

Lezione 15

Il Citoscheletro: i Microtubuli

- Struttura e funzione dei microtubuli
- Formazione, allungamento e accorciamento dei microtubuli
- Il ruolo del GTP nella stabilità dei microtubuli
- Il centrosoma ed il complesso γ TuRC
- Proteine MAP motrici e non motrici
- Le dineine e le chinesine
- Esempi di alterazioni nelle dineine citoplasmatiche
- Le ciglia e i flagelli

Il Citoscheletro: i Microfilamenti

- Struttura e funzioni dei microfilamenti di actina
- Il processo di polimerizzazione dell'actina
- Il ruolo dell'ATP e il complesso Arp2/3
- Le proteine accessorie dell'actina

Le proteine di collegamento

- L'esempio della distrofina
- Le miosine
- Il sarcomero
- Regolazione del citoscheletro di actina tramite proteine della famiglia Rho (Rho, Rac e CDC42)
- La migrazione cellulare
- L'esempio della polarizzazione e chemiotassi dei neutrofili

I filamenti Intermedi

- Polimerizzazione, struttura e funzioni
- Le cheratine e la lamina nucleare
- I legami tra diversi elementi del citoscheletro
- Le connessioni tra nucleoscheletro e citoscheletro

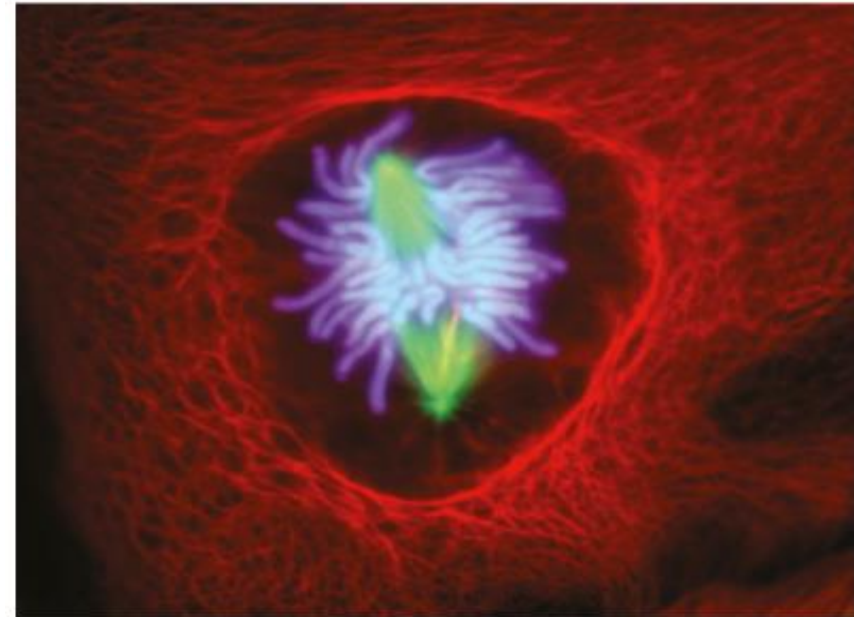
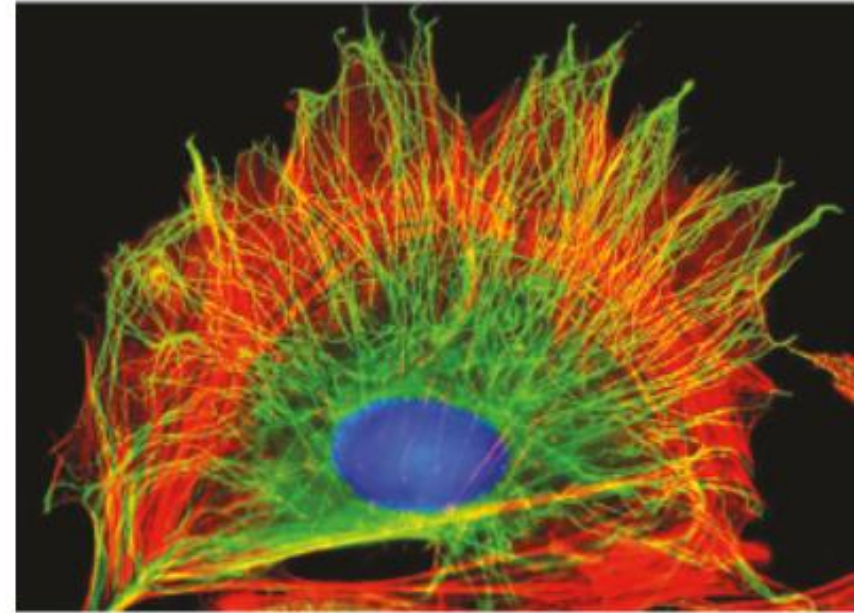
Il Citoscheletro: Struttura, Dinamica e Funzione

- Le cellule devono **organizzarsi nello spazio** e **interagire meccanicamente tra loro** e con l'ambiente circostante.
- Devono possedere:
 - una **forma corretta** e una struttura interna robusta;
 - capacità di **cambiare forma e muoversi**;
 - abilità di **riorganizzare** i propri componenti interni **durante crescita, divisione** e adattamento.
- Tutte queste funzioni dipendono da un complesso sistema di filamenti: **il citoscheletro**.

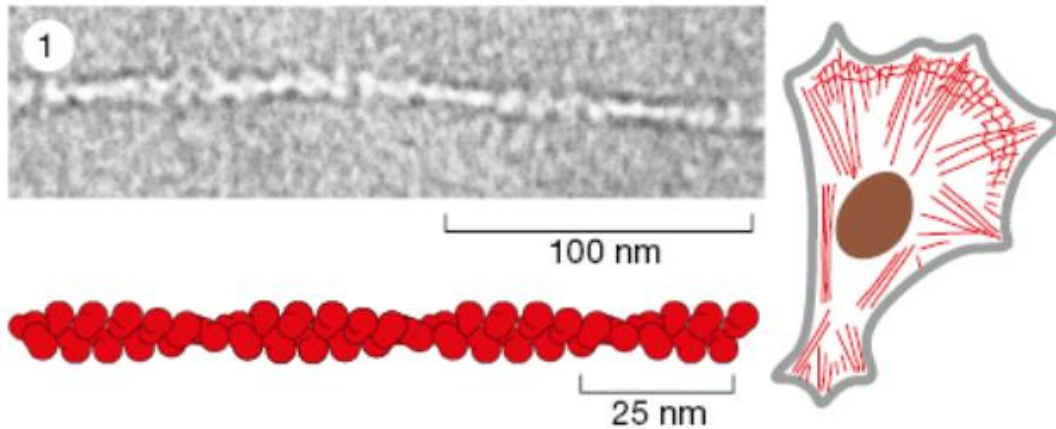
Il citoscheletro è un insieme di filamenti proteici altamente organizzati che si trovano nel citoplasma e si estendono fino alla membrana plasmatica.

Tre principali famiglie di filamenti:

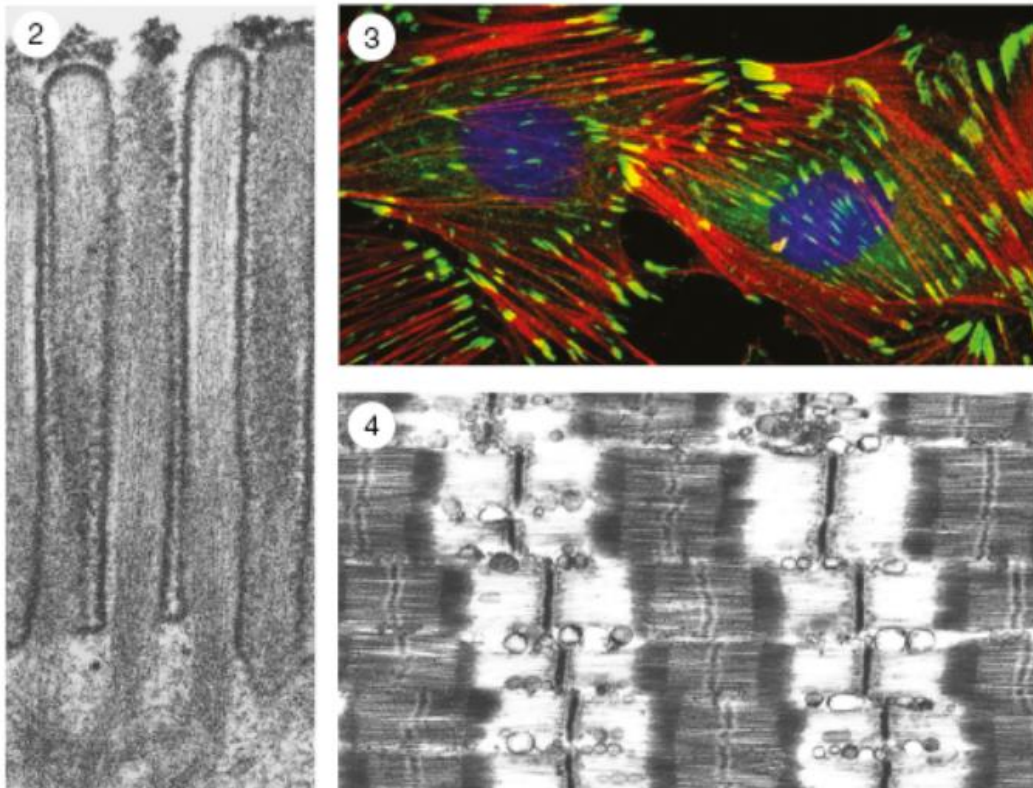
1. Filamenti di actina (microfilamenti)
2. Microtubuli
3. Filamenti intermedi



I Filamenti di Actina

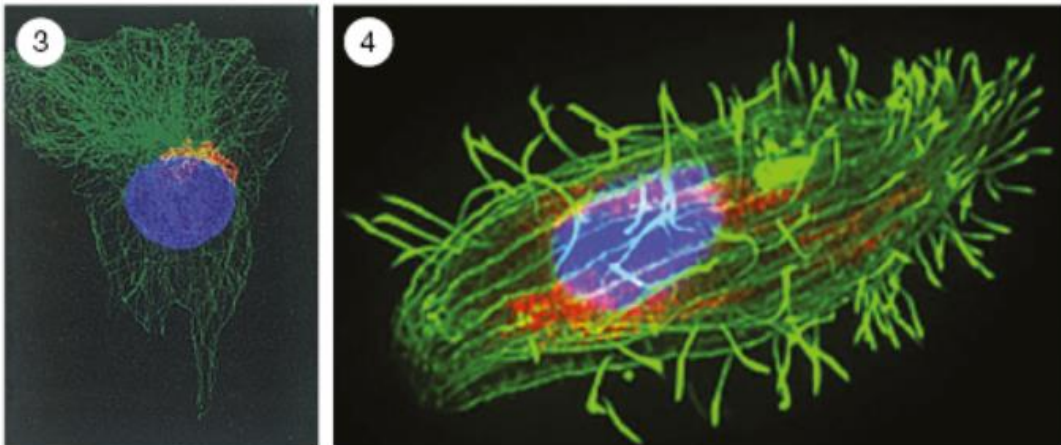
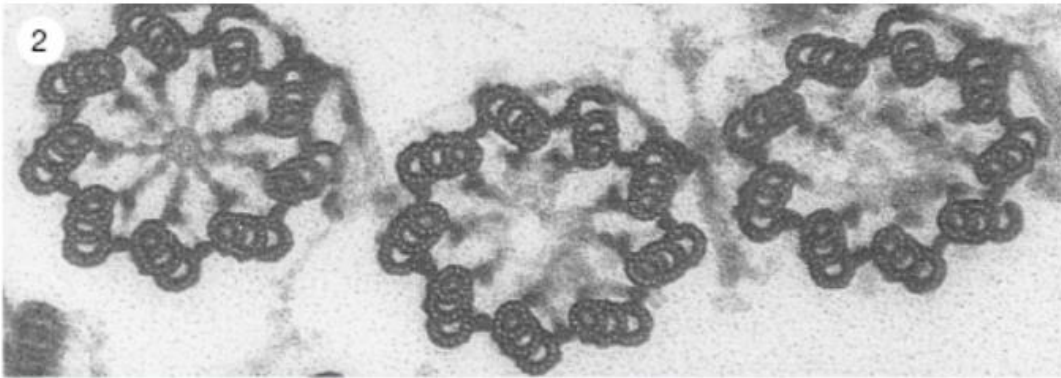
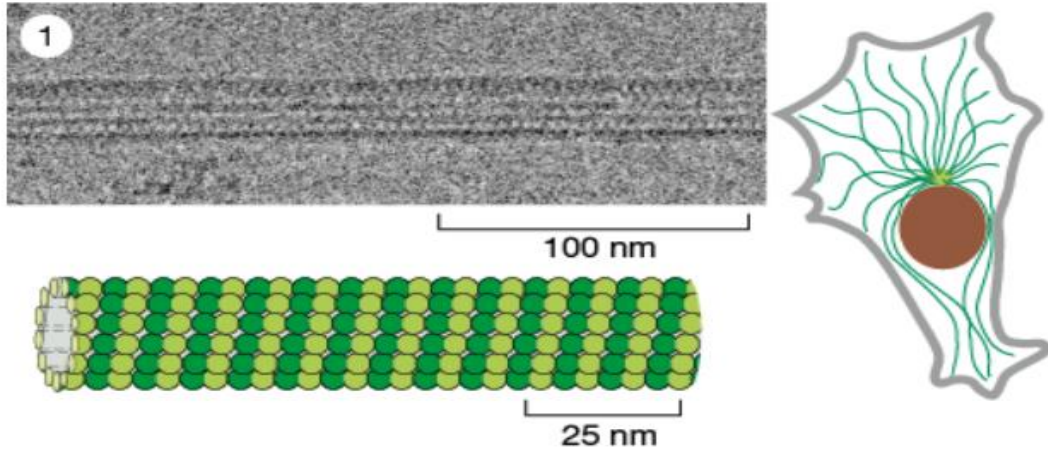


- I **filamenti di actina** (noti anche come **microfilamenti**) sono **polimeri elicoidali** della proteina **actina**.
- Essi appaiono come **strutture flessibili**, con un diametro di 8 nm, e sono **organizzati in**: **vari fasci lineari**, **reti bidimensionali** e **gel tridimensionali**.
- **Sebbene** i filamenti di actina siano **dispersi in tutta la cellula**, sono **concentrati soprattutto nella corteccia**, appena sotto la **membrana plasmatica**.



