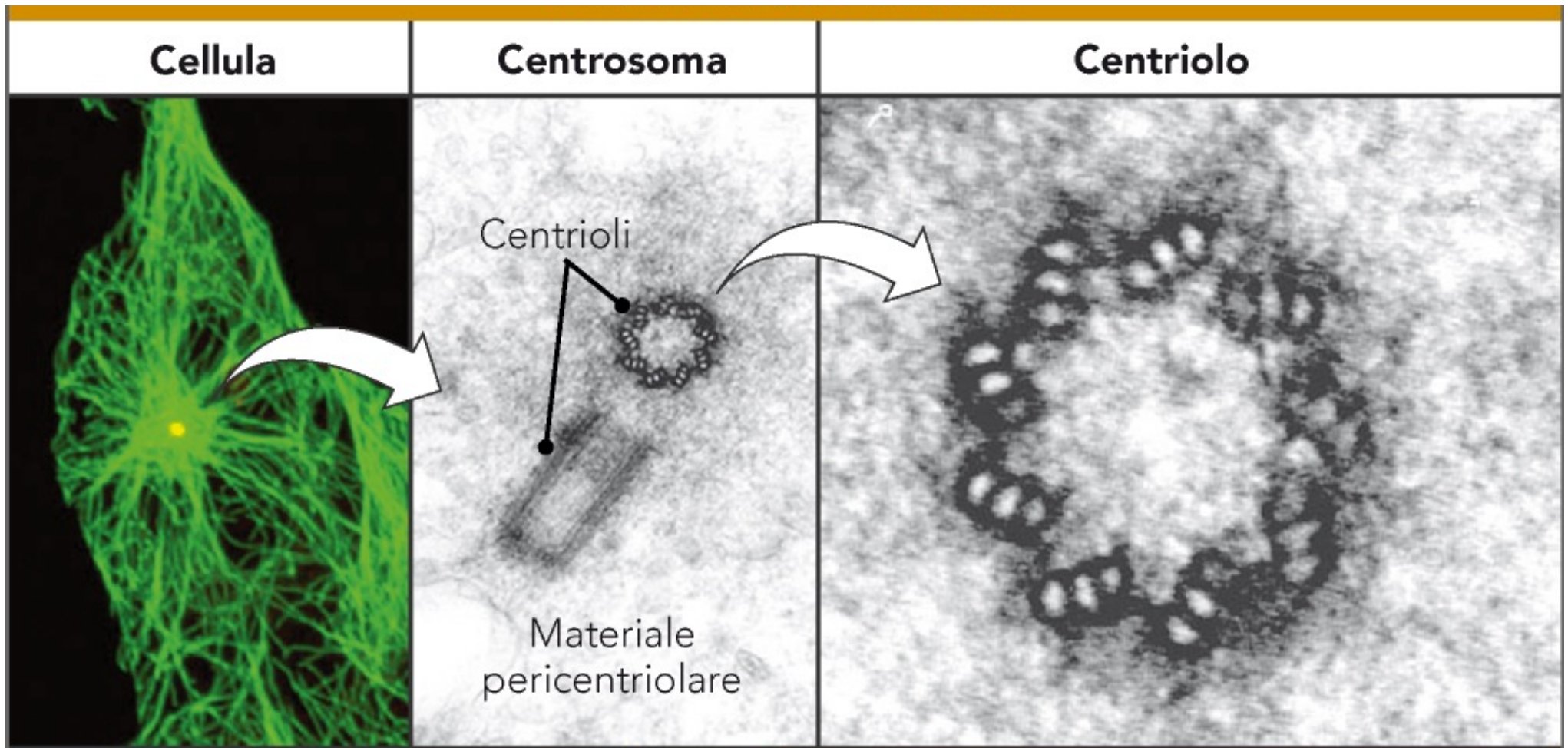
Le cellule utilizzano centri di nucleazione per polimerizzare nuovi microtubuli

- I centri organizzatori dei microtubuli (MTOC) nucleano i microtubuli all'interno delle cellule
- La posizione dei centri organizzatori determina l'organizzazione dei microtubuli all'interno della cellula
- Il centrosoma è il MTOC più comune ed è posto vicino al nucleo interfase. Da questo punto focale i microtubuli si estendono con una conformazione "a stella".

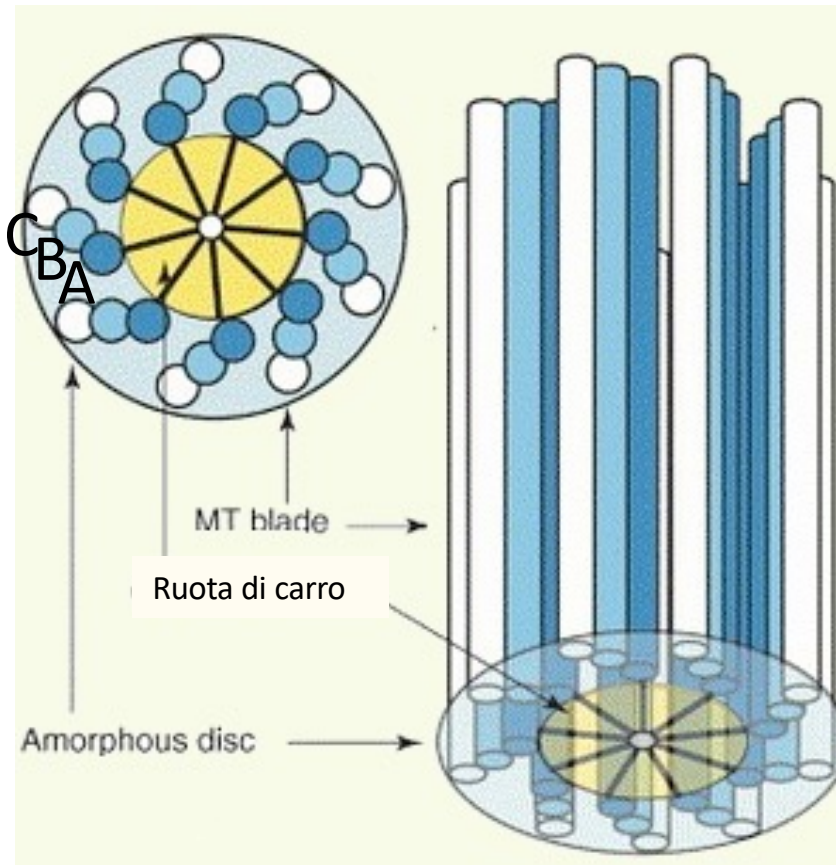


I CENTRIOLI

Il centrosoma è una struttura che in molte cellule identifica il centro della cellula. Il centrosoma è formato da una coppia di centrioli circondato da materiale pericentriolare.



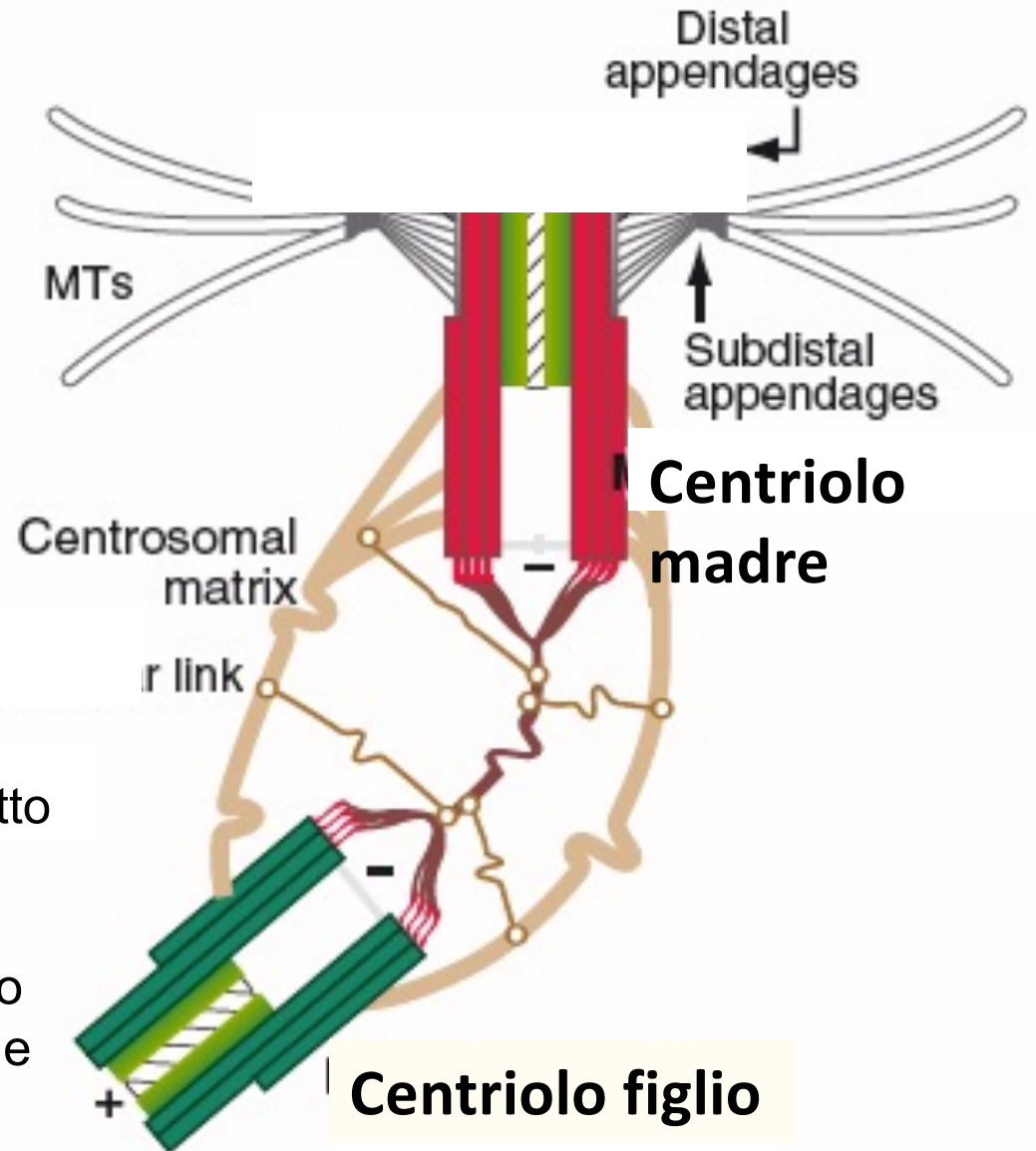
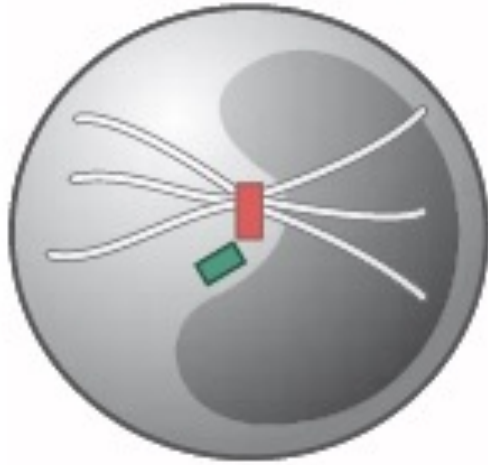
I CENTRIOLI



Ogni centriolo è costituito da 9 tripplette di microtubuli disposte attorno ad una cavità centrale. La trippletta A è costituita da 13 protofilamenti, mentre la B e la C sono solo parziali e sono costituite da 10-11 protofilamenti.

Altre proteine aiutano i microtubuli a restare in questa disposizione. In particolare alcune proteine costruiscono una serie di raggi che si diparte dal centro dei centrioli, formando una sorta di “ruota di carro”

I CENTRIOLI



I due centrioli non sono equivalenti

uno dei due è connesso al citoscheletro tramite una delle sue estremità, ed è detto **centriolo madre**.

L'altro, debolmente connesso al centriolo madre da alcuni complessi proteici, viene detto **centriolo figlio**.

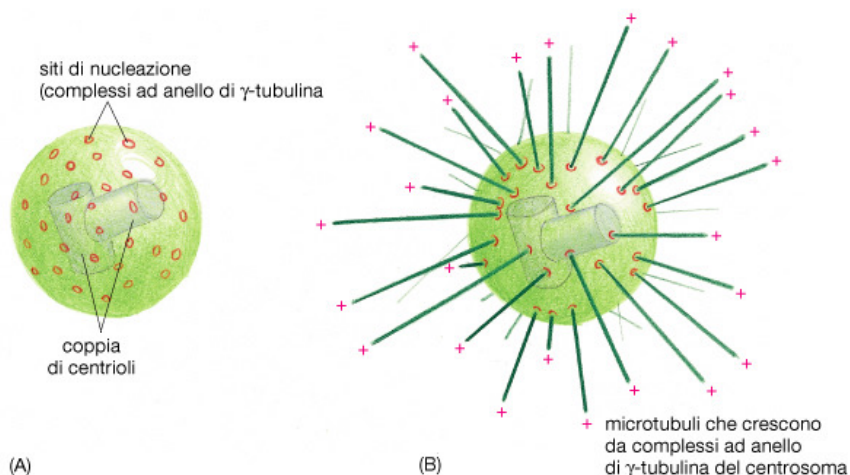
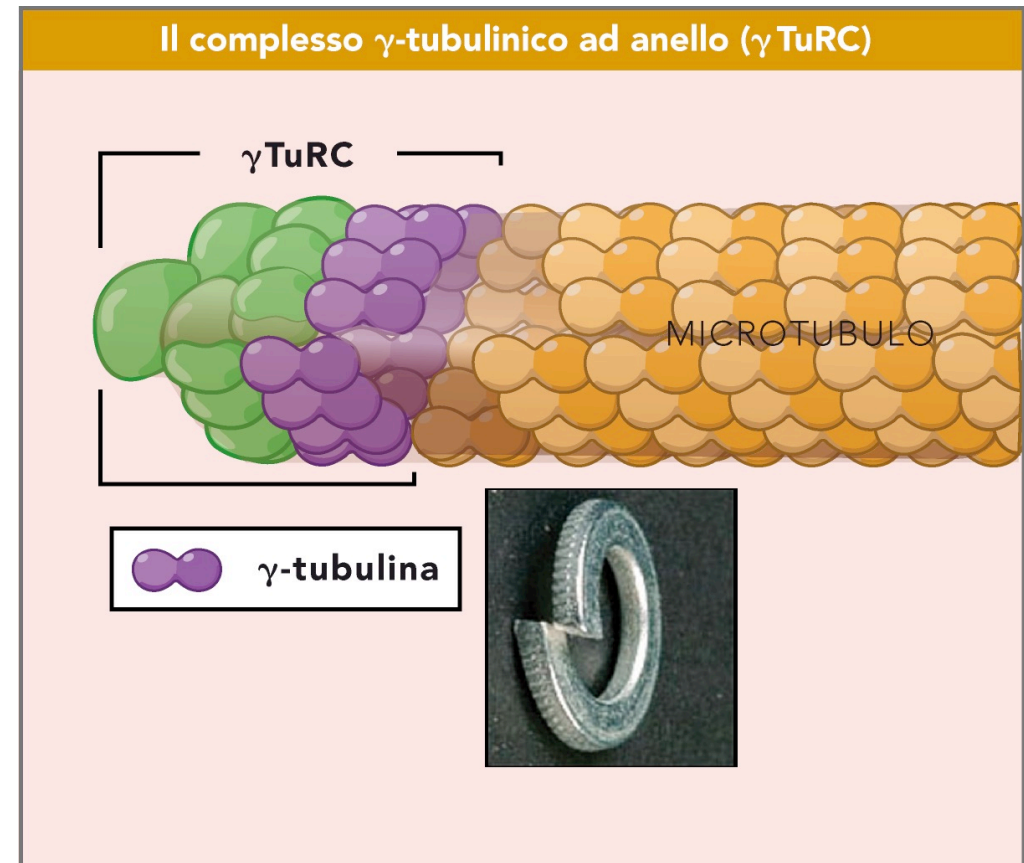
I due centrioli sono rivolti l'uno verso l'altro dalla parte delle loro estremità -

I microtubuli NON sono nucleati dai centrioli, ma dai γ TuRC che si trovano attorno ad essi

Il γ TuRC è costituito da proteine che si trovano alla periferia del MTOC e che assemblano un anello a spirale di γ -tubulina. Questa proteina non forma filamenti, ma consente di assemblare le subunità di α - β -tubulina nei microtubuli.

Anche la γ -tubulina è polarizzata, e le subunità di α - β -tubulina vengono aggiunte all'estremità +. In questo modo i microtubuli cresceranno dalla loro estremità -, posta vicino al centrosoma, all'estremità +.

In molte cellule, quindi, le estremità + saranno rivolte verso l'esterno e quelle - verso l'interno



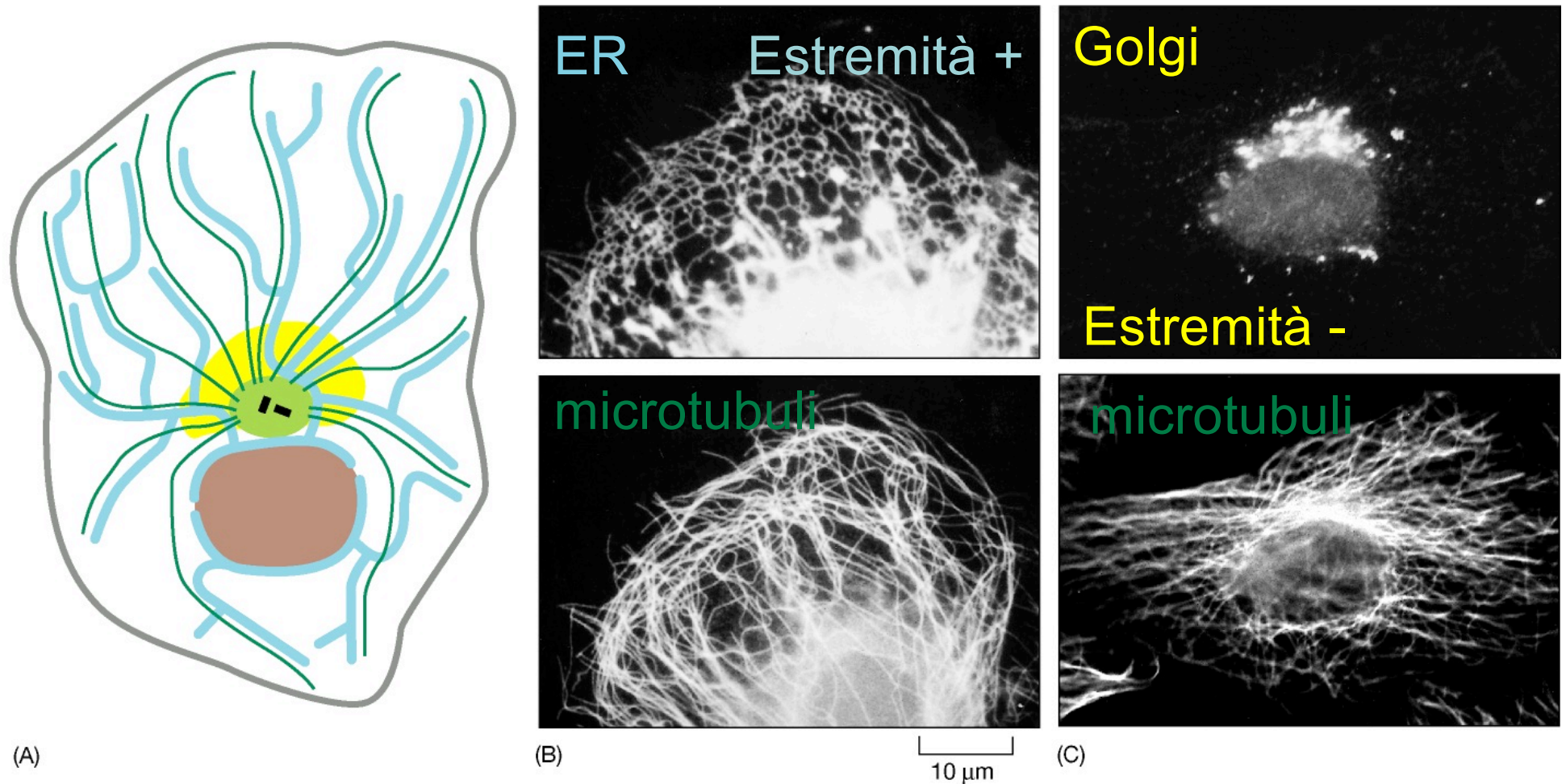
dall' Introduzione...

I MICROTUBULI: generalita' e funzioni

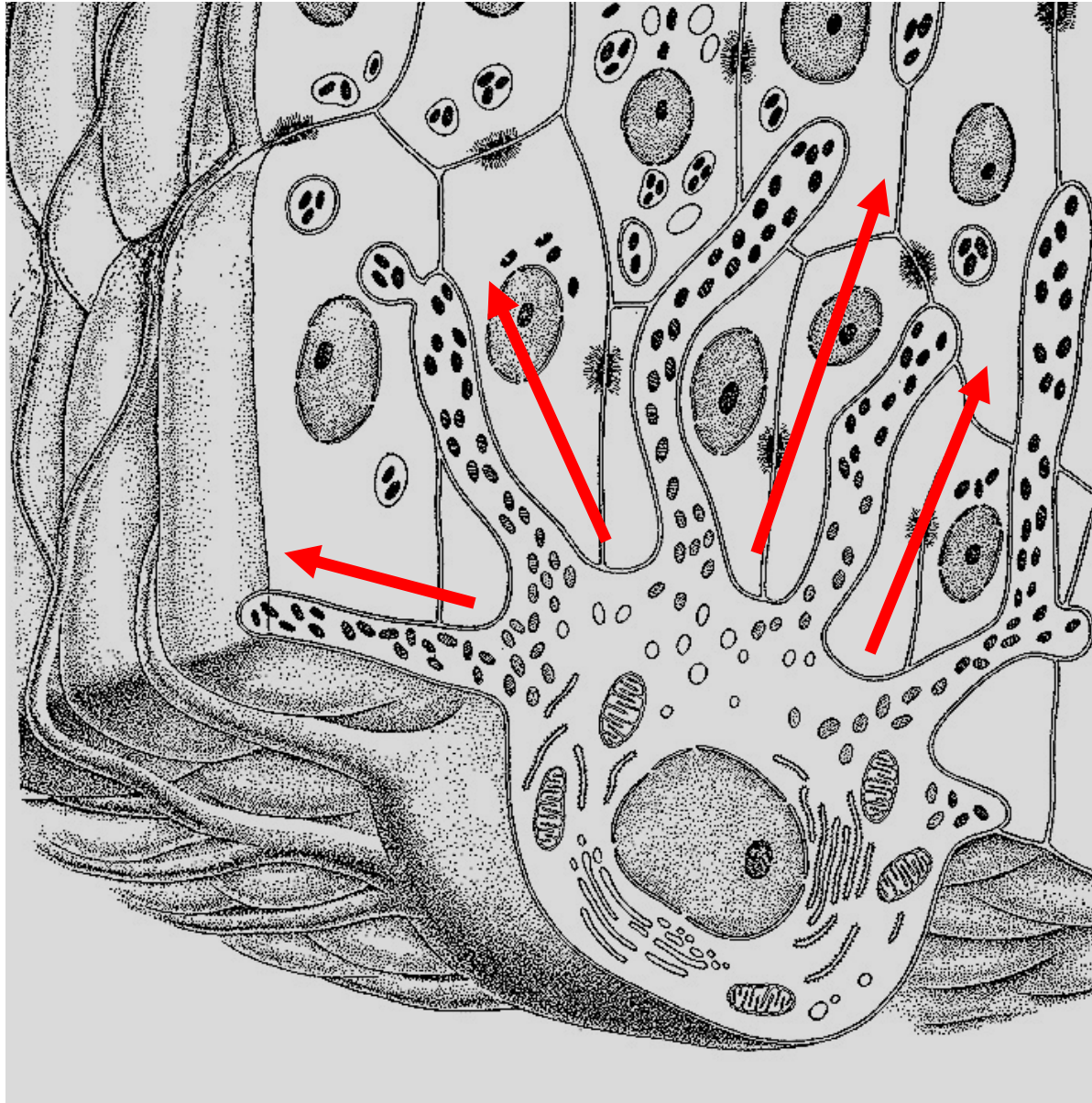
2. Svolgono molteplici funzioni:

c. formano dei “binari” per i sistemi intracellulari di trasporto di organelli e piccole molecole grazie ai motori proteici ad essi associati.

Il reticolo endoplasmatico ed il Golgi si localizzano con i microtubuli



Distruggendo i microtubuli con colchicina, il RE collapsa sull'involucro nucleare, mentre il Golgi si disperde in vescicole citoplasmatiche

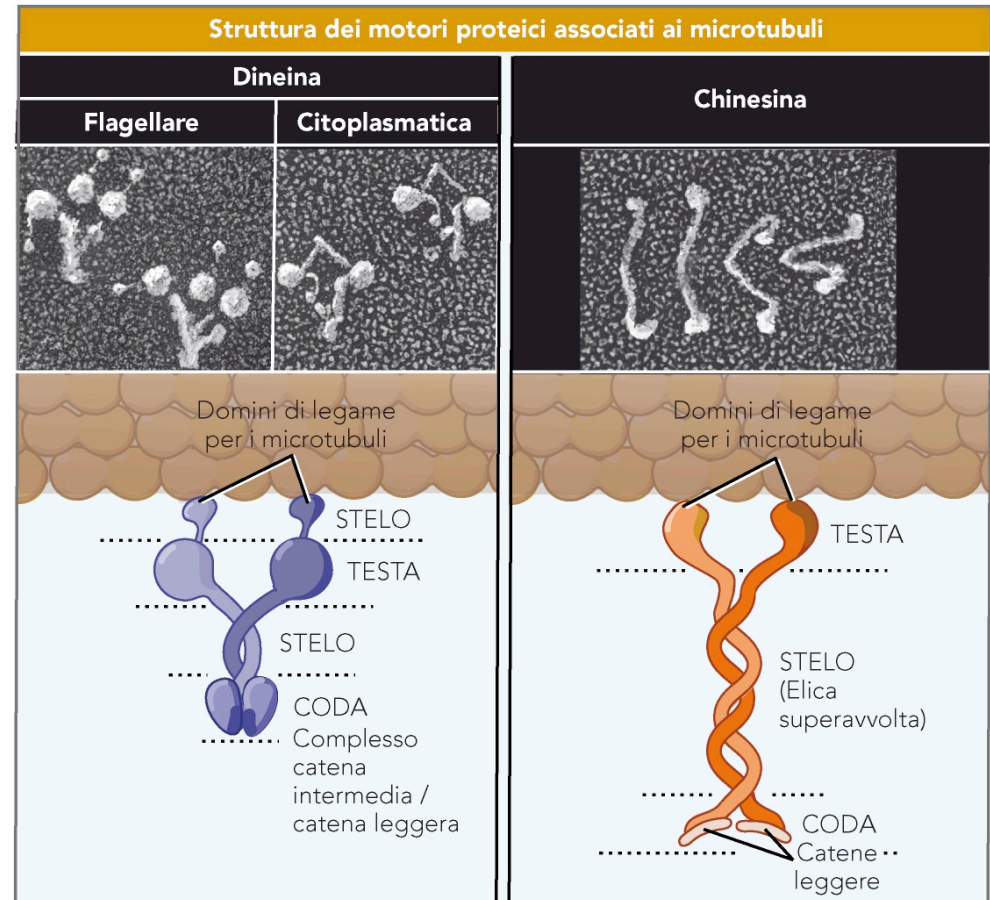
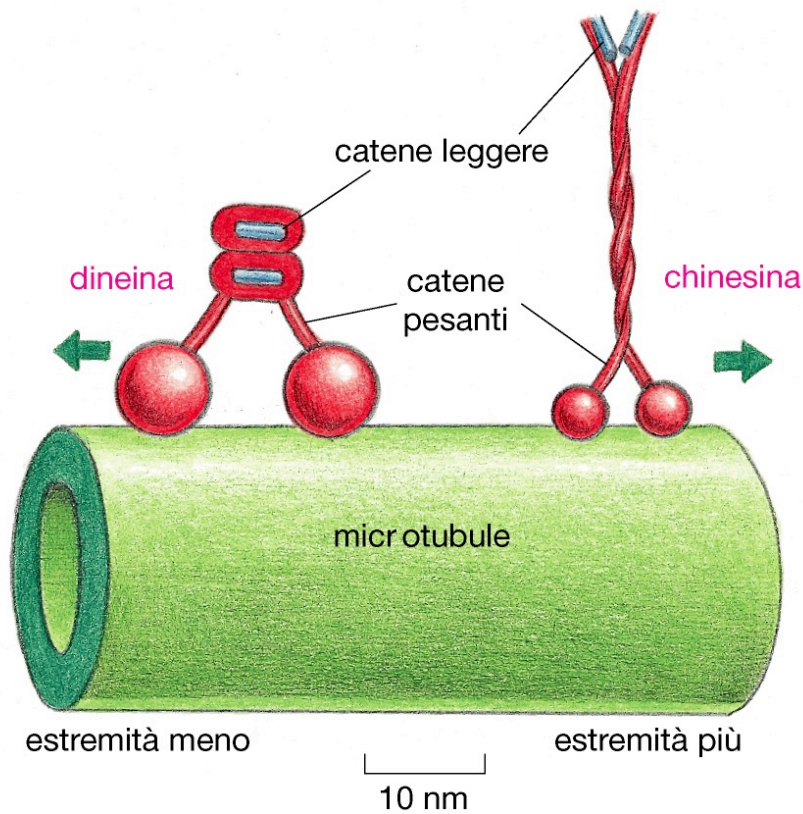