- 1 Singolo filamento di actina:**
 - Struttura elicoidale, polarizzata e dinamica.
- 2 Microvilli:**
 - Proiezioni apicali delle cellule epiteliali intestinali;
 - Contengono fasci paralleli e stabili di filamenti di actina.
- 3 Fibre da stress (in rosso):**
 - Fasci contrattili di actina associati a **adesioni focali** (in verde);
 - Consentono la **trasduzione meccanica** e l'ancoraggio al substrato.
- 4 Muscolo striato:**
 - I filamenti di actina si organizzano in **unità ripetitive (sarcomeri)**;
 - Interagiscono con la **miosina** per generare la contrazione.

I Microtubuli



- I **microtubuli** sono **lunghi cilindri cavi** composti dalla proteina **tubulina**.
- Con un diametro esterno di 25 nm, essi sono **molto più rigidi dei filamenti di actina**.
- I microtubuli **sono lunghi e diritti** e spesso hanno **un'estremità attaccata a un centro organizzatore dei microtubuli (MTOC) chiamato centrosoma**.

1 Singolo microtubulo:

- Cilindro cavo formato da **13 protofilamenti** di tubulina α/β .

2 Sezione trasversale alla base di tre ciglia:

- Mostra **triplette di microtubuli** disposte secondo un pattern preciso (nel corpo basale).

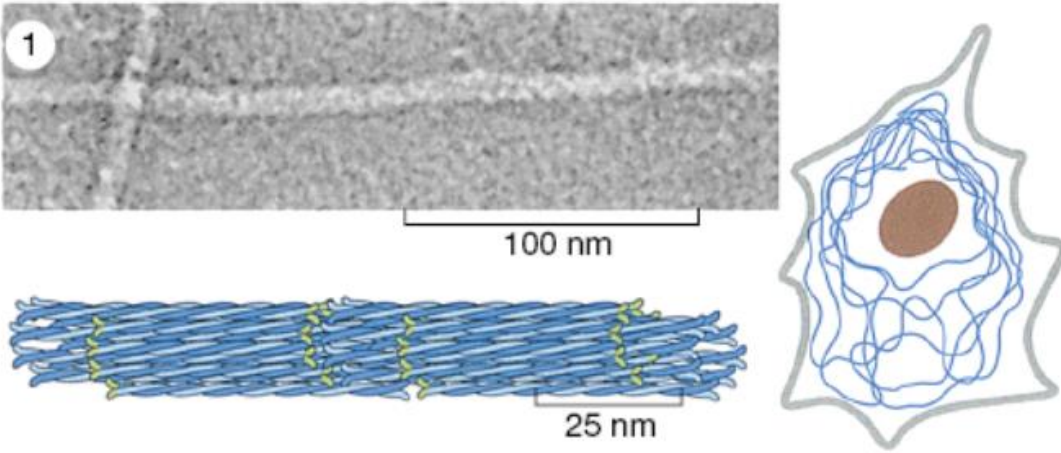
3 Matrice dei microtubuli (verde) e organelli (rosso) in interfase:

- Rete che parte dal centrosoma e si irradia nel citoplasma

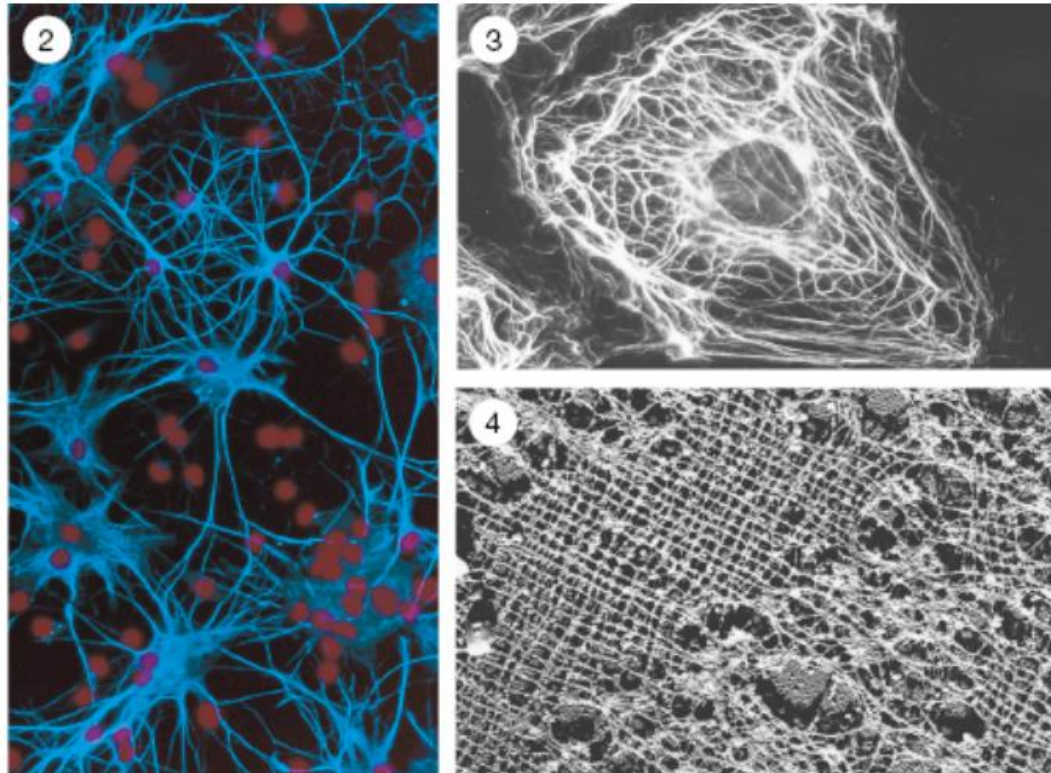
4 Protozoo ciliato (e Flagelli):

- L'intera struttura cellulare è organizzata **intorno a un sistema di microtubuli**, che fornisce supporto e motilità.

I Filamenti Intermedi



- I **filamenti intermedi** sono **fibre simili a corde** con un diametro di circa 10 nm; sono **formati da proteine dei filamenti intermedi**, che costituiscono una **famiglia grande ed eterogenea**.
- **Un tipo** di filamento intermedio forma un reticolo chiamato **lamina nucleare** appena sotto la membrana nucleare interna.
- **Altri tipi** si **estendono nel citoplasma**, conferendo alle cellule **forza meccanica**. In un **tessuto epiteliale** essi **attraversano il citoplasma da una giunzione cellulare all'altra**, rinforzando così l'intero epitelio.

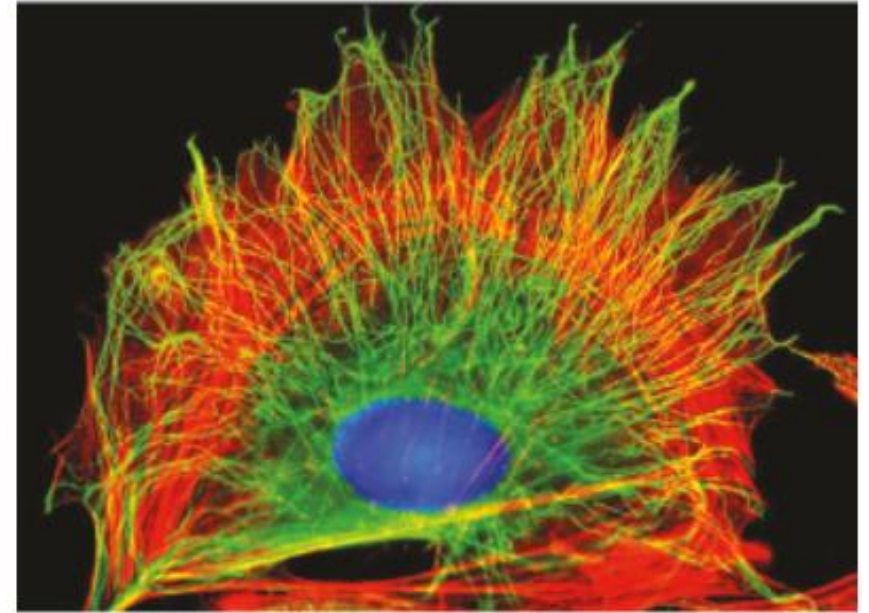


- 1 Singolo filamento intermedio:**
 - Struttura flessibile ma resistente, come una **corda intrecciata**.
- 2 Filamenti intermedi nei neuroni (blu):**
 - Formano una rete che stabilizza i lunghi **assoni e dendriti**.
- 3 Filamenti intermedi nelle cellule epiteliali:**
 - Si estendono **da una giunzione cellulare all'altra**, rinforzando l'intero tessuto.
- 4 Lamina nucleare:**
 - Reticolo di filamenti intermedi sotto la membrana nucleare interna;
 - Conferisce **forma e stabilità** al nucleo e ancora i **pori nucleari**.

Proprietà de Citoscheletro: Polarità e Dinamicità

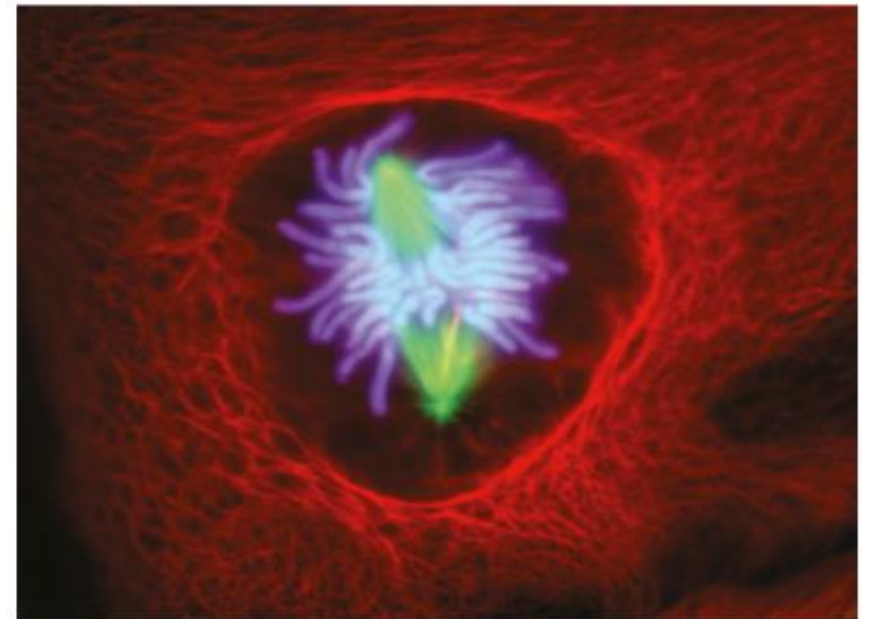
Strutture polarizzate e auto-organizzate

- I filamenti citoscheletrici **formano strutture polarizzate, con estremità distinte in termini di crescita e dinamica.**
- Si **auto-organizzano grazie all'interazione tra monomeri e proteine regolatrici.**
- Sono **altamente dinamici**, permettendo alla **cellula di cambiare forma, muoversi e riorganizzare il proprio interno** in risposta a segnali esterni.

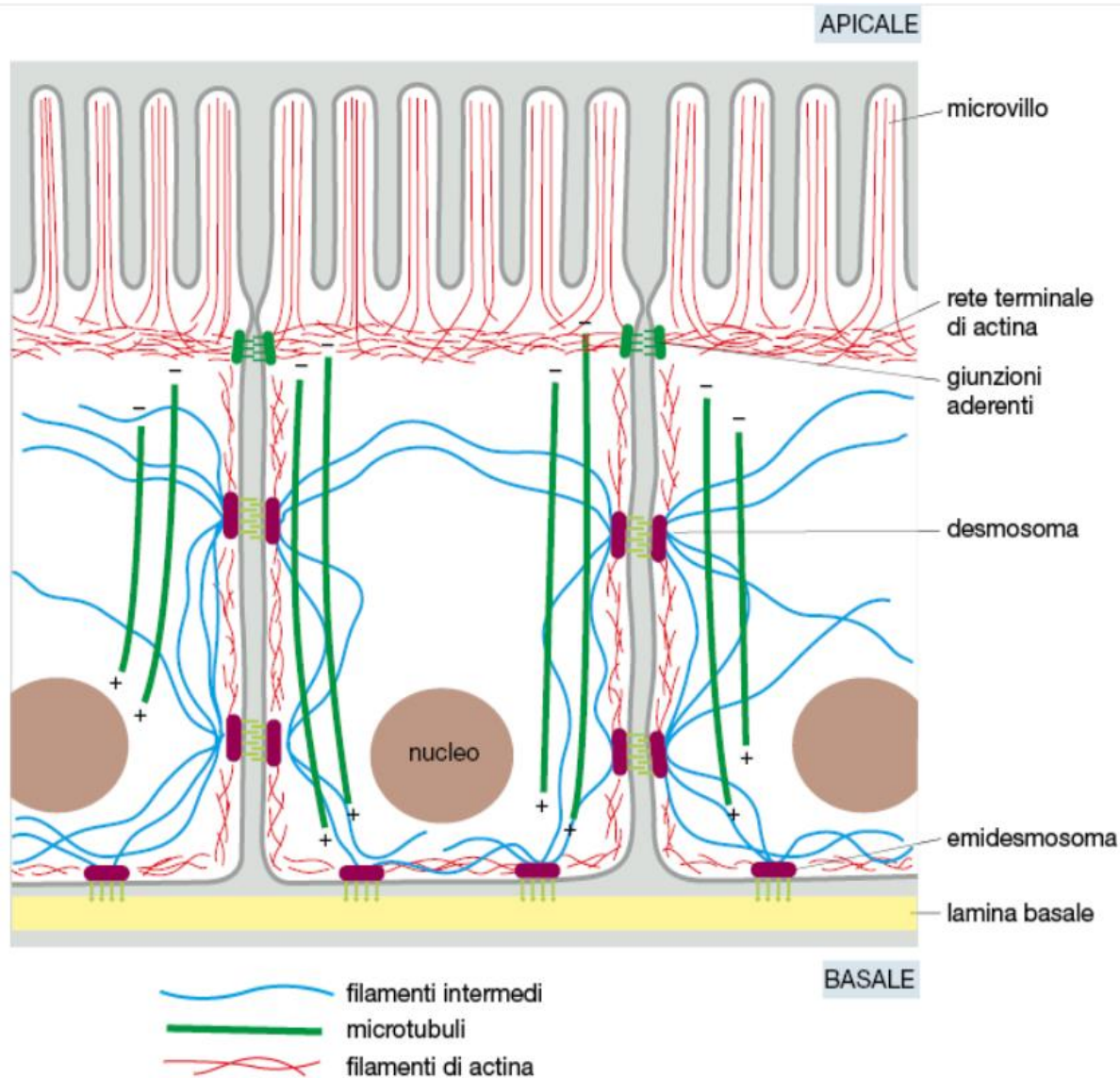


Dinamicità del citoscheletro

- I sistemi citoscheletrici **sono in costante rinnovamento.**
- **Strutture macroscopiche stabili** (es. ciglia, microvilli, assoni) possono **persistere per ore o per tutta la vita della cellula, ma i singoli componenti** molecolari vengono **continuamente sostituiti.**
- Ciò consente **una riorganizzazione efficiente** con **minimo dispendio energetico.**



Polarità Cellulare: Definizione e Importanza



Il citoscheletro non solo conferisce forma, ma **definisce la polarità cellulare**: capacità di **distinguere sopra/sotto e davanti/dietro**.

La **polarità citoscheletrica** guida:

- **orientamento della cellula** nello spazio;
- **direzionalità del trasporto intracellulare**;
- **formazione di domini funzionali** distinti.

Coordinazione tra i tre sistemi di filamenti

- La cooperazione tra i tre tipi di filamenti è essenziale per mantenere **forma, funzione e integrità** delle cellule polarizzate:
 - **Actina** → controlla la **superficie apicale** e le **giunzioni aderenti**.
 - **Microtubuli** → stabiliscono la **polarità apico-basale** e dirigono il traffico.
 - **Filamenti intermedi** → garantiscono **coesione e resistenza meccanica** del tessuto.

Polarità Cellulare Delle Cellule Epiteliali

Superficie apicale (superiore):

- Esposta al lume intestinale;
- Contiene **microvilli** sostenuti da **fasci di filamenti di actina (rossi)** → aumentano la **superficie assorbente** per i nutrienti.

Zona subapicale:

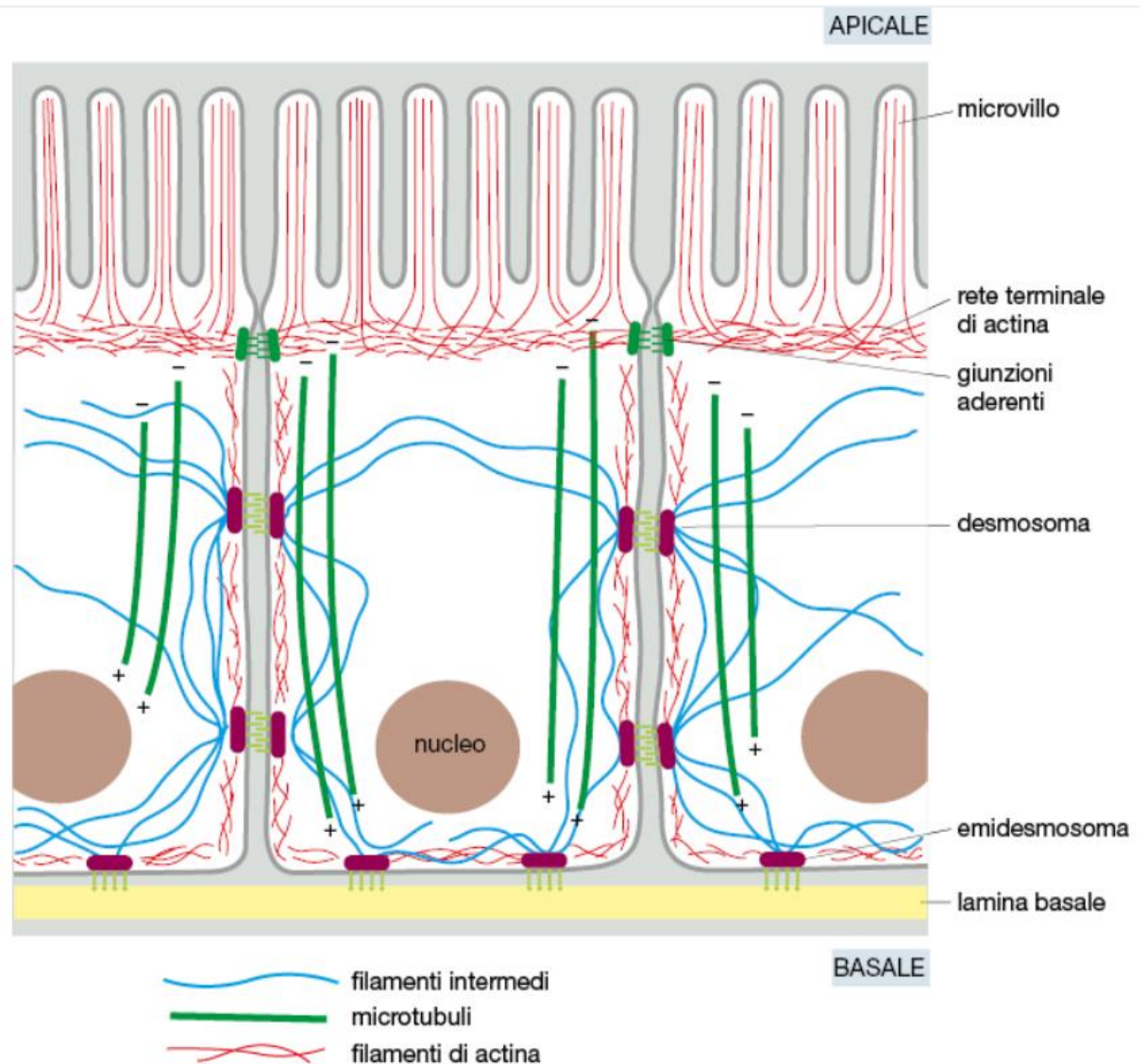
- Una **banda circolare di actina** corre lungo la cellula;
- È **collegata** a **giunzioni aderenti cellula-cellula**, che **ancorano saldamente le cellule tra loro**.

Filamenti intermedi (blu):

- Connessi a **desmosomi (cellula-cellula)** e **emidesmosomi (cellula-matrice)**;
- Rinforzano l'intero foglietto epiteliale e lo **ancorano alla matrice extracellulare**.

Microtubuli (verdi):

- **Disposti verticalmente** dall'apice alla base;
- Creano un **sistema di coordinate intracellulare** che **guida il traffico vescicolare direzionale** e la **distribuzione di proteine e organelli verso domini apicali o basolaterali**.



Regolazione: Come la Cellula Controlla i Filamenti

La cellula controlla:

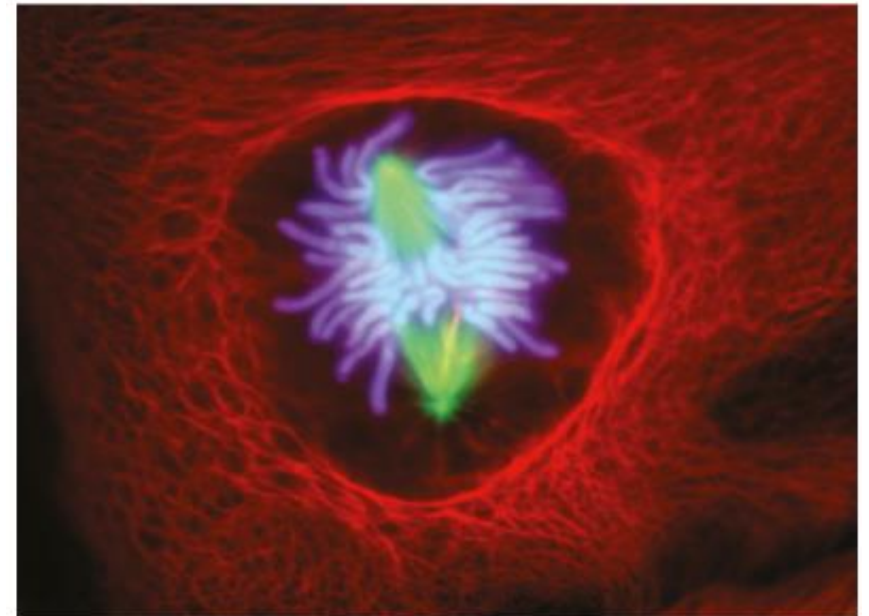
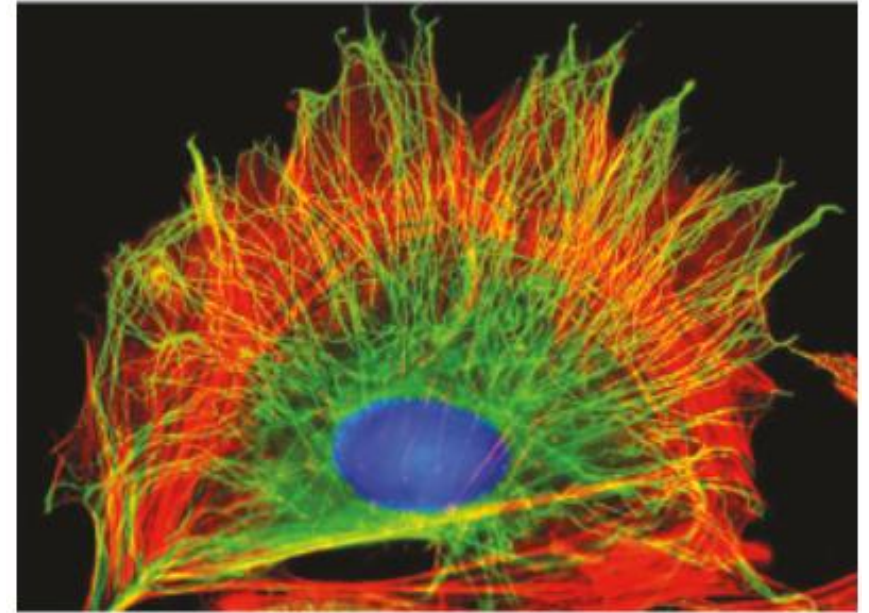
- **Lunghezza, stabilità, numero, geometria** dei filamenti;
- **Connessioni tra filamenti** e con altre strutture (organelli, membrana).
- Ciò consente di costruire **strutture di ordine superiore** diverse.

Due vie principali:

1. **Modifiche covalenti** delle subunità (es. **fosforilazione** filamenti intermedi in mitosi).
2. **Proteine accessorie** (centinaia!) che:
 - **definiscono siti di nucleazione e assemblaggio;**
 - **regolano l'equilibrio subunità** $\leftrightarrow$ **filamento;**
 - **modulano le cinetiche** di crescita/disassemblaggio;
 - **imbrigliano energia** per generare **forze;**
 - **collegano filamenti** tra loro o con organelli/membrana.