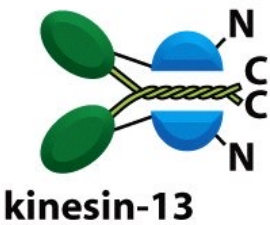
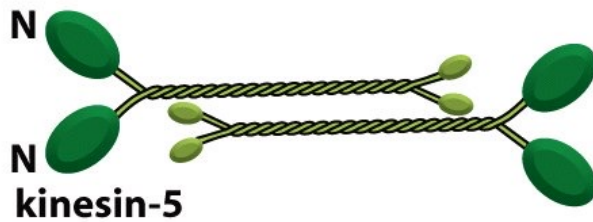
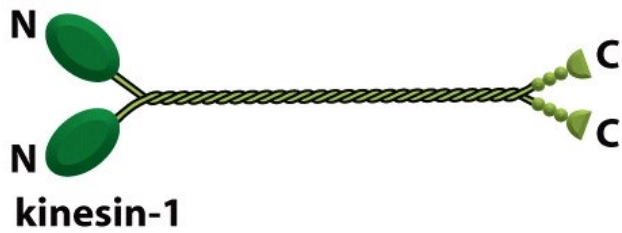
Trasporto dei
melanosomi
lungo i
prolungamenti
citoplasmatici dei
melanociti
(nell'epidermide)

Due famiglie di motori proteici associate ai microtubuli

Chinesine: si muovono verso le estremità **più**
 nell'essere umano ci sono 45 tipi diversi di chinesine

Dineine: si muovono verso le estremità **meno**
 ne esiste un'unica forma citoplasmatica, le altre sono associate agli
 assonemi delle ciglia e dei flagelli



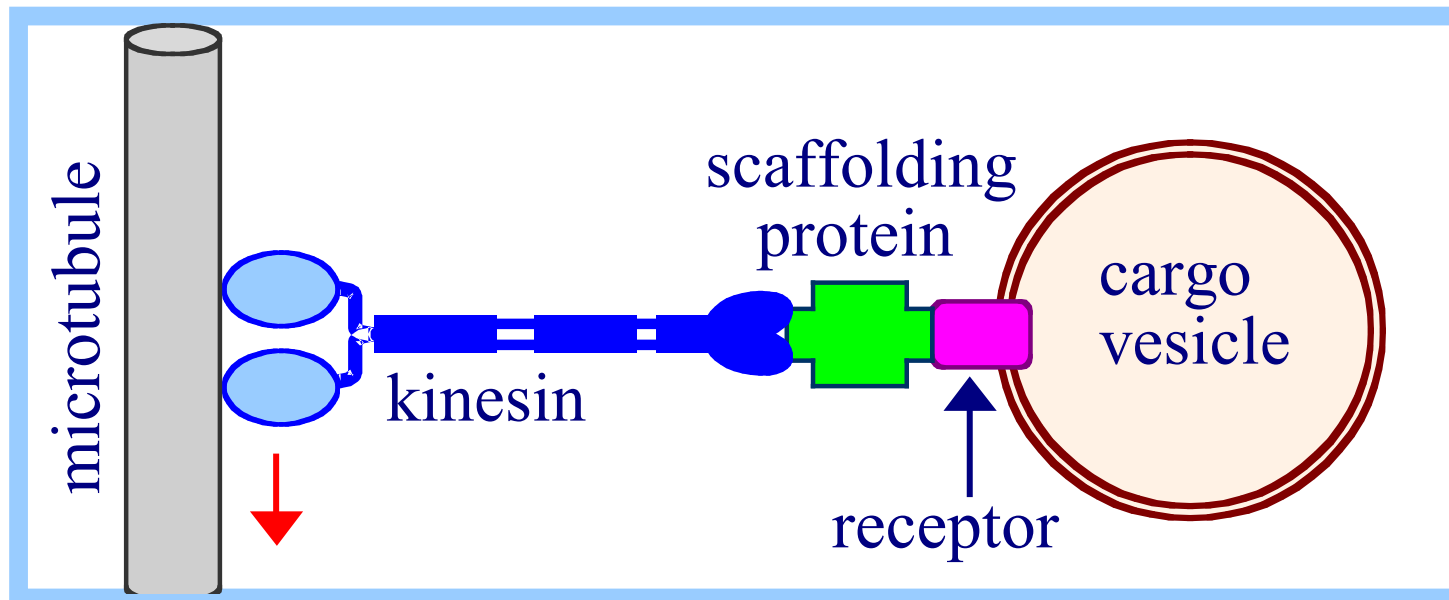


Chinesine che si muovono verso l'estremità +

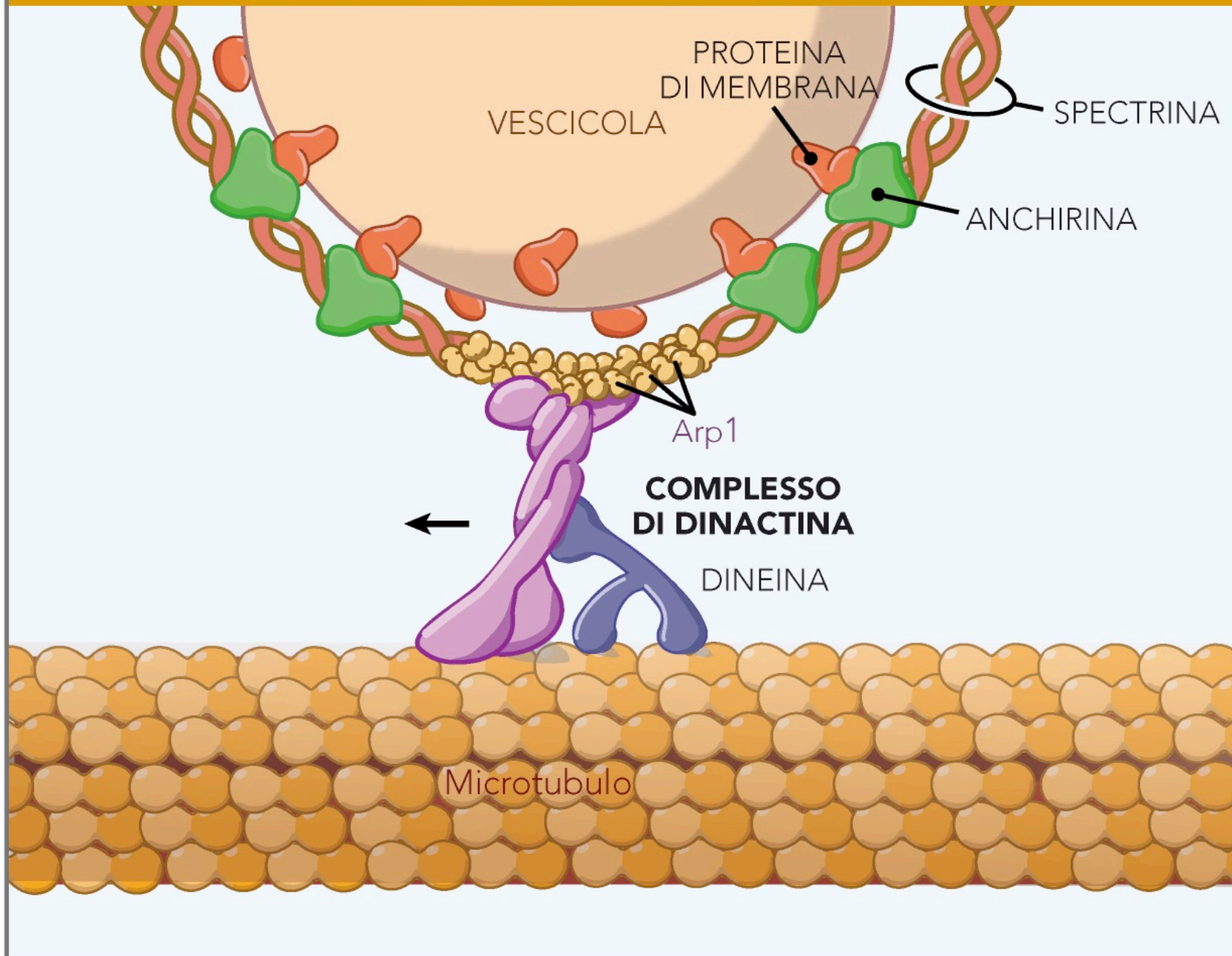
Eccezione: Chinesina che si muove verso l'estremità -

In che modo i carichi sono trasportati dal motore proteico appropriato?

Proteine adattatrici si associano alle code dei motori proteici per regolare la loro attività' e per associarli ai carichi. A loro volta queste proteine si associano a specifici recettori posti sui carichi.



La dinactina associa la dineina alle vescicole



Quali sono i carichi portati dai motori microtubulari?

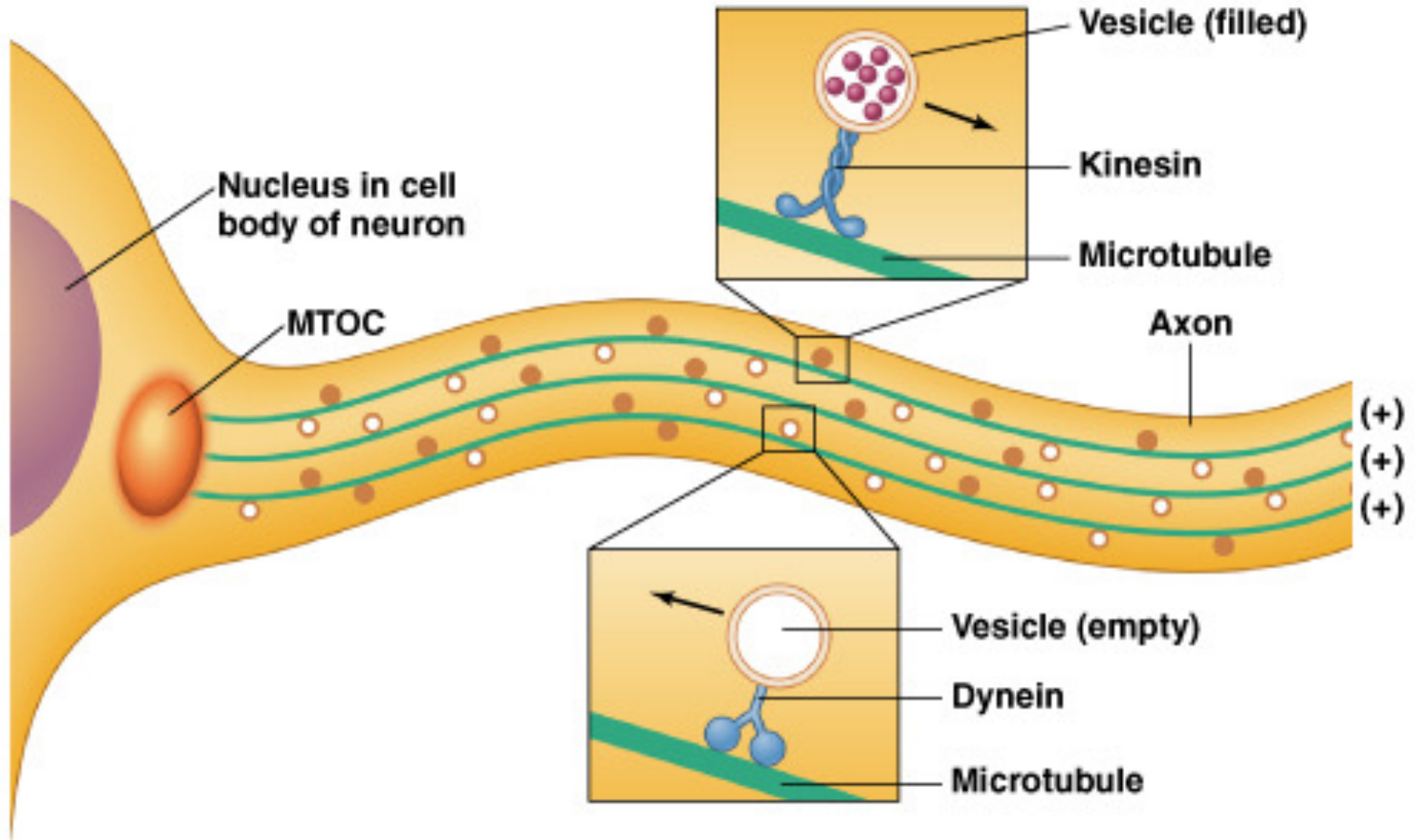
Carichi tipici delle chinesine (diretti verso l' estremita' +)