Il Ruolo delle Proteine Accessorie

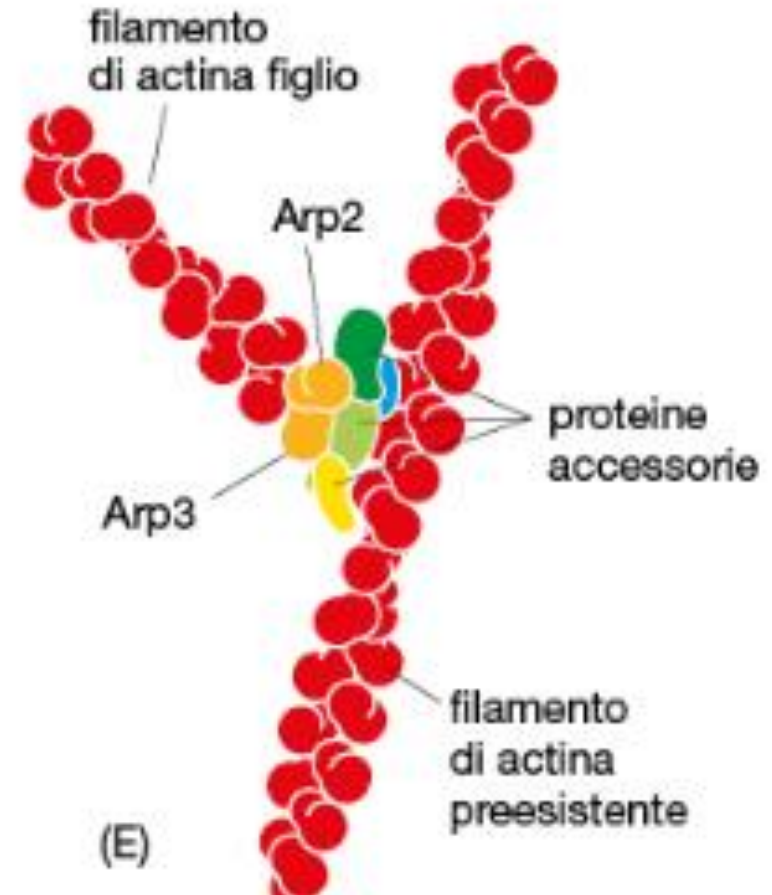
- I **filamenti** non agiscono da soli, ma **interagiscono con centinaia di proteine accessorie**.
- Queste proteine **regolano l'assemblaggio e la disgregazione** dei filamenti;
- **Collegano** i diversi sistemi citoscheletrici tra loro e **con altre strutture cellulari**;
- **Comprendono proteine motrici** (motor proteins) che:
 - **idrolizzano ATP**;
 - convertono energia chimica in **forza meccanica**;
 - **trasportano organuli** o muovono i filamenti stessi.



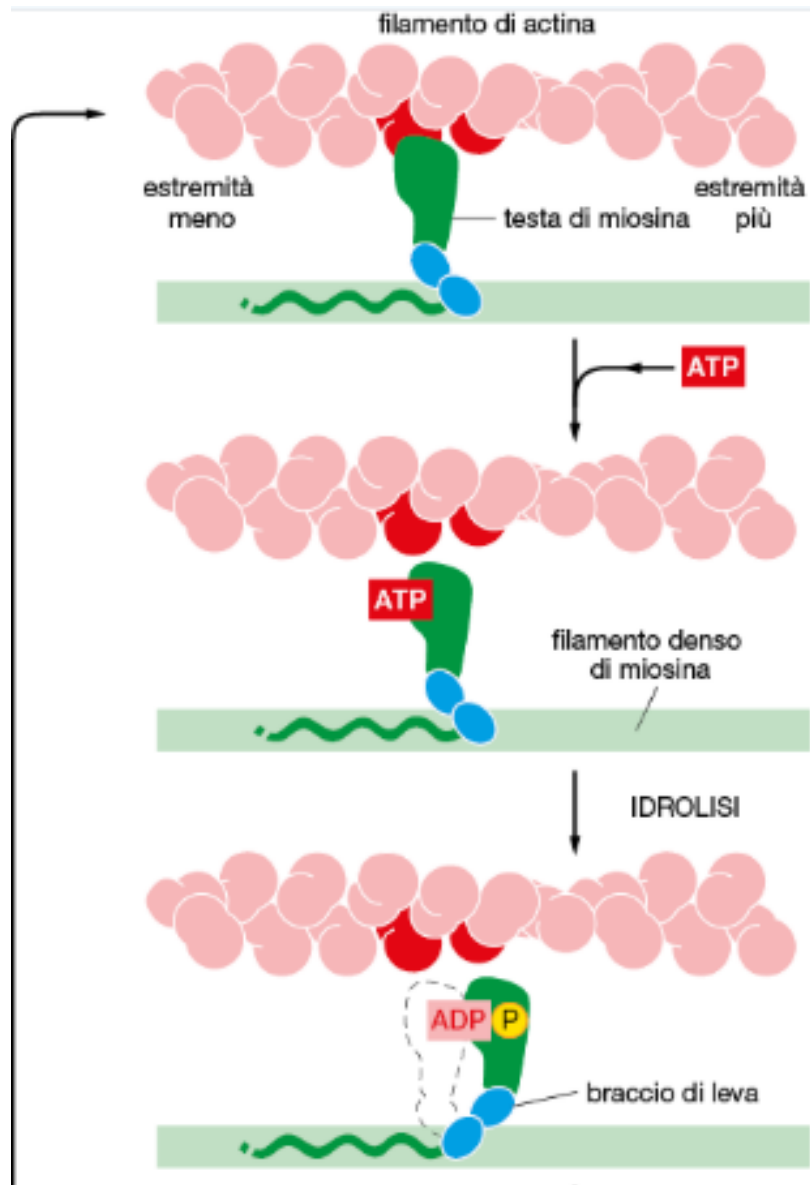
Proteine Accessorie

Proteine accessorie = interfaccia con i segnali

- Le proteine accessorie traducono **segnali intra/extracellulari** in **azioni citoscheletriche**:
 - es. trasformazioni cicliche durante il **ciclo cellulare**;
 - risposte rapide a **segnali chemotattici** o **meccanici**.
- **Azione di gruppo** → la cellula mantiene un'**organizzazione interna ordinata ma flessibile** e, in molti casi, **si muove**.



Proteine Motrici



Le proteine motrici (motor proteins)

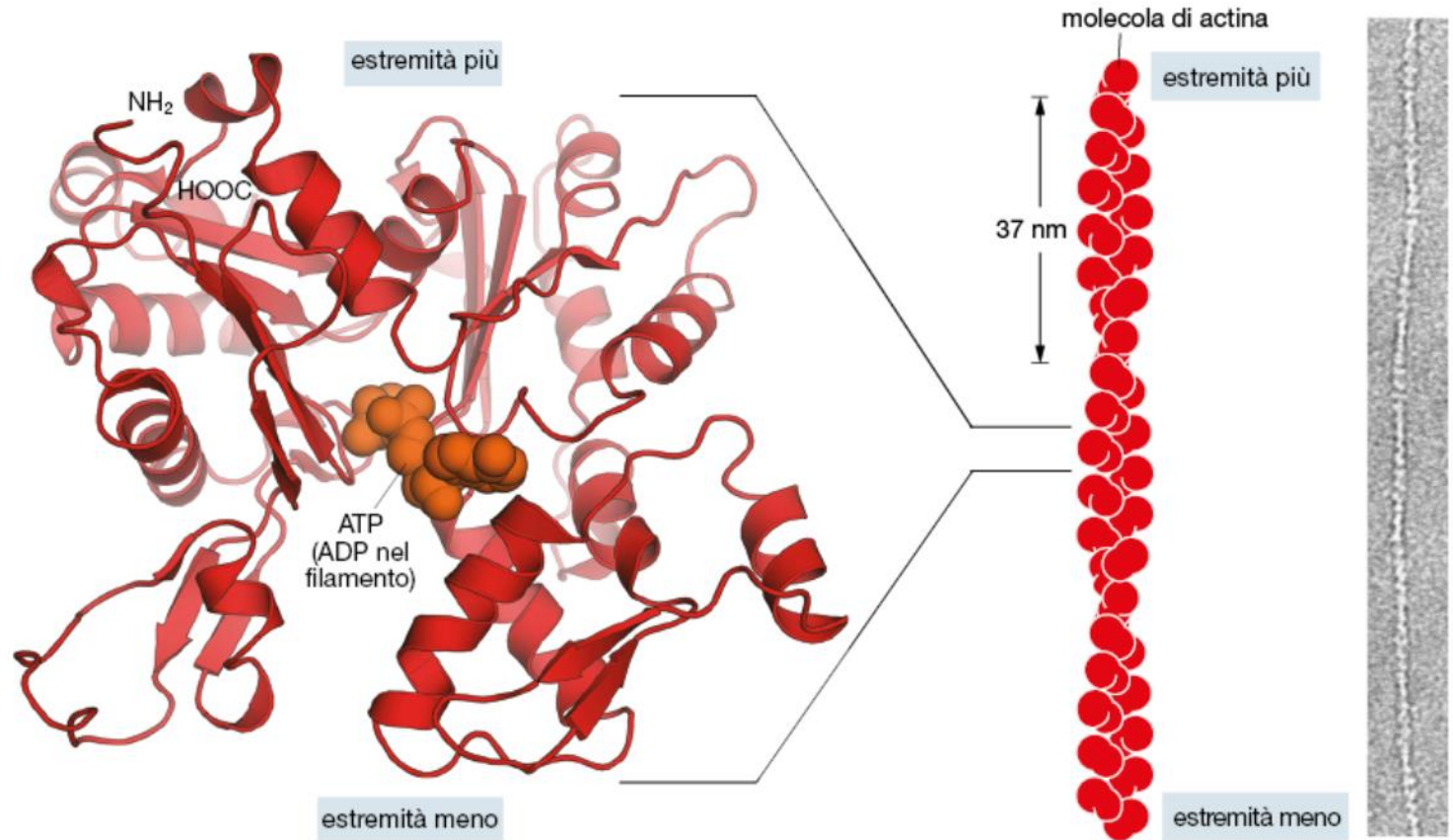
- Proteine che si **attaccano a filamenti polarizzati** e **usano ATP per muoversi unidirezionalmente**.
- Decine di **motori** coesistono in ogni cellula, **differendo per**:
 - **Binario usato**: actina (miosine) vs microtubuli (chinesine/dineine);
 - **Direzione di marcia** (Estremità + o -);
 - **Carico trasportato**.
- **Funzioni**:
 - **Trasporto di organelli** a membrana (mitocondri, Golgi, vescicole secretorie) **verso posizioni specifiche**;
 - **Scorrimento dei filamenti tra loro** → **forza per contrazione muscolare, battito ciliare, divisione cellulare** (es. posizionamento del fuso).

L'Actina

- Il citoscheletro di **actina** supporta un'ampia **gamma di funzioni in molti tipi cellulari**.
- **Actina G (globulare)**: subunità monomerica;
- **Actina F (filamentosa)**: polimero elicoidale.
- Ogni subunità (actina G) è un **polipeptide di 375 aa** che **lega saldamente ATP o ADP**.

Nei vertebrati: **3 isoforme** principali

- **α -actina**: **solo** nelle cellule **muscolari**;
- **β -actina** e **γ -actina**: co-espresse nella **maggior parte** delle cellule **non muscolari**.