Cisterne del reticolo endoplasmatico
vescicole che lasciano il Trans golgi
specifici RNA messaggeri

Carichi tipici delle dineine (diretti verso l' estremita' -)

Cisterne dell' apparato del Golgi
vescicole endocitotiche
particelle virali

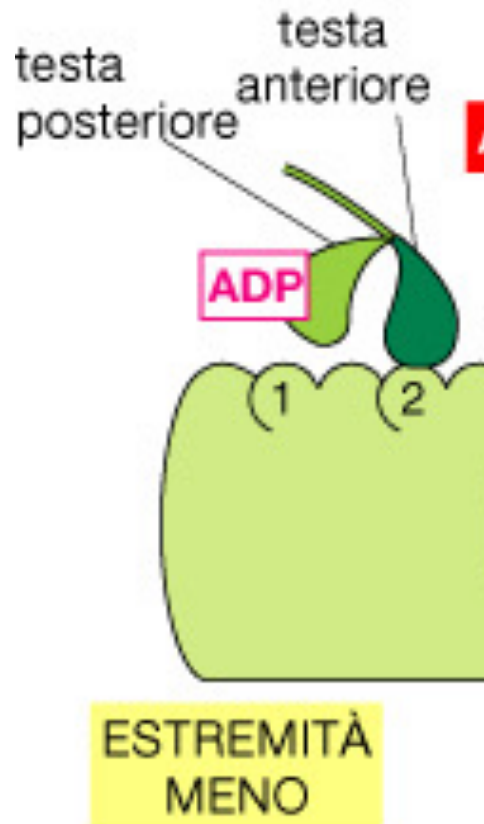
Traffico di vescicole nell' assone di un Neurone



Funzionamento dei motori proteici: *concetti chiave*

- I motori proteici utilizzano l'idrolisi dell'**ATP** per alimentare il movimento
- La presenza e il tipo di nucleotide legato modificano l'affinità delle teste per i microtubuli
- L'idrolisi dell'ATP modifica la forma della testa. Questa modificazione viene tradotta in un movimento più ampio del motore molecolare.
- Cicli di idrolisi dell'ATP e di rilascio del nucleotide accoppiano gli attacchi ai microtubuli con le modificazioni della forma della testa del motore proteico.
- Con questo meccanismo il motore proteico cammina lungo il microtubulo, compiendo un passo per ciascun ATP idrolizzato.

Un esempio: meccanismo del movimento della chinesina



La testa 2 non è associata al microtubulo, ed è associata all'ADP. La testa 1 è invece associata stabilmente al microtubulo

MICROTUBULIO

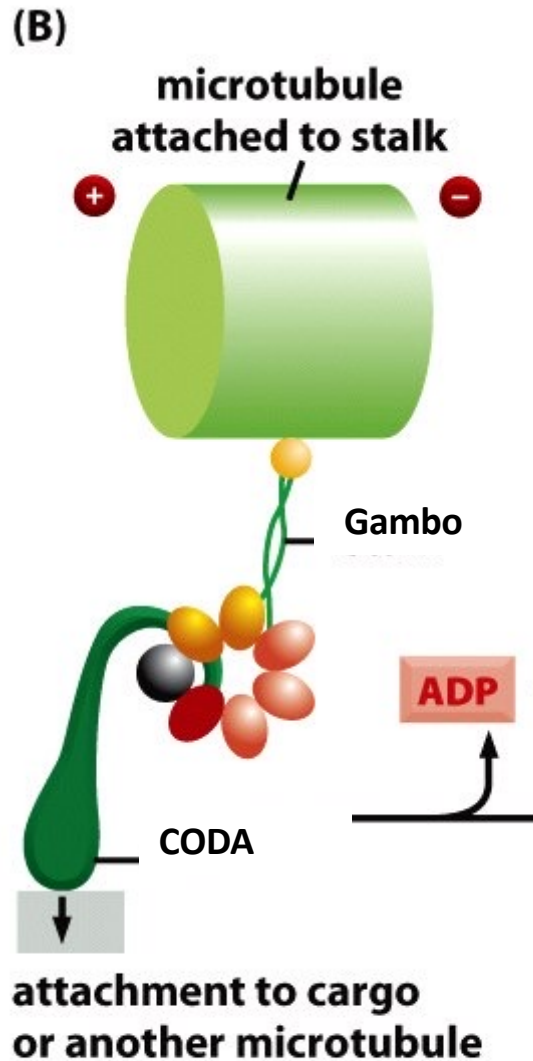
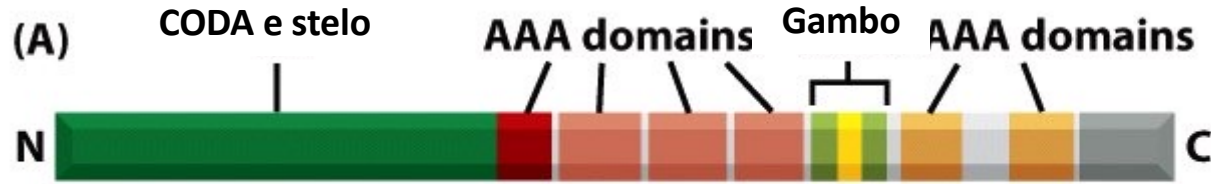
La testa 2 rilascia l'ADP, legandosi più fortemente con il microtubulo.

La testa 1 idrolizza l'ATP in ADP, portando alla dissociazione della stessa dal microtubulo

BioVisions

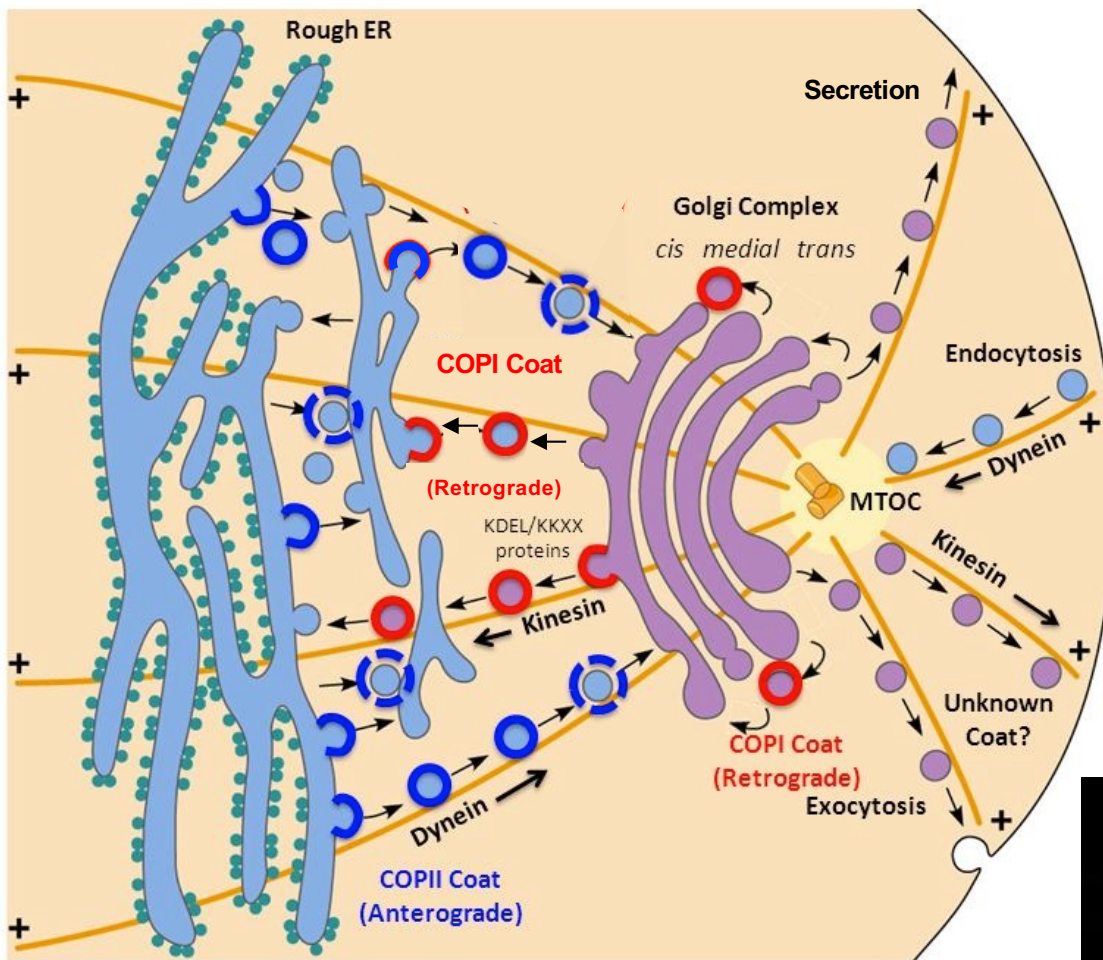
at Harvard University

DINEINE

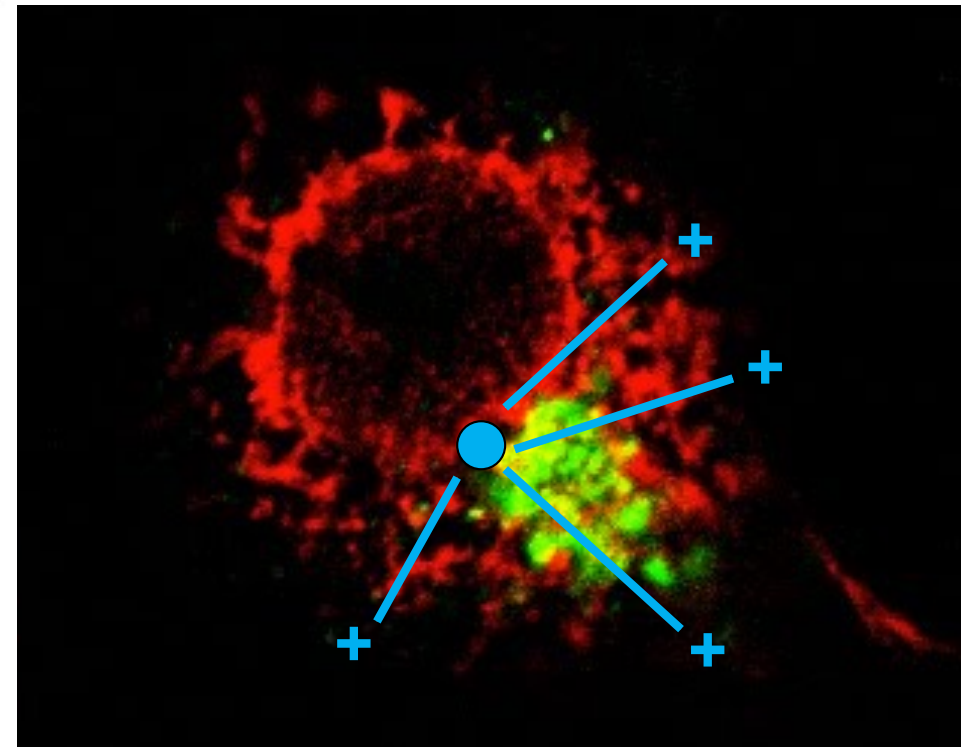


Le dineine hanno il dominio di legame ai microtubuli (gambo) posto a metà della molecola. Il cargo è attaccato al dominio N-terminale. La restante parte della proteina forma una struttura ad anello contenente il dominio ATP-asi





Poichè il Reticolo Endoplasmatico è diffuso in tutta la cellula (Chinesine) mentre il Golgi è attivamente concentrato nei pressi del Centrosoma (Dineina), le vescicole COPII che vanno del RE al Golgi si muovono prevalentemente tramite Dineina, mentre le vescicole COPI tramite Chinesine (come le vescicole secretorie che lasciano Golgi verso la membrana)



Sommario dei concetti chiave sui motori proteici

Quasi tutte le funzioni cellulari che dipendono dai microtubuli richiedono motori proteici ad essi associati

I motori proteici sono enzimi che generano una forza e si spostano lungo i microtubuli in direzione + o –

Il dominio della “testa” dei motori proteici si lega ai microtubuli e genera una forza