Assemblaggio Testa-Coda e Struttura dell'Actina F

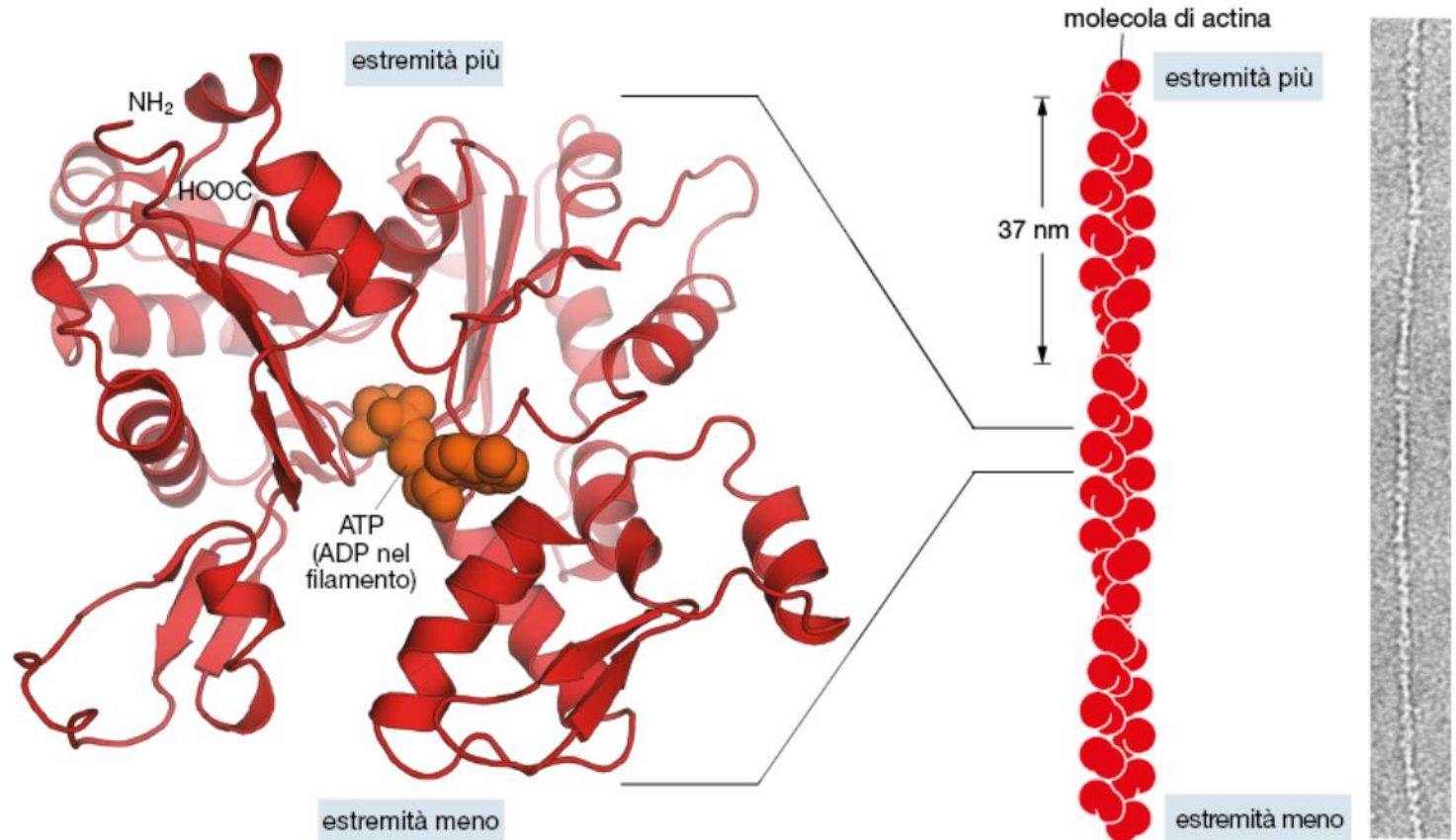
Monomero di Actina G

Il monomero di actina presenta una **profonda fessura centrale** che ospita **ATP o ADP**.

Il **nucleotide** è **fortemente associato** e partecipa alla **dinamica** del filamento.

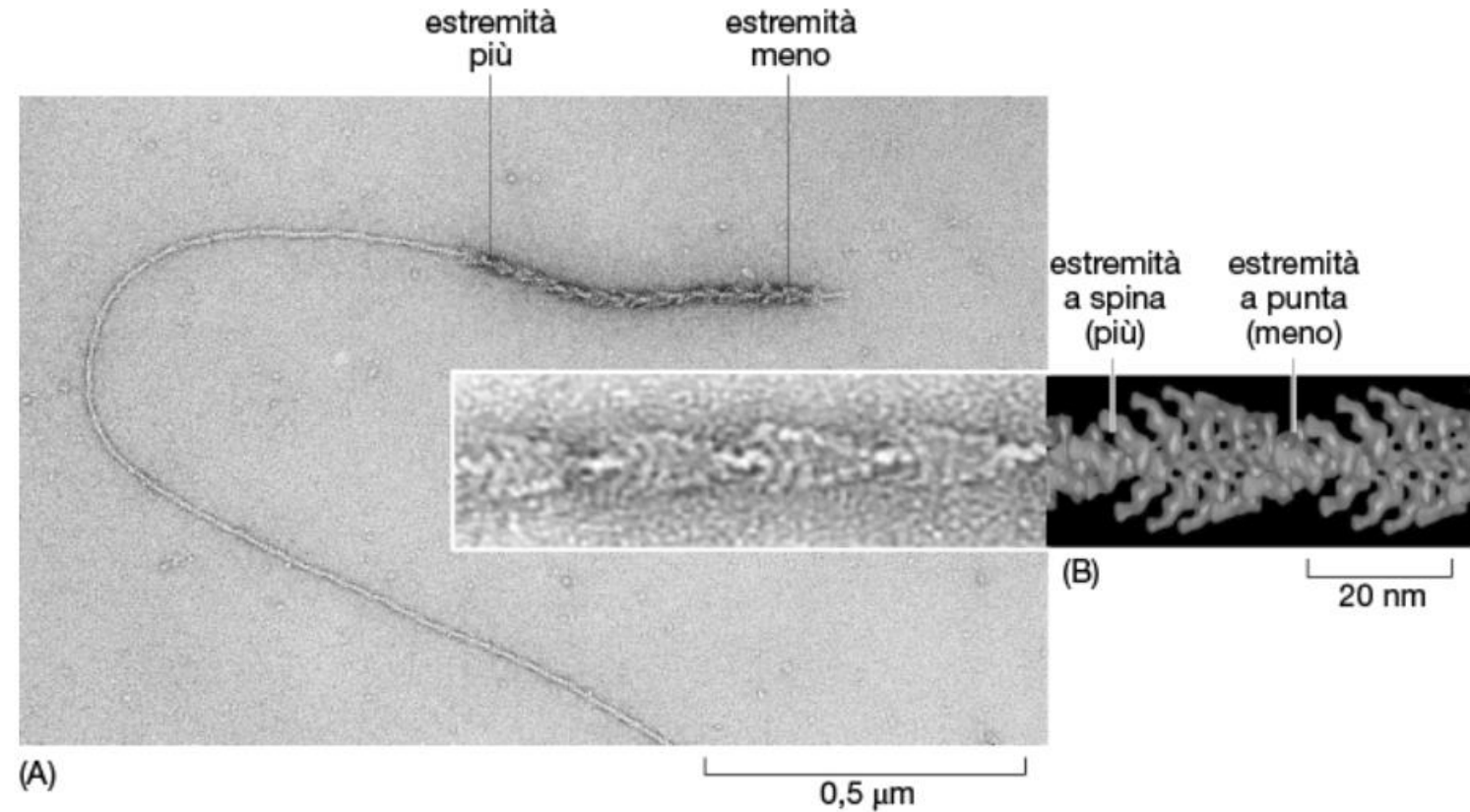
Polimero di Actina F

- Le subunità si **assemblano testa-coda** generando una **stretta elica destrorsa**.
- L'**actina F** è larga **~8 nm** ed è composta da **due protofilamenti** che si **avvolgono** parallelamente.
- Ripetizione elicoidale** ogni **~37 nm**.
- Tutte le subunità in un filamento hanno **lo stesso orientamento**.



Polarità del Filamento ed Estremità

- I Filamenti sono polari:
 - Estremità meno (–) = crescita lenta, detta “a punta”;
 - Estremità più (+) = crescita veloce, detta “a spina”.
- Nel filamento, la fessura legante l’ATP di ciascuna subunità è rivolta verso l’estremità meno.
 - L’estremità “a spina” (+) è quella che polimerizza più rapidamente;
 - l’estremità “a punta” (–) cresce più lentamente.



Nucleazione: Il Passaggio Limitante

- La **nucleazione** è il **collo di bottiglia** della formazione dei filamenti di actina.
- Le **subunità (actina G)** si associano **spontaneamente** ma gli **oligomeri iniziali** sono **instabili**.
- **Quando si forma un nucleo stabile** (oligomero con **molti contatti** subunità-subunità), **il filamento può allungarsi rapidamente**.
- **Controllare la nucleazione** = **controllare forma e movimento cellulare**.

Un polimero elicoidale è stabilizzato da molteplici contatti fra subunità adiacenti.

Nel caso dell'actina, **due molecole di actina** si **legano debolmente** fra loro, ma l'aggiunta di un **terzo monomero di actina** per formare un trimero rende l'intero **gruppo più stabile**.

Si può avere **ulteriore aggiunta** di monomeri a questo trimero, che **agisce perciò da nucleo per la polimerizzazione**.

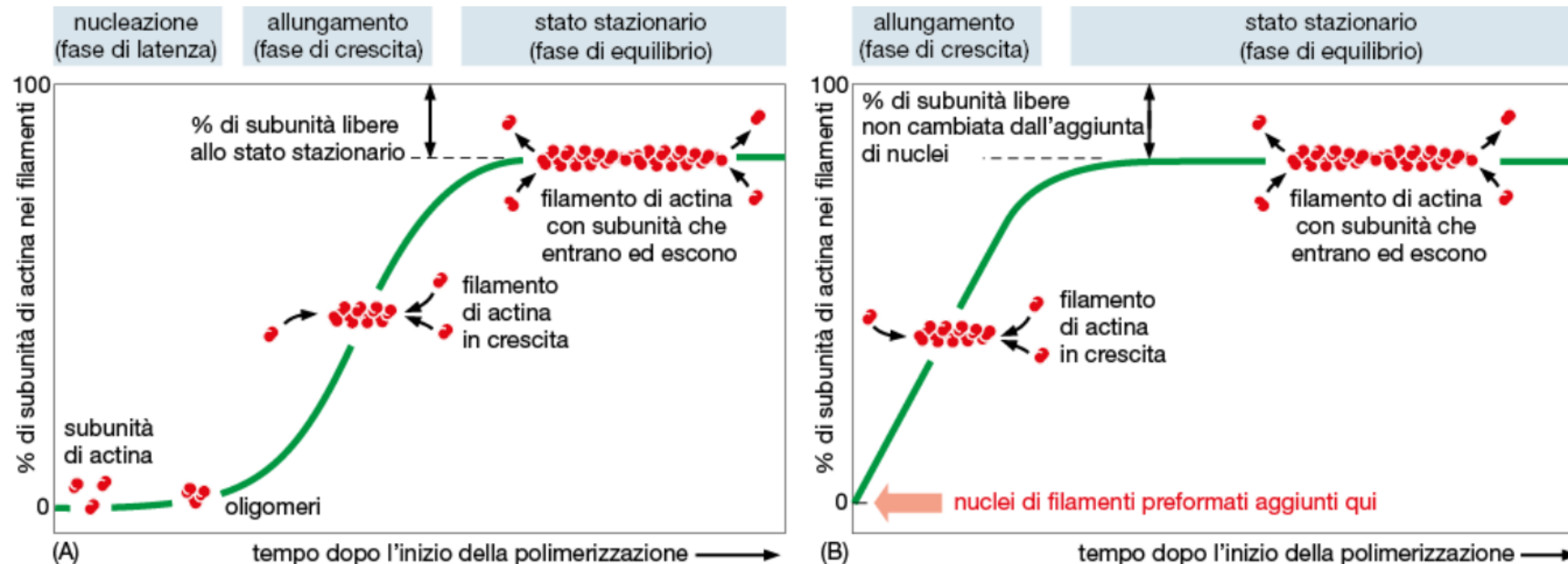


Polimerizzazione *in vitro*: Tre Fasi

1. **Fase di latenza (lag):** corrisponde al tempo richiesto per la nucleazione.
2. **Allungamento rapido (elongation):** crescita avviene quando i monomeri si aggiungono alle estremità esposte del filamento in crescita, provocando l'allungamento del filamento.
3. **Stato stazionario (steady state):** o stato stazionario, viene raggiunta quando la crescita del polimero dovuta ad **aggiunta del monomero è bilanciata esattamente dall'accorciamento** del polimero dovuto a disassemblaggio in monomeri.

L'assemblaggio di un nucleo è relativamente **lento all'inizio**, il che **spiega la fase di latenza** osservabile durante la polimerizzazione.

La **cellula** sfrutta la barriera di nucleazione **usando proteine specializzate** che **catalizzano la nucleazione in siti specifici** → definiscono dove si formano i nuovi filamenti.



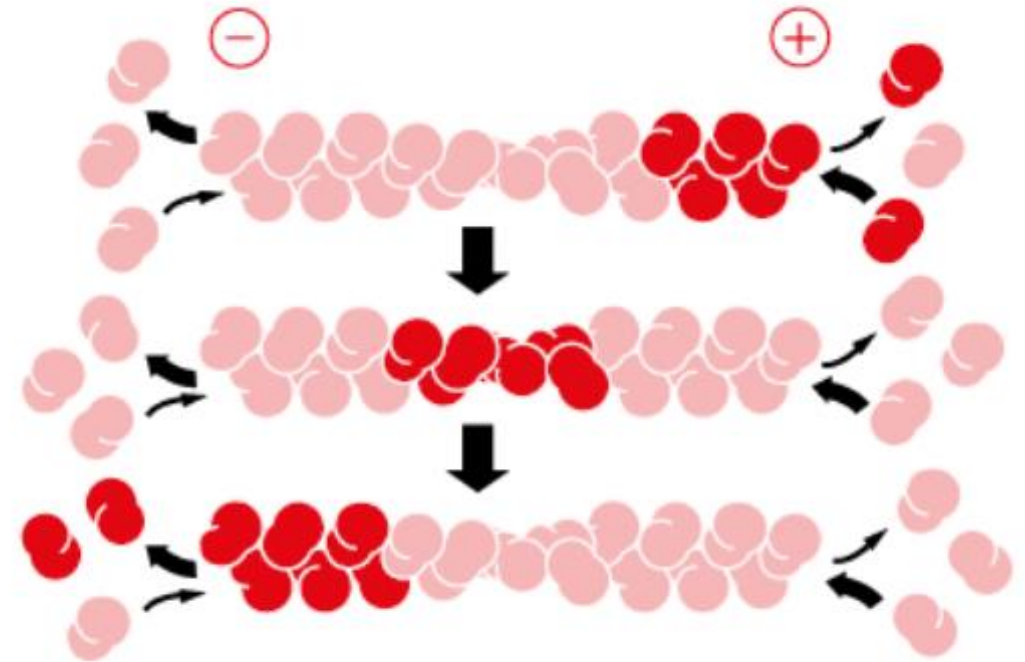
Polimerizzazione all'Estremità più e meno

Le due estremità di un filamento di actina o di un microtubulo **polimerizzano a velocità diverse**.

L'estremità a crescita rapida è chiamata **estremità più**, mentre l'estremità a **crescita lenta** è detta **estremità meno**.

La differenza di velocità di crescita alle due estremità **è resa possibile da cambiamenti nella conformazione** di ciascuna subunità mentre entra nel polimero.

Questo cambiamento di conformazione influenza la **velocità** con cui le subunità **sono aggiunte** alle due estremità.



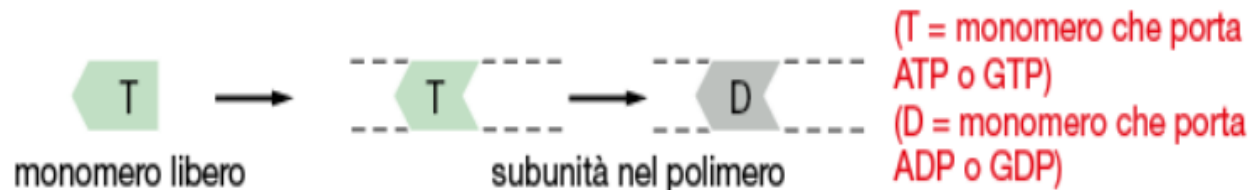
Idrolisi dei Nucleotidi e Cappuccio di ATP/GTP

Ciascuna molecola di **actina porta** una molecola di **ATP** saldamente attaccata (**Forma T**), che **viene idrolizzata a una molecola di ADP** (**Forma D**) saldamente attaccata **poco dopo il suo assemblaggio** nel polimero.

In modo simile, ciascuna molecola di **tubulina** porta un **GTP** saldamente legato, che è **convertito in un GDP** saldamente attaccato poco **dopo che la molecola si è assemblata** nel polimero.

L'**idrolisi** del nucleotide legato **riduce l'affinità di legame** della subunità **per le subunità adiacenti** e ne **aumenta la probabilità di dissociazione** da ciascuna estremità del filamento.

È in genere la **forma T** che si aggiunge al filamento e la **forma D** che lo lascia.



Cappuccio di ATP o di GTP

La **velocità di aggiunta di subunità** a un filamento di actina o a un microtubulo in crescita **può essere maggiore della velocità con cui il nucleotide legato viene idrolizzato**.

In queste condizioni l'estremità ha un "cappuccio" di subunità che **contengono il nucleoside trifosfato**: un cappuccio di ATP su un filamento di actina o un cappuccio di GTP su un microtubulo.



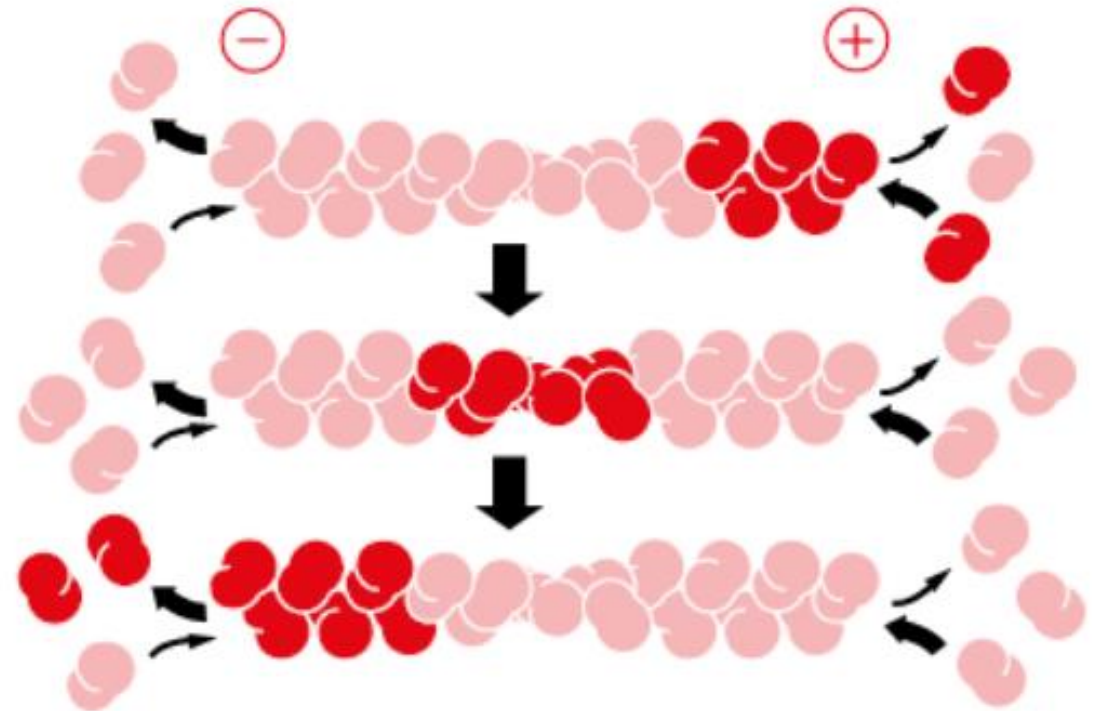
Treadmilling

Una **conseguenza dell'idrolisi del nucleotide** è che le subunità subiscono un **assemblaggio netto all'estremità più** e un **disassemblaggio netto all'estremità meno**, che procedono però ad un **ritmo identico**.

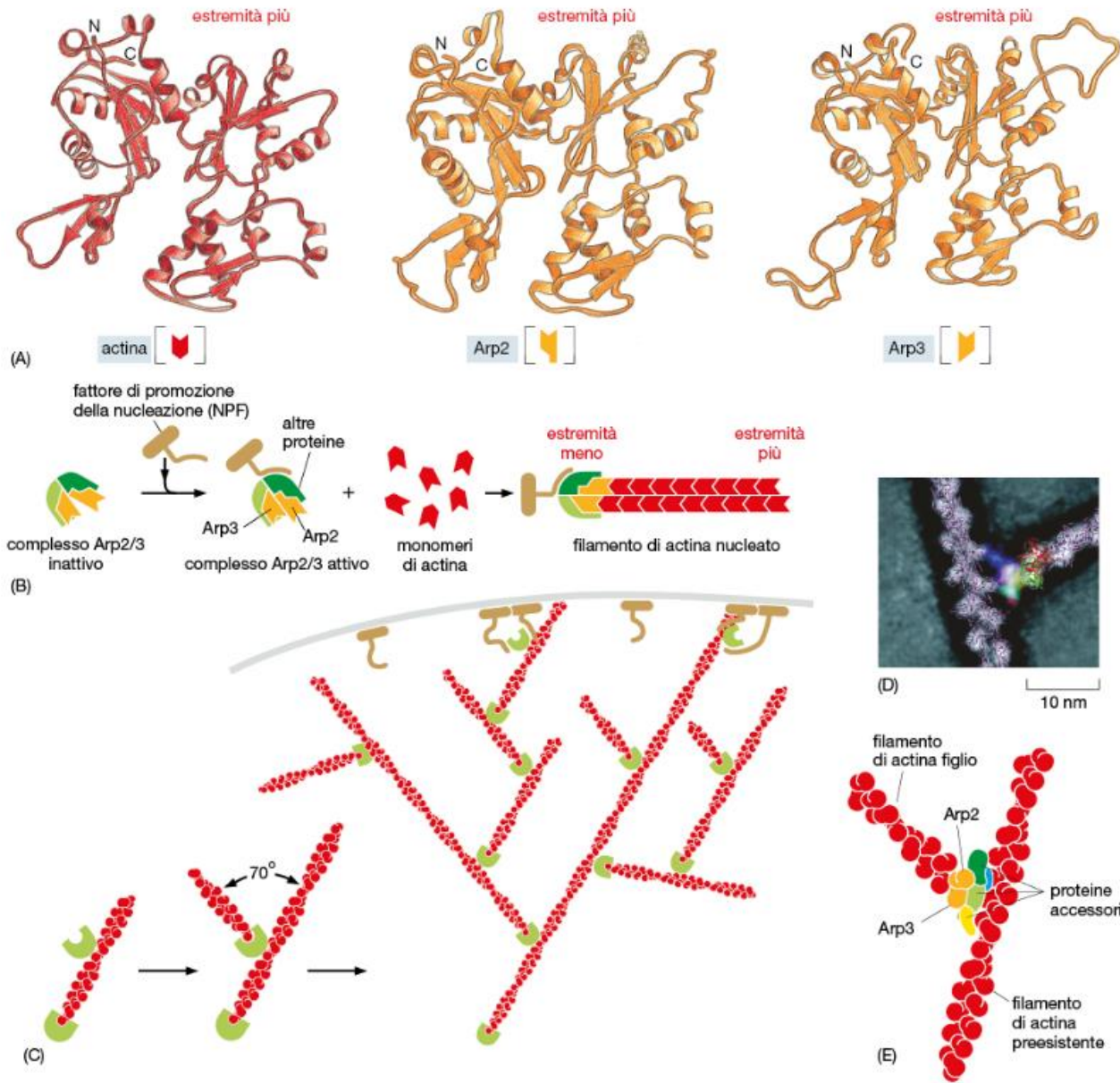
Il **polimero mantiene una lunghezza costante**, anche se c'è un **flusso netto di subunità attraverso il polimero**, noto come **treadmilling**.

Treadmilling allo stato stazionario

- A una particolare [subunità] intermedia, la **crescita a +** è **esattamente bilanciata** dall'**accorciamento a -**.
- **La lunghezza rimane costante**, ma le subunità circolano rapidamente tra stato libero e filamento.
- **Il treadmilling richiede consumo continuo di ATP** → **stato stazionario dissipativo** (non equilibrio).



Proteine Accessorie che Controllano la Nucleazione



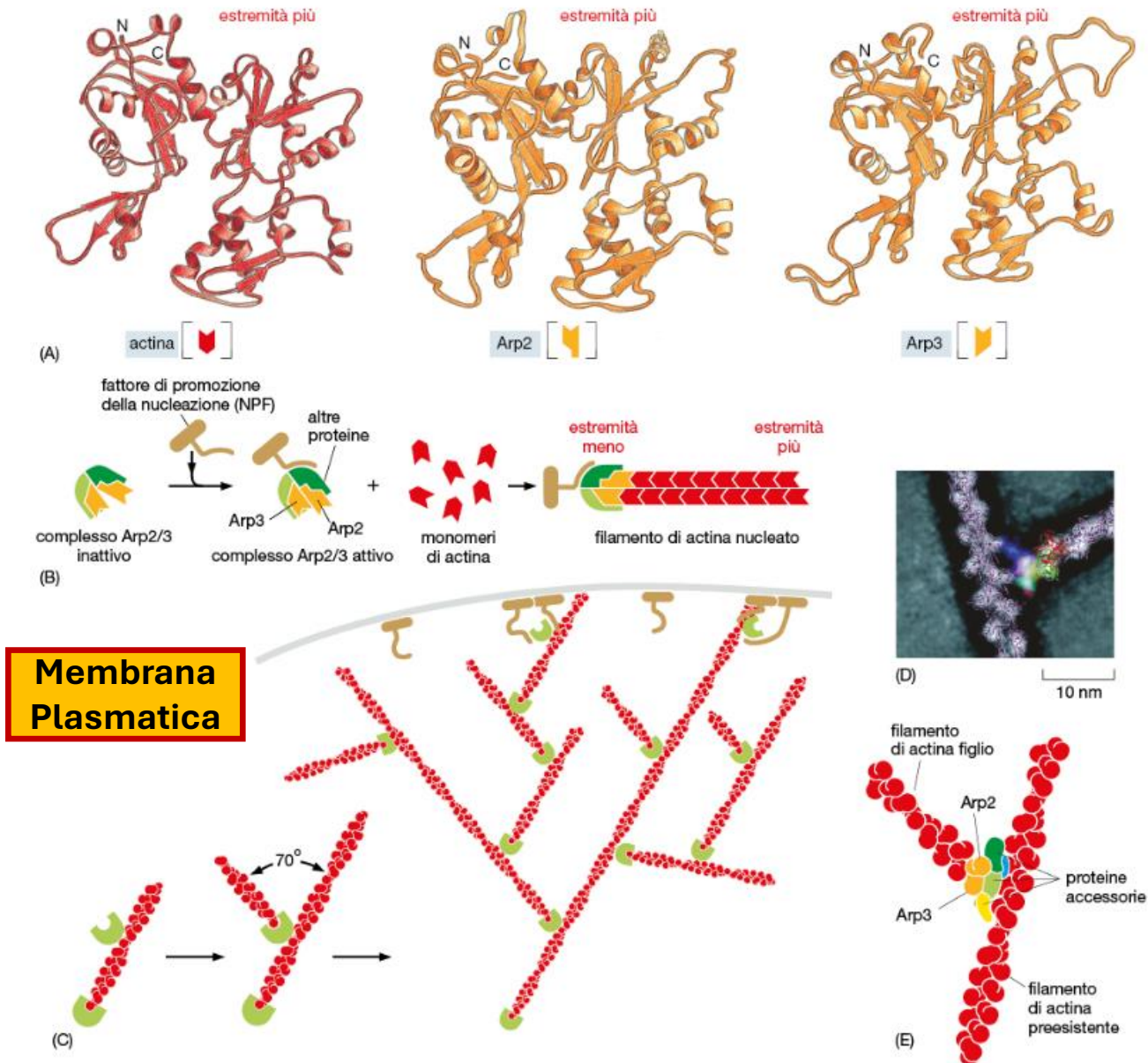
Perché non polimerizza tutta quest'actina?