Il dominio della “coda” normalmente si lega alla membrana o ad un altro carico di trasporto

la maggior parte delle chinesine si spostano verso le estremita' piu' dei microtubuli

le dineine si spostano verso le estremita' meno dei microtubuli

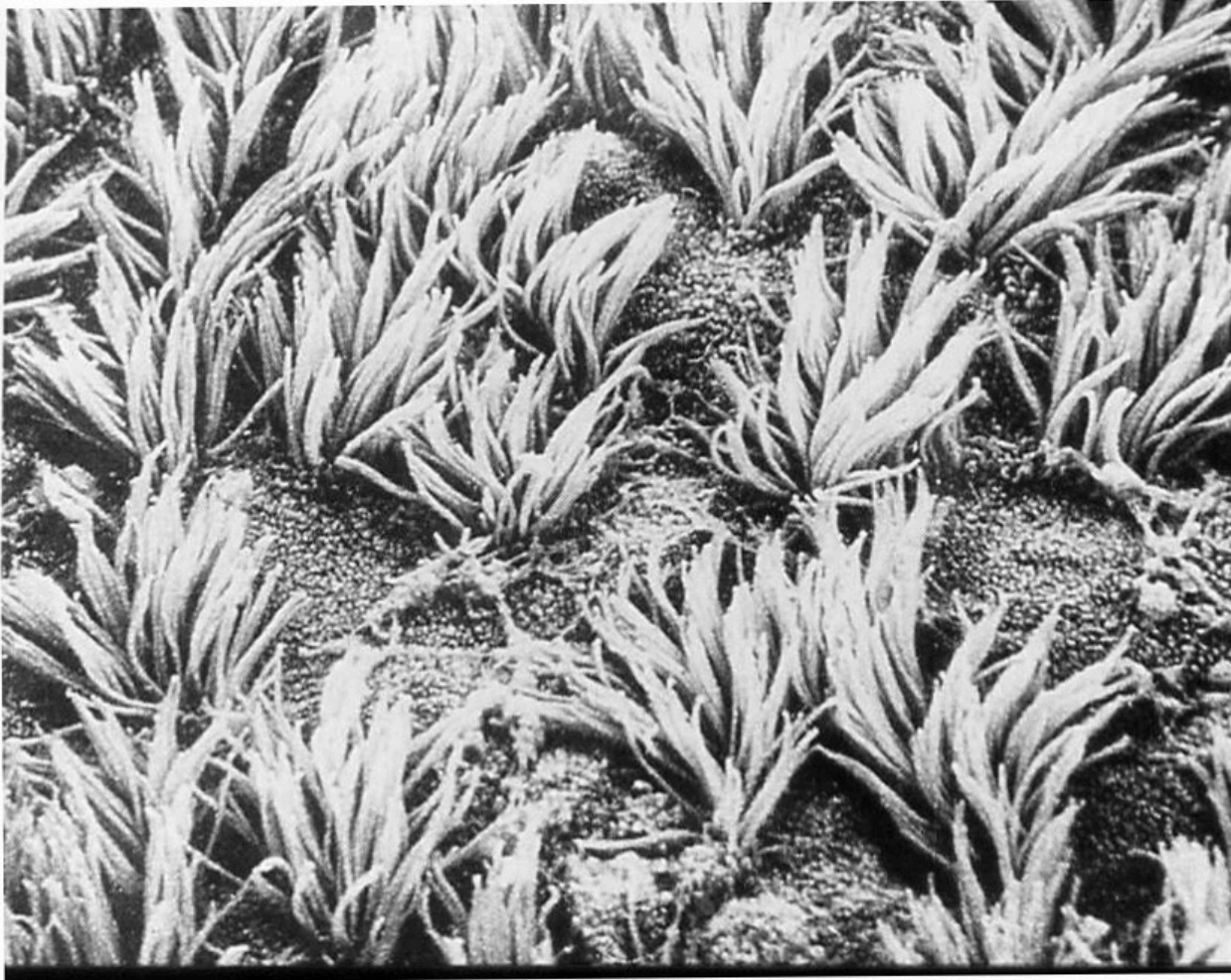
CIGLIA E FLAGELLI

Gli “undulopodi” sono specializzazioni della membrana dotate di uno scheletro di microtubuli e capaci di movimento.



I flagelli sono strutture che consentono il movimento delle cellule. Sono presenti uno per cellula. Nelle cellule umane sono presenti solo negli spermatozoi.

Il movimento degli spermatozoi è affine a quello di un'onda: quando una parte è piegata in un senso, un'altra è piegata nel senso opposto

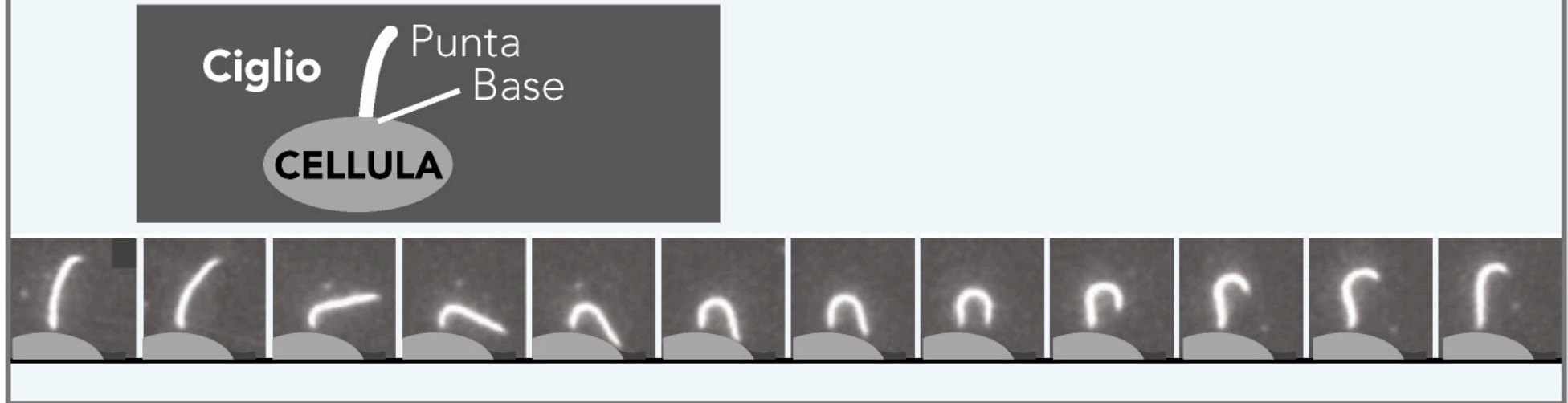


Le ciglia sono più corte dei flagelli e sono presenti in numero elevato per cellula.

Singolare=ciglio
Plurale=ciglia

Foto:
Mucosa nasale

Il battito di un ciglio

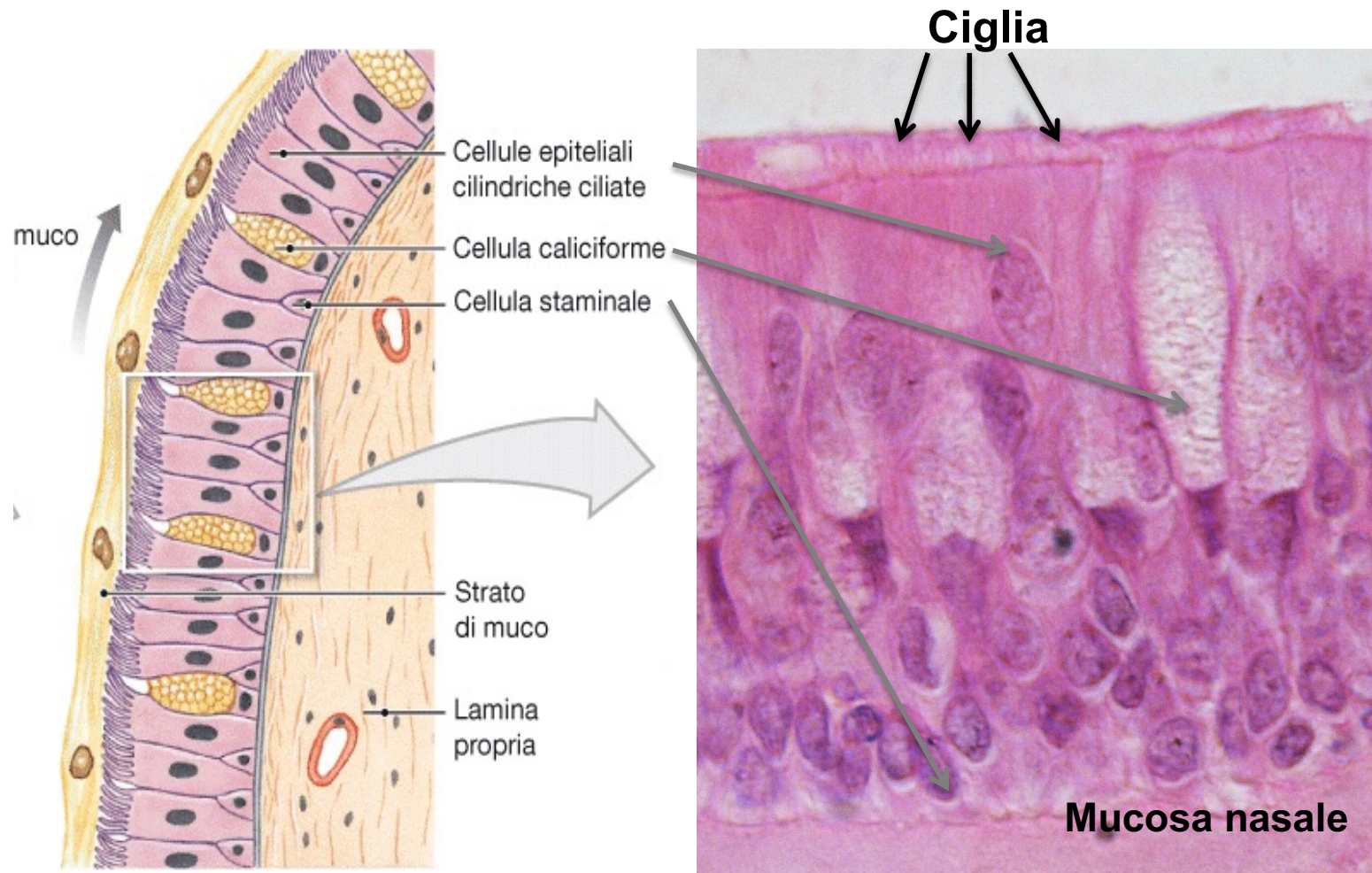


Il movimento delle ciglia è affine a quello di una frusta: incomincia con un piegamento in prossimità del punto di emergenza del ciglio, mentre il resto della struttura rimane rettilinea. Poi si ha uno “schiocco”: la piegatura si trasmette lungo tutta la lunghezza del ciglio fino ad esaurirsi alla sua estremità

Le ciglia si muovono in modo coordinato: ciglia sulla stessa fila si piegano nello stesso momento, mentre file diverse si trovano in diversi momenti della piegatura.

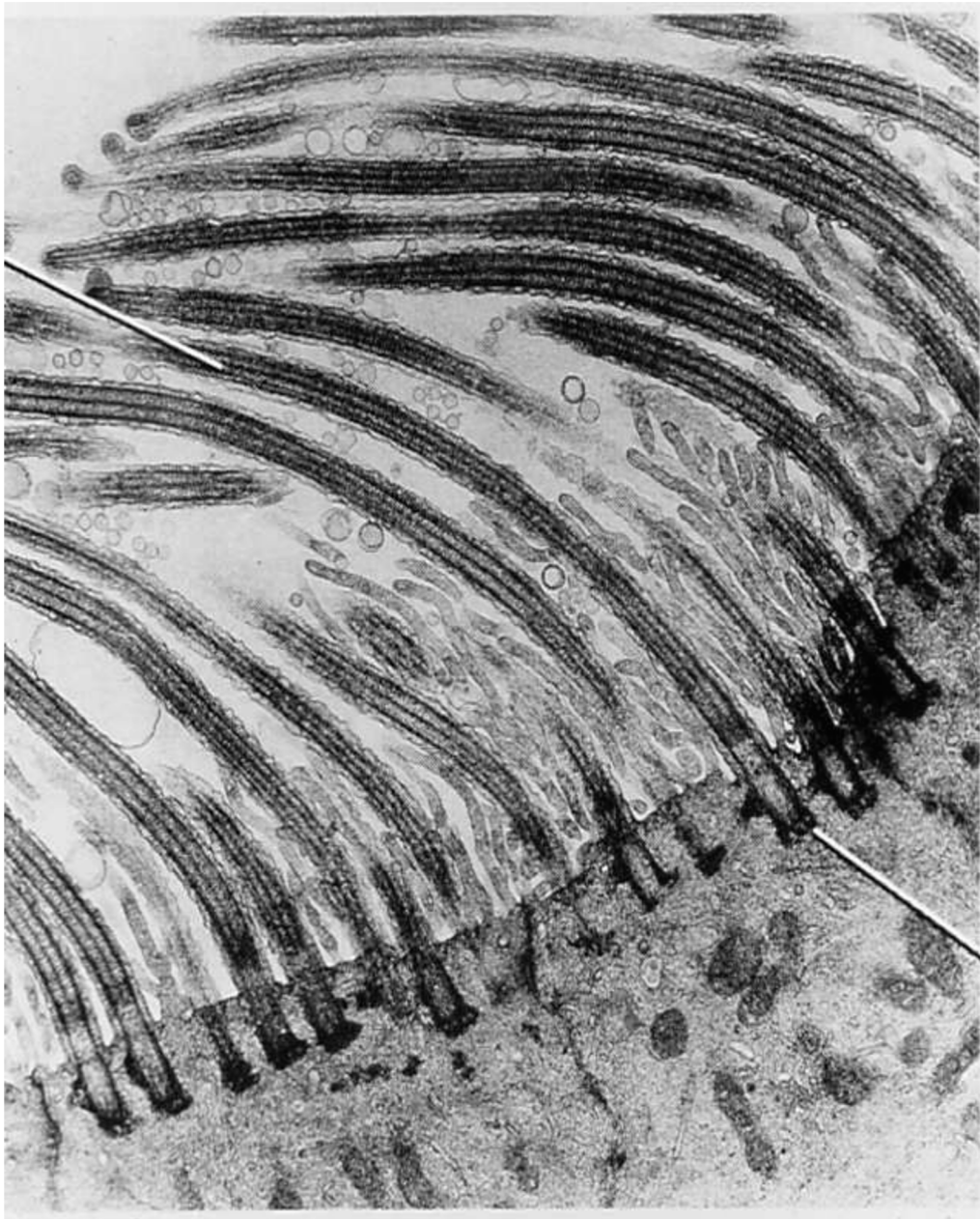
CIGLIA E FLAGELLI

Le ciglia non permettono il movimento delle cellule. Muovendosi in modo sincrono consentono invece il movimento di materiale sulla superficie cellulare.



La base del funzionamento degli undulopodi è la struttura centrale di microtubuli detta **assonema**

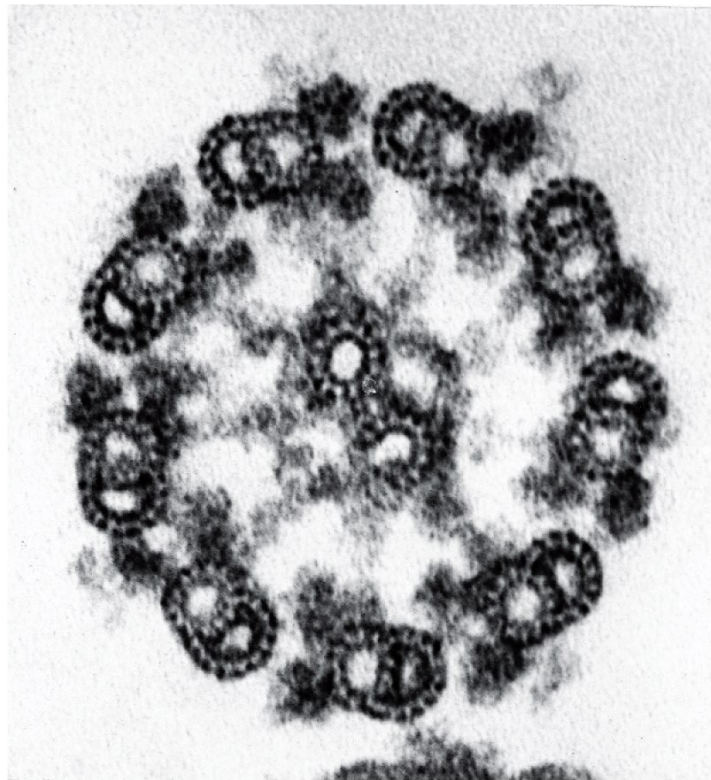
assonema



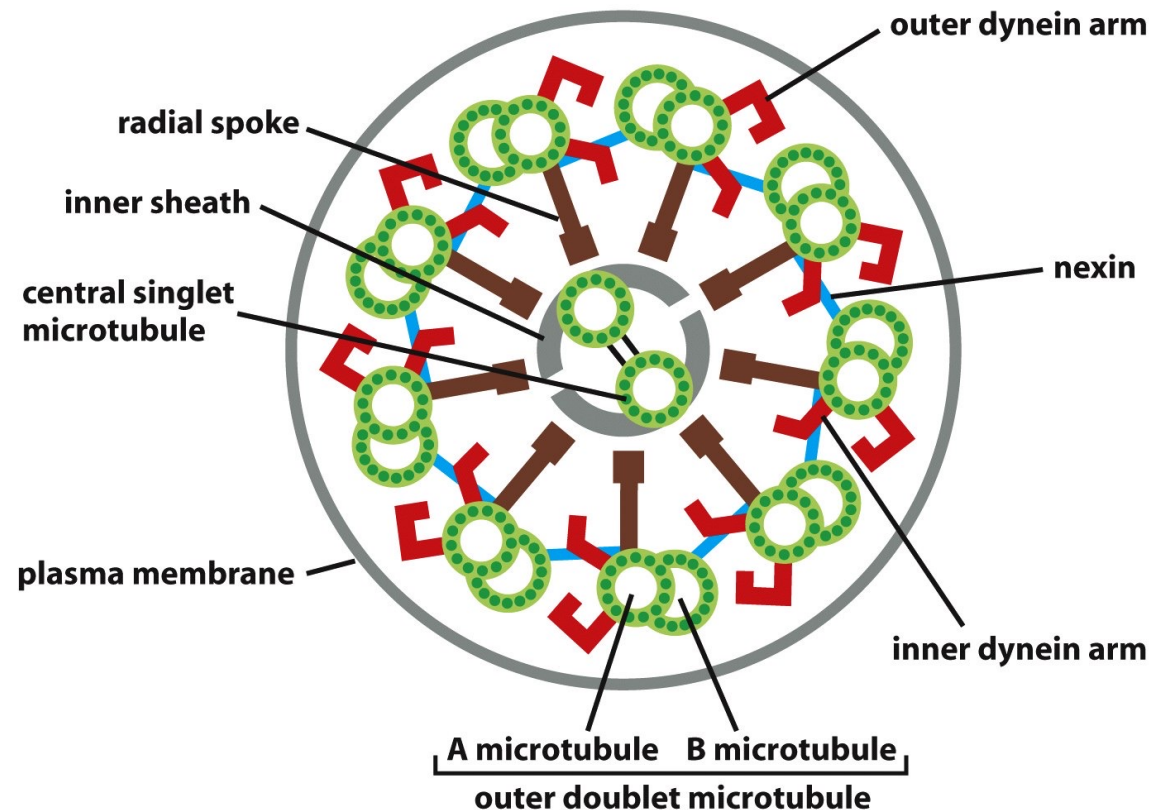
Corpo
basale

LA STRUTTURA A “RUOTA DI CARRO” DELL’ASSONEMA

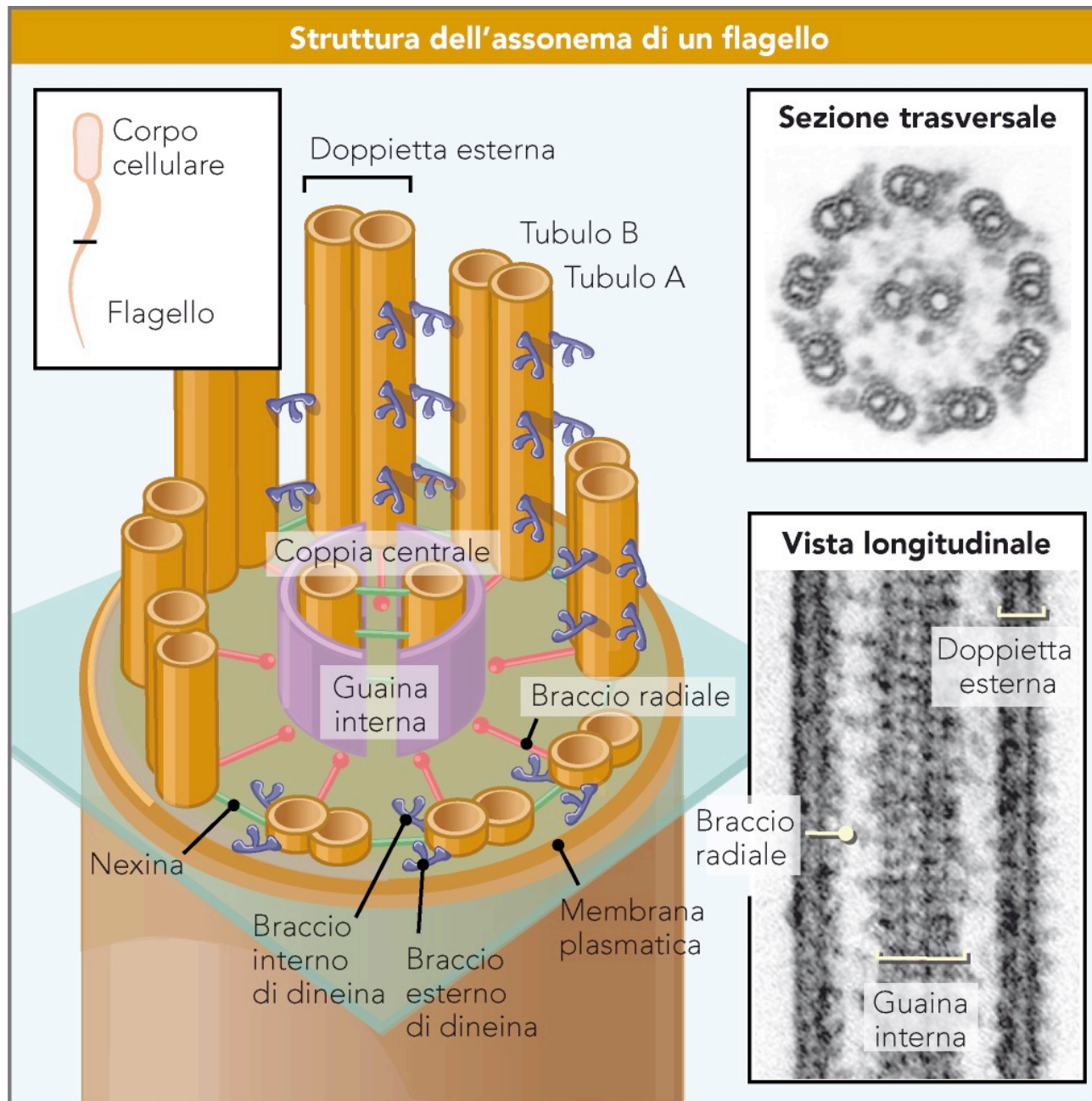
In sezione l’assonema appare come una “ruota di carro” di 200 nm di diametro. L’assonema è costituito da nove doppietti di microtubuli disposti attorno a due microtubuli centrali (9+2). Ogni doppietto è costituito da un microtubulo completo (A) e uno parziale (B). Ogni doppietto è connesso con gli altri posti ai suoi lati tramite filamenti di **nexina**. I due microtubuli centrali sono avvolti da una guaina interna, a sua volta connessa con i doppietti di microtubuli grazie alle braccia radiali.



100 nm



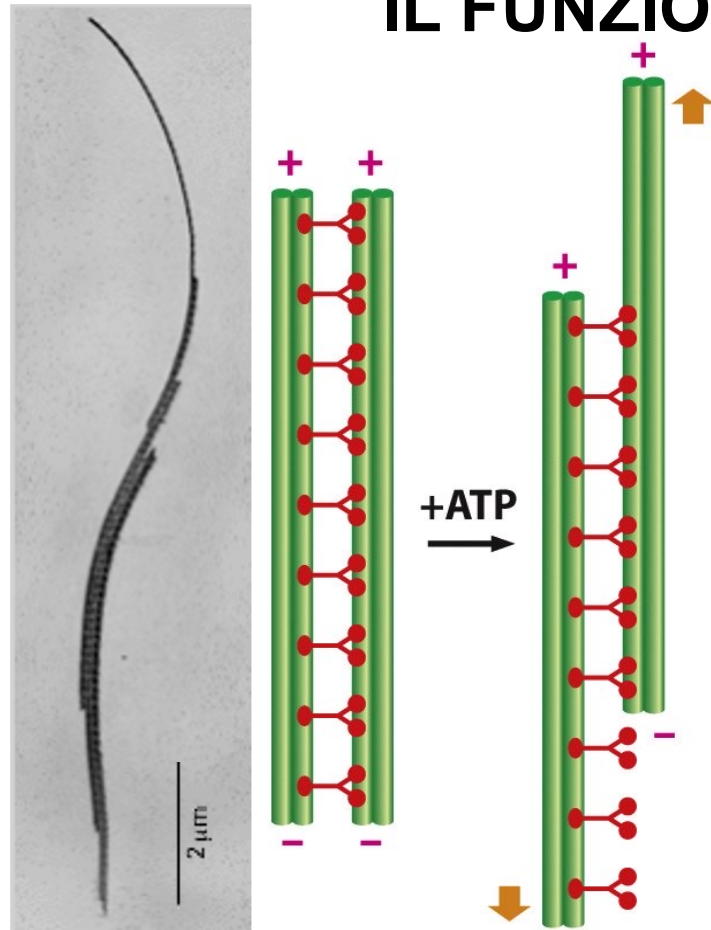
LA STRUTTURA A “RUOTA DI CARRO” DELL’ASSONEMA



Al lato di ogni tubulo A sono legate due molecole di dineina, che costituiscono le due braccia di dineina, interna ed esterna.

I microtubuli sono disposti con l'estremità + rivolta verso l'apice dell'undulopodio