- Nelle cellule **non muscolari** dei vertebrati: ~**50%** actina in **filamenti** e **50%** **solubile**.
- Eppure **poca actina polimerizza spontaneamente** perché la **polimerizzazione è strettamente regolata** da molte **proteine** che **controllano la nucleazione**.
- La **nucleazione** avviene **quasi sempre vicino alla membrana** plasmatica → controllo **spaziale**.

Due grandi vie di nucleazione

1. **Complesso Arp2/3** → genera **reti ramificate**.
2. **Formine (dimeriche)** → generano **filamenti dritti non ramificati (cavi)**.

Proteine Arp2/3: Ramificazione e Nucleazione in Membrana



Arp2 e Arp3: correlate all'actina (~45% identità).

Richiede un **NPF** (Nucleation-Promoting Factor) per essere attivato.

Meccanismo

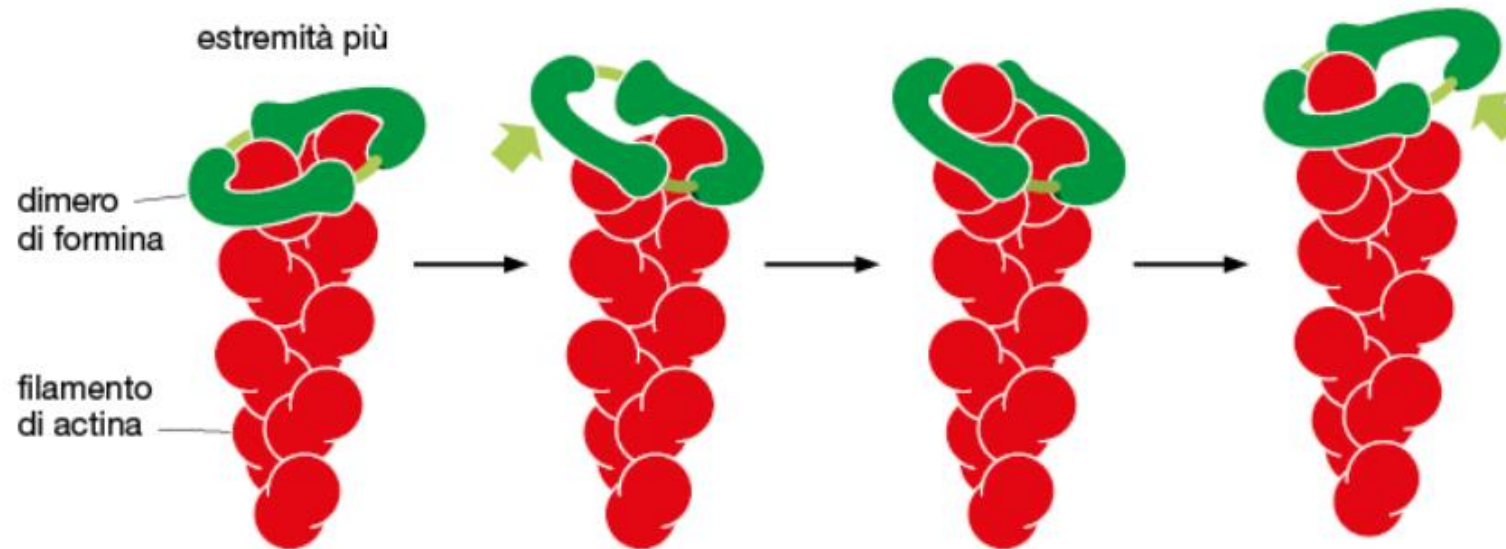
- **Senza NPF:** Arp2/3 sono in **orientamento non permissivo** → niente nucleazione.
- **Con NPF:** Arp2/3 vengono **ri-orientate** in una **configurazione simile a un'estremità "+"**
- Arp2/3 nuclea la crescita **dall'estremità meno (-)** → stimolando un rapido allungamento a +.
- Le subunità di actina possono **assemblarsi** sul complesso, **superando il passo limitante**.
- **Stimolazione più efficiente** quando **lega il lato di un filamento preesistente** → **ramificazione**.

Formine: Cavi Diritti, non Ramificati

- Dimeri di **formina** favoriscono la **nucleazione** catturando **due monomeri actina** → formazione del nucleo.
- Restano **associate all'estremità più** in crescita rapida, **facilitando l'aggiunta di nuove subunità**.
- **Diverso da Arp2/3**: Arp2/3 resta **stabilmente all'estremità meno**, bloccando **aggiunta/perdita** all'estremità meno.

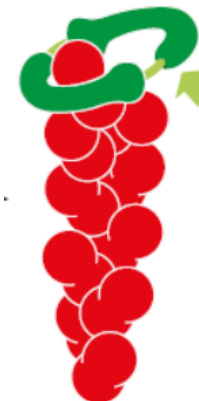
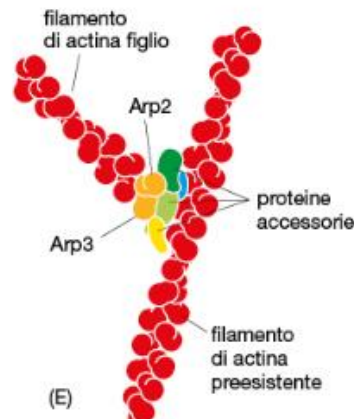
Strutture guidate dalle formine

- Le formine **mediano** l'assemblaggio di **cavi polari** impilati in **fasci paralleli** da cross-linkers, tra cui:
 - **Filopodi**;
 - **Fibre da stress**;
 - **Anello contrattile**.

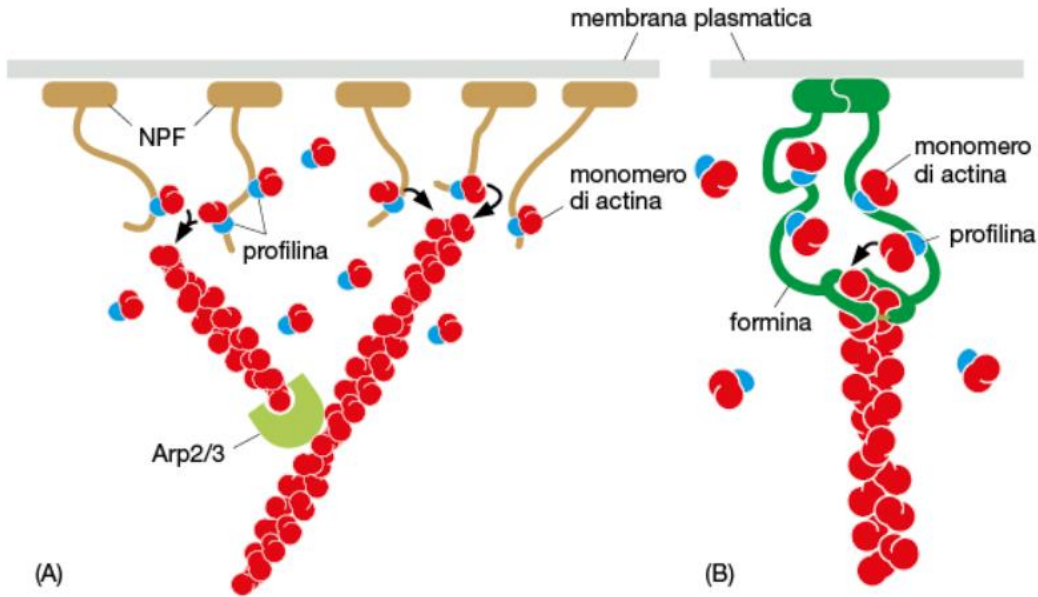


Arp2/3 vs Formine

Caratteristica	Arp2/3	Formine
Tipo di architettura	Rete ramificata (angolo ~70°)	Cavi diritti (non ramificati)
Estremità coinvolta	Nuclea da - ; rimane al punto di ramo	Rimane su + durante l'allungamento
Cofattori	NPF necessari (attivazione su membrana)	Dimeri con siti per monomero ; spesso ancorate alla membrana
Principali funzioni	Protrusioni lamellari, fagocitosi , giunzioni aderenti , traffico vescicolare corto raggio	Filopodi , fibre da stress , anello contrattile
Localizzazione	Corteccia vicino a membrana	Corteccia /sottostante la membrana; cavi interni

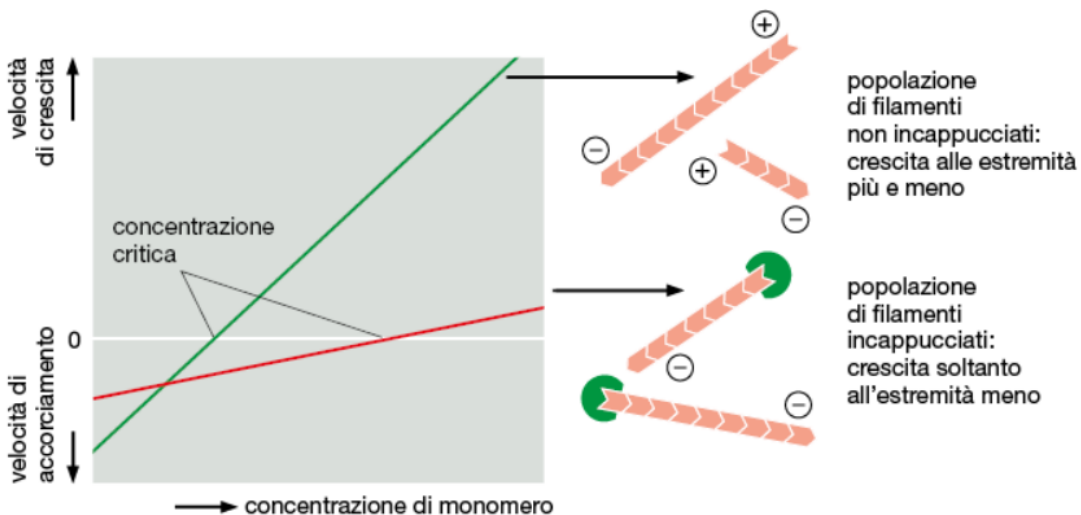


Profilina



Profilina: “caricatore” per l’estremità +

- **Profilina si lega alla estremità più.**
- Quando il complesso **profilina-actina** si lega alla +, un cambio conformazionale **riduce l’affinità** per la profilina → **profilina si stacca** → il **filamento si allunga di 1 subunità**.



Perché la profilina accelera tanto

1. **Mantiene** ampia riserva di **monomeri “orientati”** per l’inserzione alla +.
2. **Interagisce** con molte **formine** e **NPF** (attivatori Arp2/3) che hanno **siti per profilina** → **reclutamento diretto** dei monomeri nei **siti di allungamento** → crescita **rapida**.

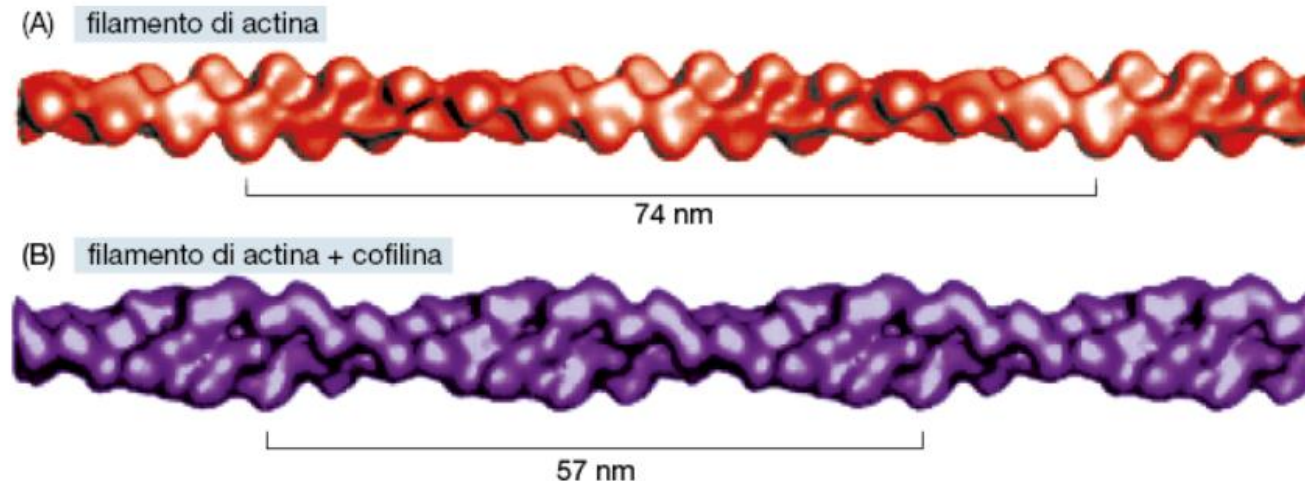
Cofilina

Cofilina (ADF): indebolisce e frammenta

- Cofilina/ADF si lega lungo il filamento e lo avvolge più strettamente → **stress meccanico** che **indebolisce** i contatti subunità–subunità.
- Aumenta la **propensione al taglio** per **movimenti termici** → genera **estremità** soggette a **rapido disassemblaggio**.
- **Preferenza** per filamenti **ADP-actina** (più “vecchi”).
- **Filamenti nuovi** (ricchi di **ATP**) sono **resistenti** alla cofilina.