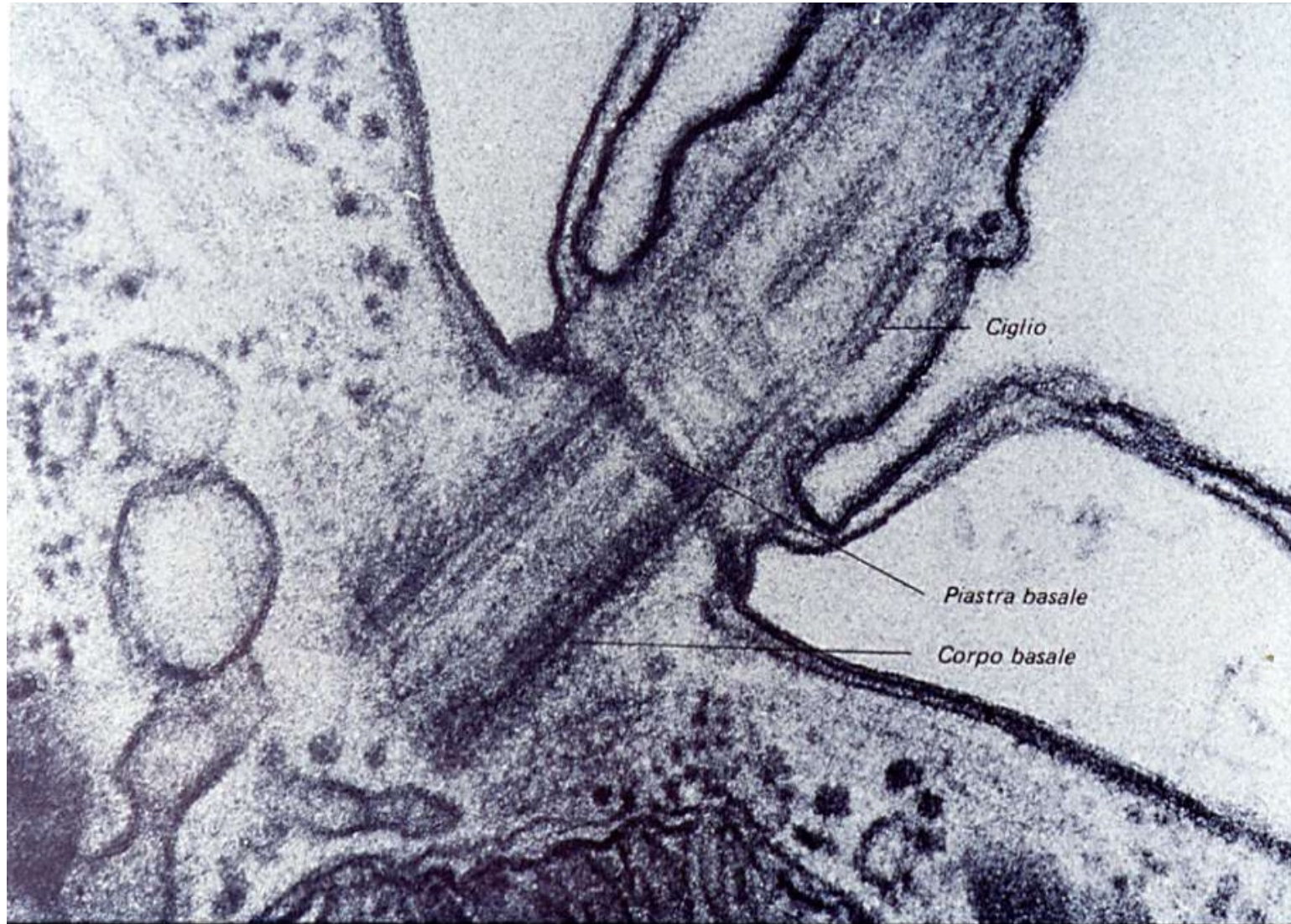
IL FUNZIONAMENTO DELL'ASSONEMA



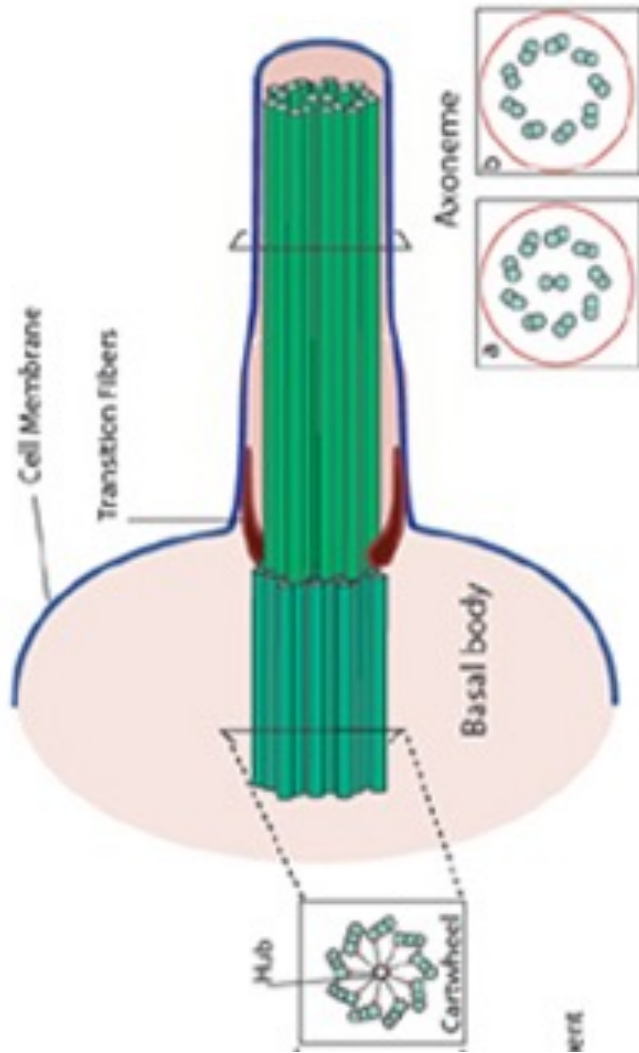
(A)

QUANDO ATTIVATE, LE BRACCIA DI DINEINA PORTANO ALLO SCORRIMENTO DEI DOPPIETTI DI MICROTUBULI, UNO RISPETTO ALL'ALTRO

L'assonema si continua in una struttura citoplasmatica composta da microtubuli: il **corpo basale**



CORPO BASALE

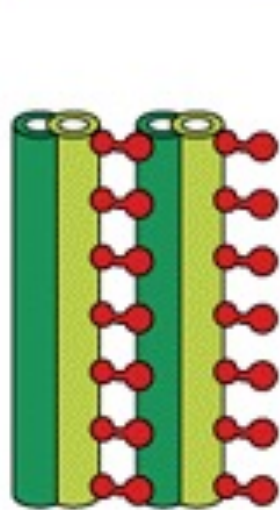


Il corpo basale ha una struttura affine al centriolo madre, e può essere collegato ad un centriolo figlia. Come i centrioli, anche il corpo basale è costituito da nove triplete di microtubuli disposte a raggiera.

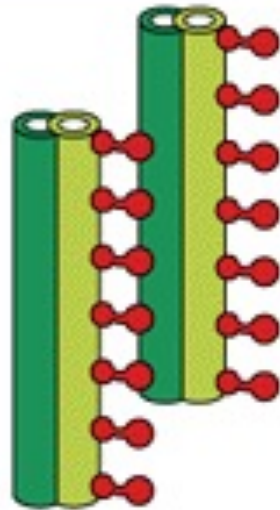
I nove doppietti di microtubuli dell'assonema sono in continuità con l'estremità + dei microtubuli A e B del corpo basale, mentre i microtubuli C non danno origine a nessuna struttura. I due microtubuli centrali dell'assonema compaiono solo secondariamente, dall'inizio dell'undilopodio vero e proprio.

CORPO BASALE

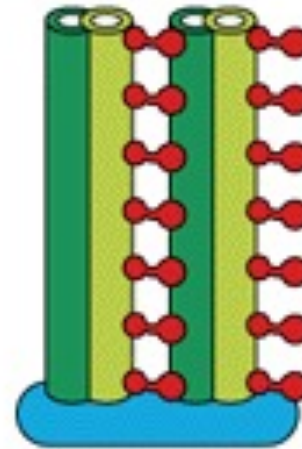
Il corpo basale costringe i microtubuli del ciglio a piegarsi quando si attiva la dineina



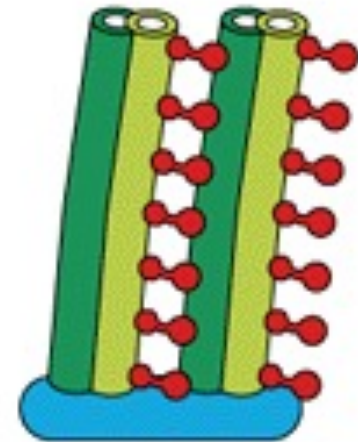
free doublet
(cross-links
removed by
proteolysis)



doublets
slide
apart



doublets held
in cilium by
cross-links



doublet sliding
leads to bending

CIGLIO PRIMARIO

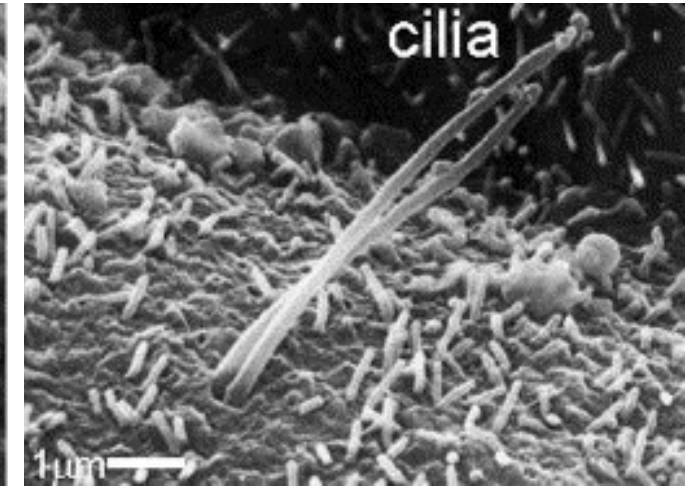
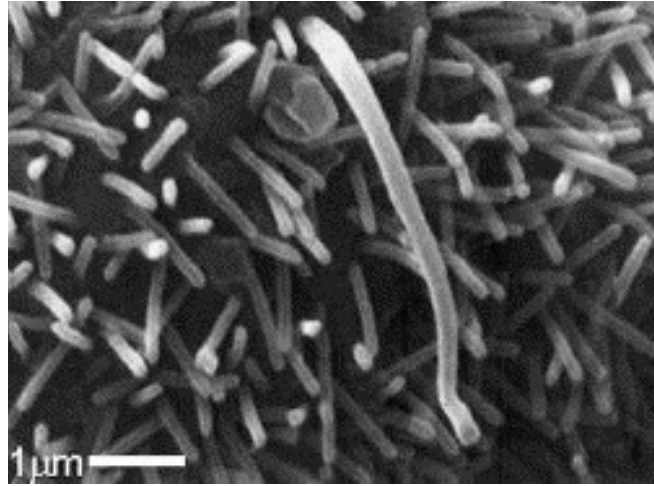
Il ciglio primario è una specializzazione di membrana simile alle ciglia, ma nella maggior parte dei casi è immobile.

Si trova in molte cellule del corpo, in particolar modo quelle mitoticamente inattive.

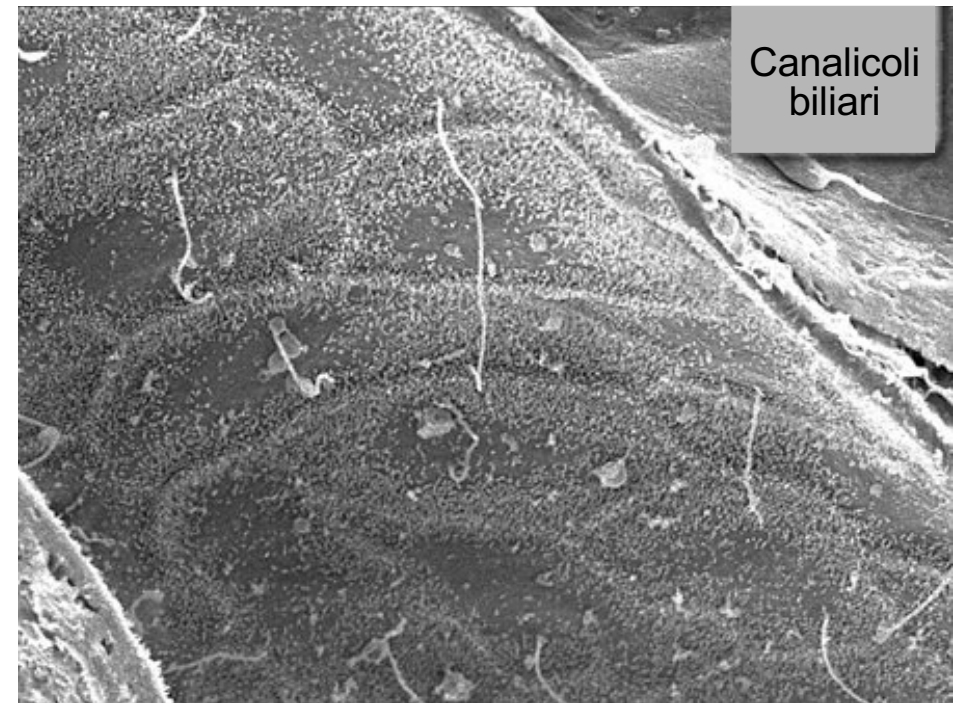
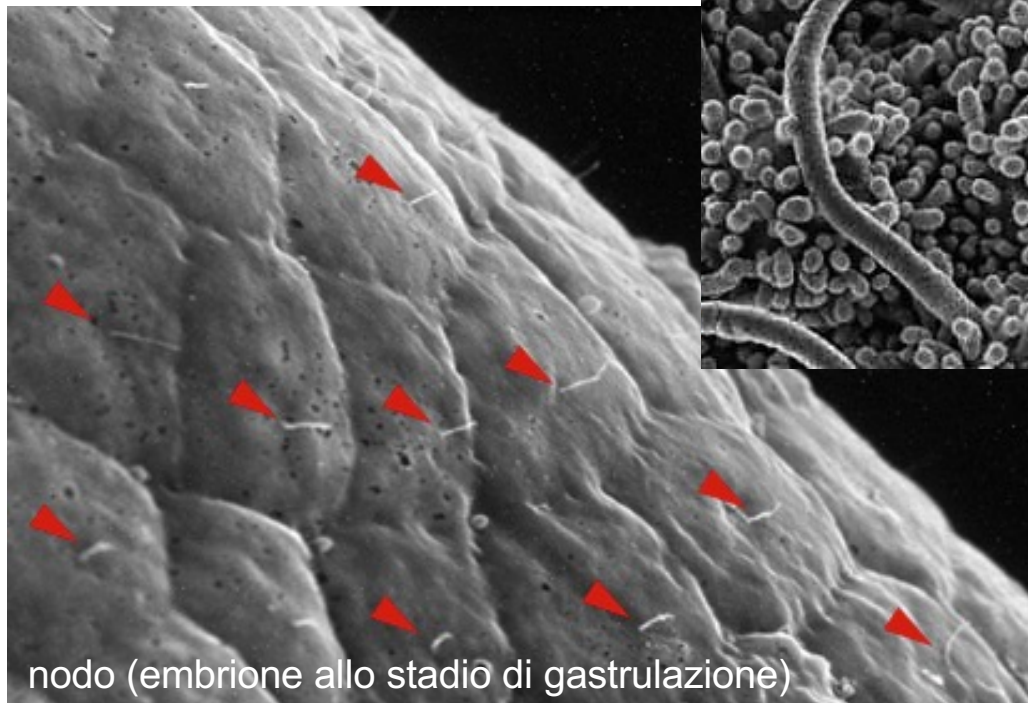
Possiede un corpo basale che coincide con il centriolo madre della cellula.

L'assonema è privo della coppia di microtubuli centrali (schema 9+0)

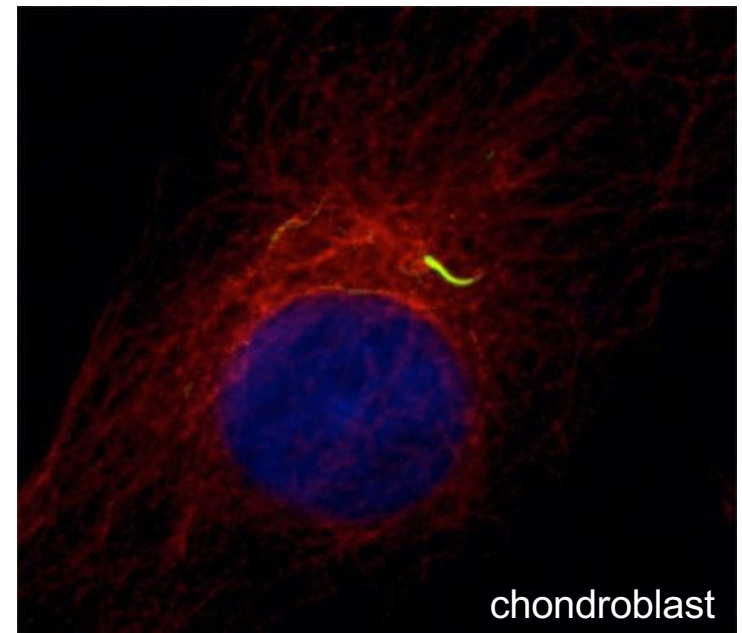
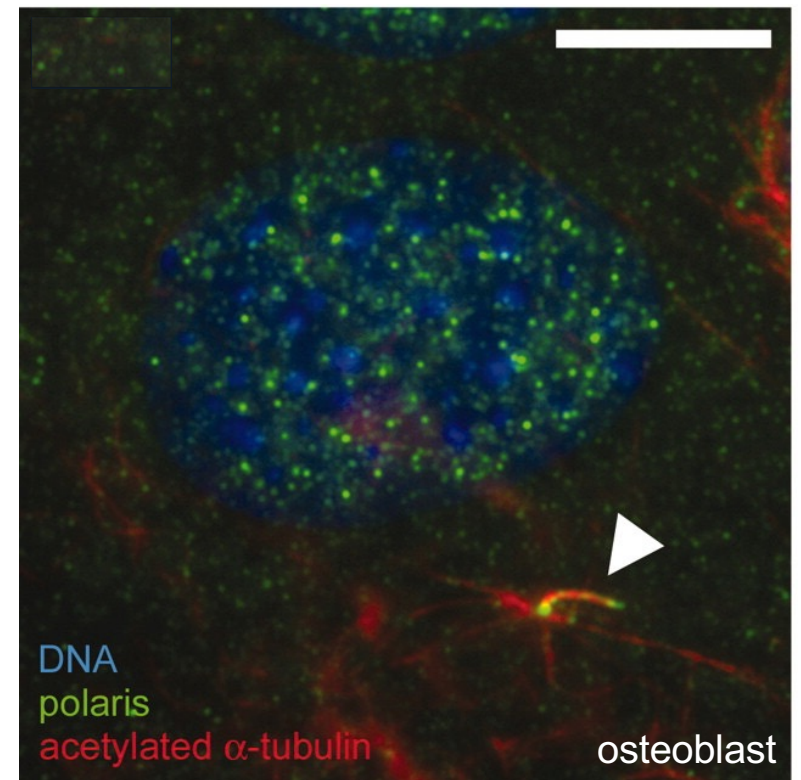
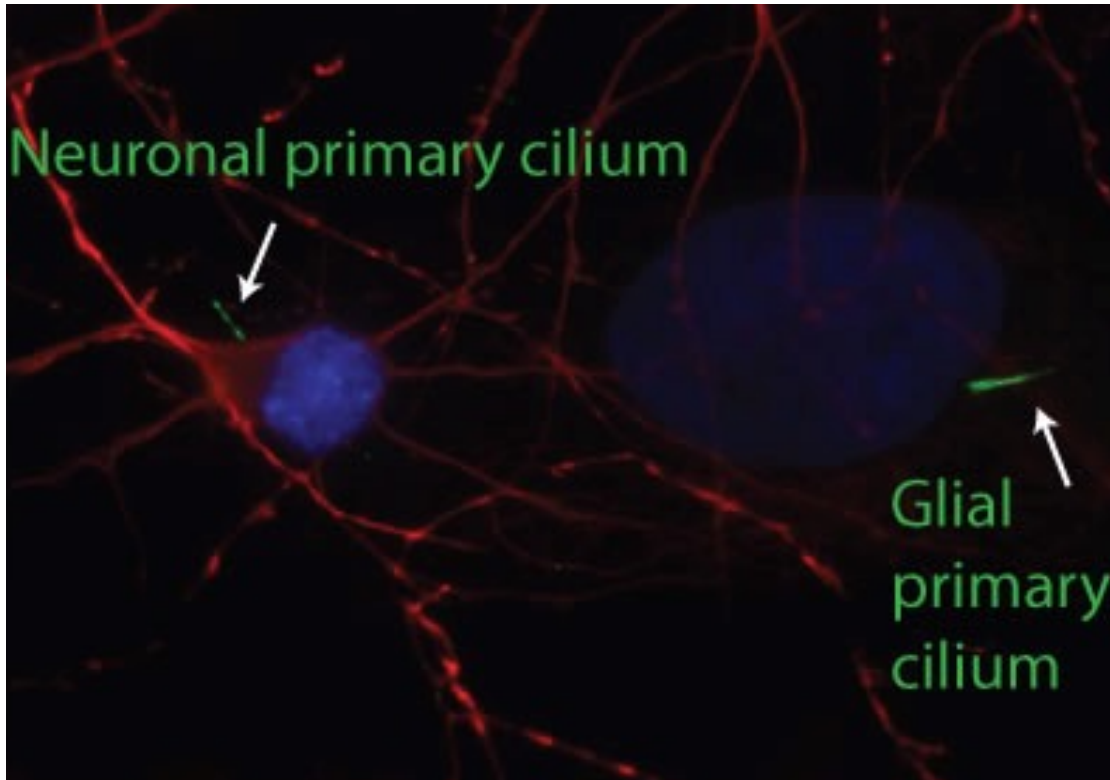
CIGLIO PRIMARIO



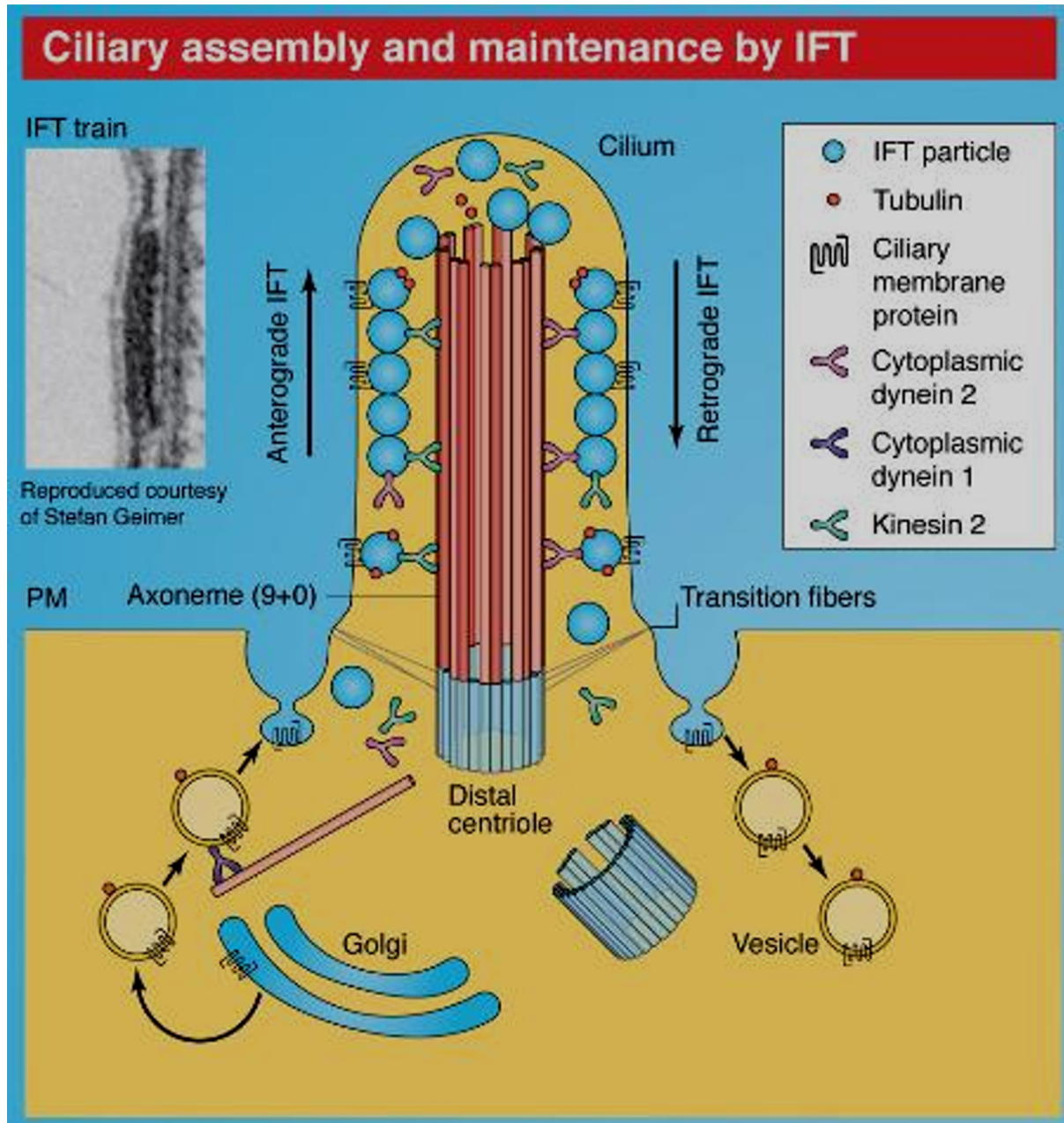
mesotelio



CIGLIO PRIMARIO



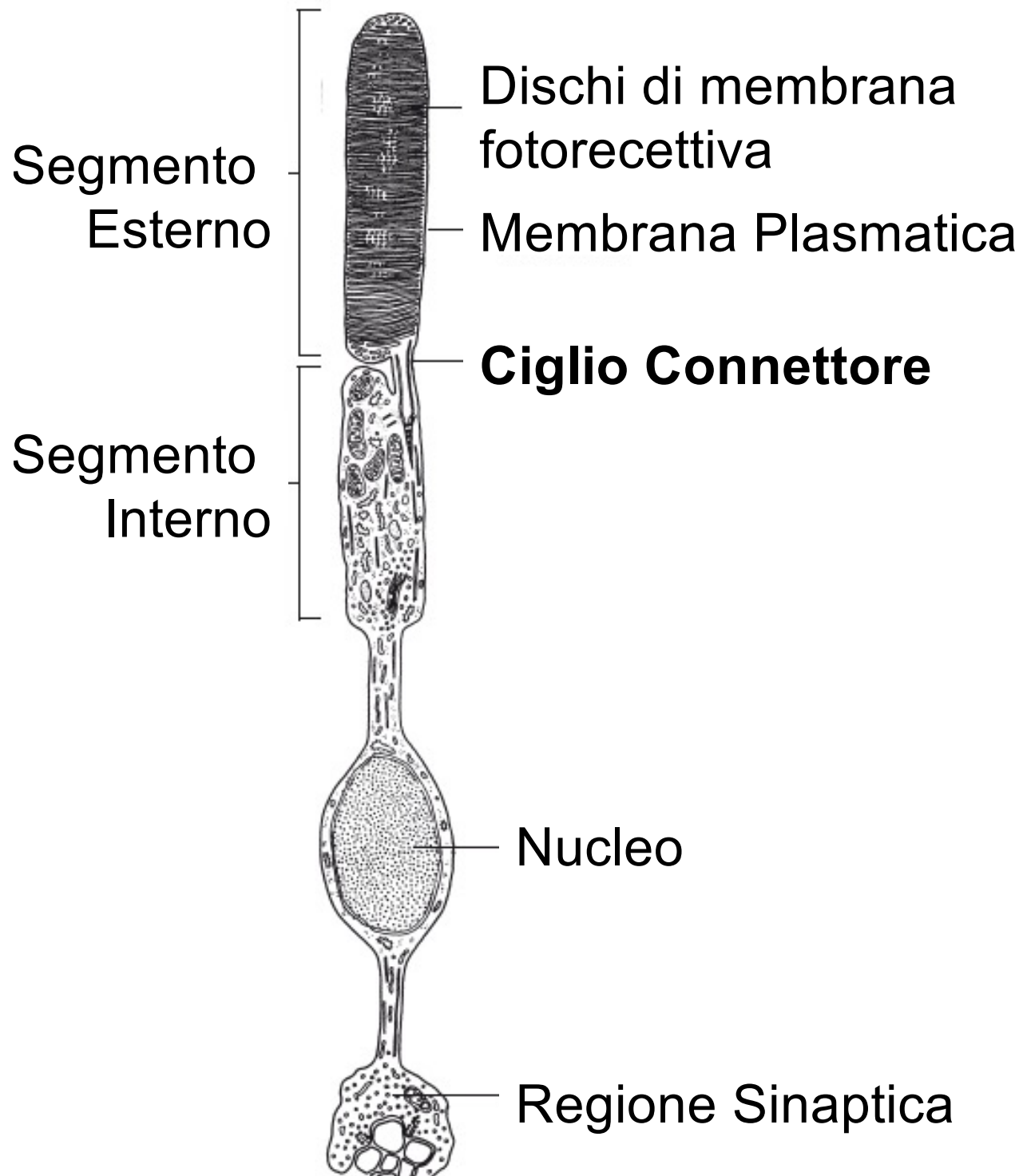
CIGLIO PRIMARIO: RUOLI



Meccano-sensore. Ad es., nei tubuli renali il flusso di urina attiva l'assorbimento del Ca^{2+} .

Chemio-sensore. Numerosi recettori per fattori di crescita/ormoni (ad es. Hh, Wnt, FGF, somatostatina) sono concentrati nel ciglio primario mediante un *trasporto intra-flagellare (IFT)* di complessi proteici di membrana lungo l'assonema.

Mutazioni che alterano il IFT portano a malattie genetiche, la più frequente delle quali è il **rene policistico**.



Un tipo particolare di ciglio primario è il segmento esterno dei coni e dei bastoncelli.

Anche in questo caso, il ciglio funge da binario per trasportare vescicole, che andranno a comporre i dischi di membrana fotorecettiva.