Turnover polarizzato e migrazione

- Cofilina smantella selettivamente i filamenti più vecchi → essenziale per:
 - **crescita polarizzata** della **rete di actina**;
 - **motilità** intracellulare di **patogeni**;
 - **migrazione** cellulare **direzionale**.

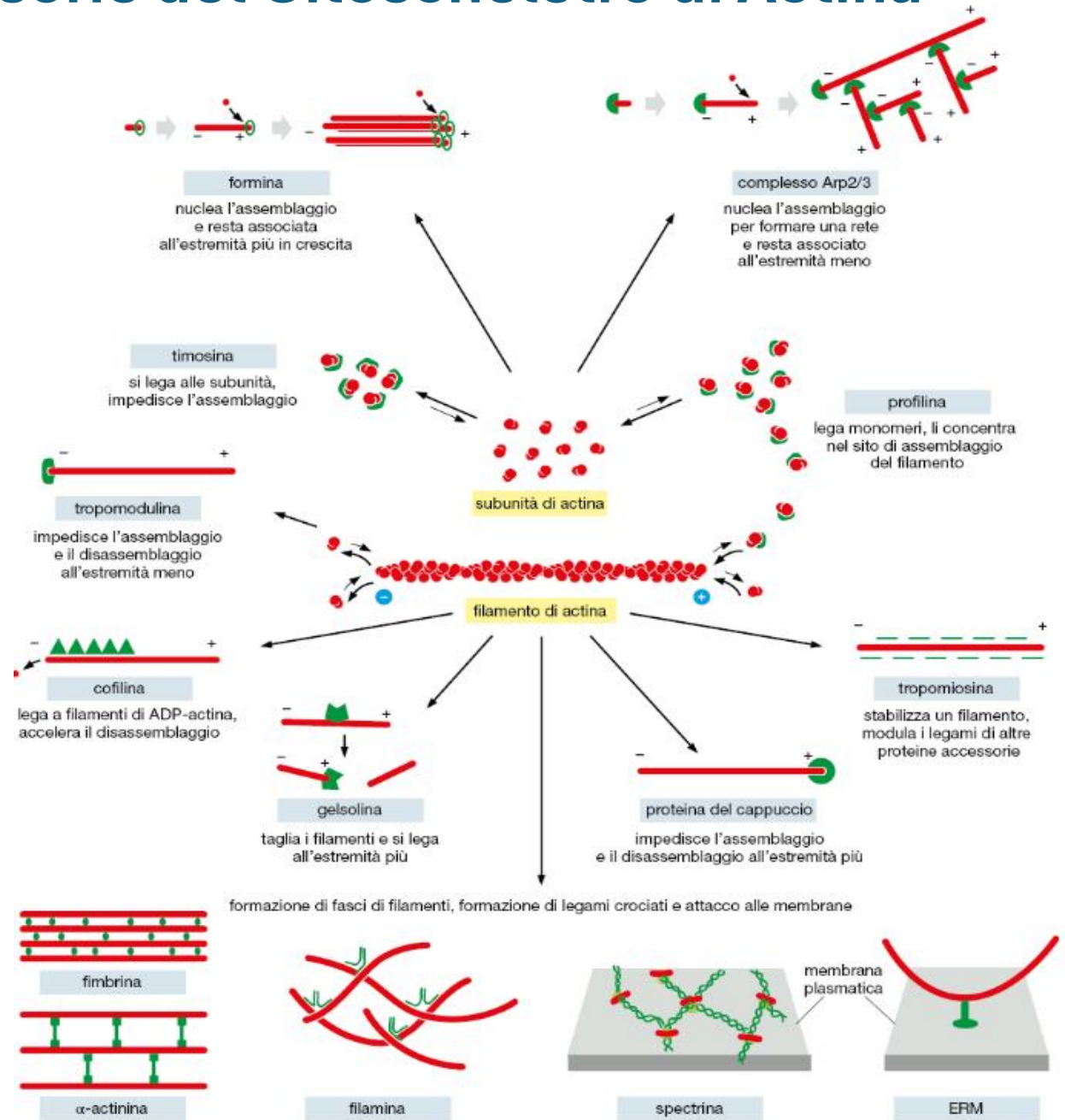


Principali Proteine Accessorie del Citoscheletro di Actina

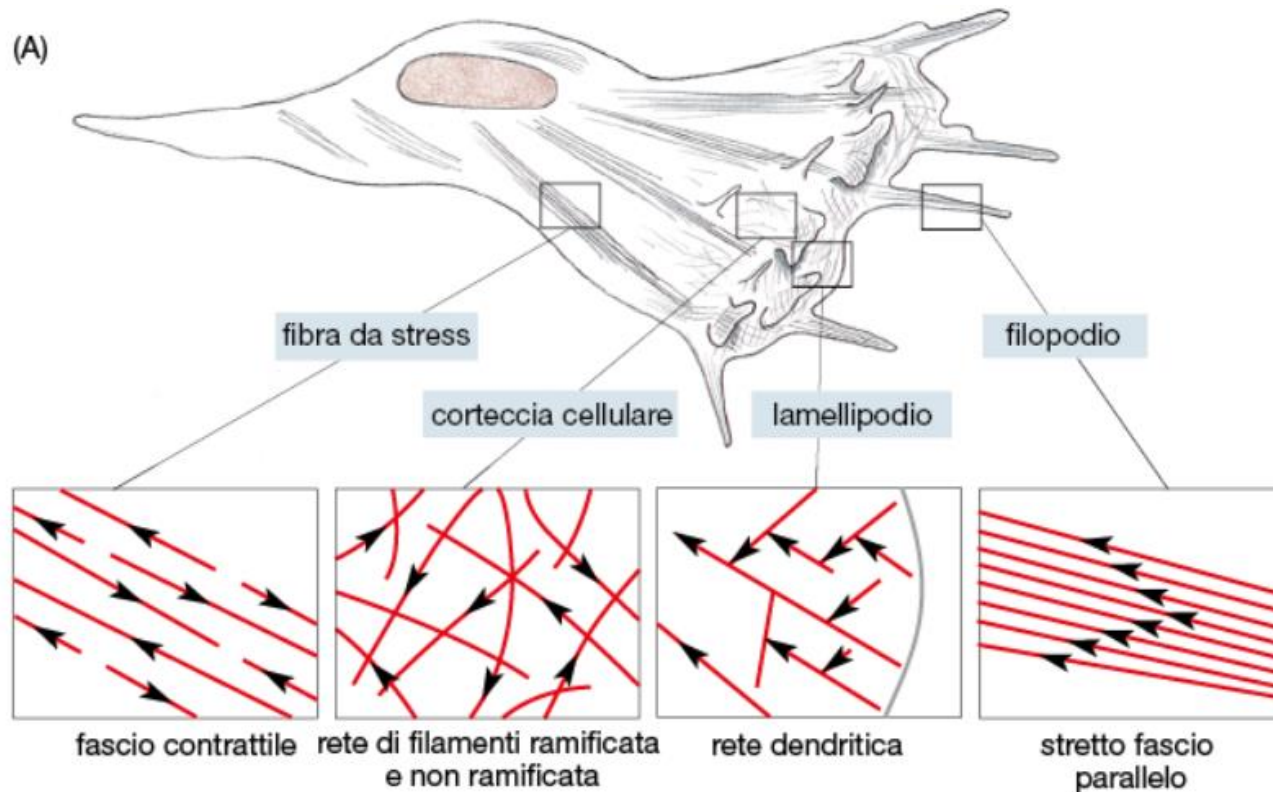
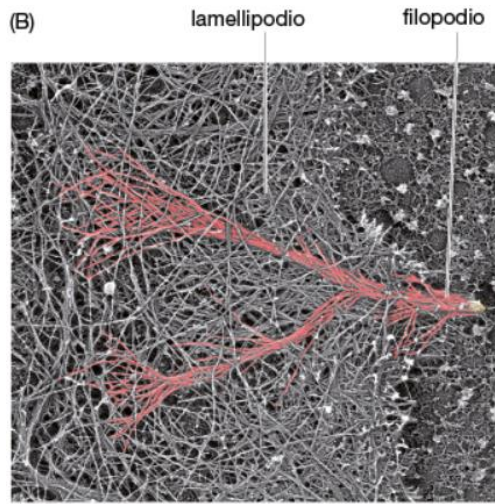
Alcune delle principali proteine accessorie del citoscheletro di actina.

A eccezione delle proteine motrici miosina, è mostrato un esempio dei tipi principali.

Tuttavia, la maggior parte delle cellule contiene più di un centinaio di proteine diverse che legano l'actina, ed è probabile che vi siano tipi importanti di proteine associate all'actina che non sono ancora stati individuati.



Filopodi vs Lamellipodi



Filopodi:

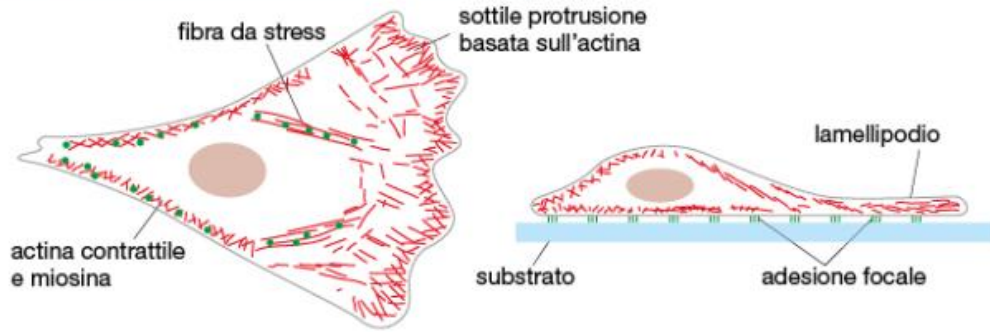
- Protrusioni **sottili e appuntite** (quasi 1D),
- **Fasci lunghi** di actina **parallela** (simili ai microvilli, ma **più lunghi/sottili** e **più dinamici**),
- **Escludono organelli** a membrana,
- **Esplorano l'ambiente**, guidano il **cone di crescita** dei neuroni.

Lamellipodi:

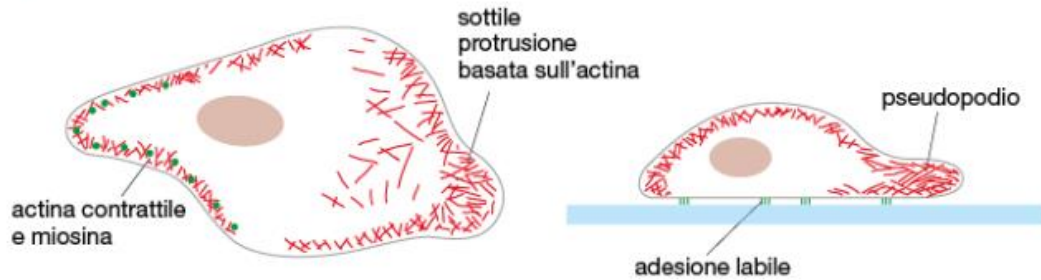
- “**Fogli**” **2D**; maglia **dendritica** di actina **interconnessa** (piano parallelo al substrato),
- Spingono il **bordo anteriore** e guidano la **migrazione**.

Modalità Mesenchimale

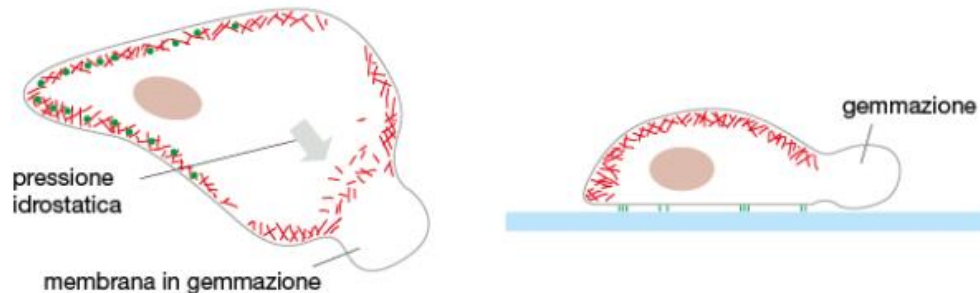
(A) MIGRAZIONE DI UNA CELLULA MESENCHIMALE



(B) MIGRAZIONE DI UNA CELLULA AMEBOIDE



(C) MIGRAZIONE DI UNA CELLULA IN GEMMAZIONE



VISTA DALL'ALTO

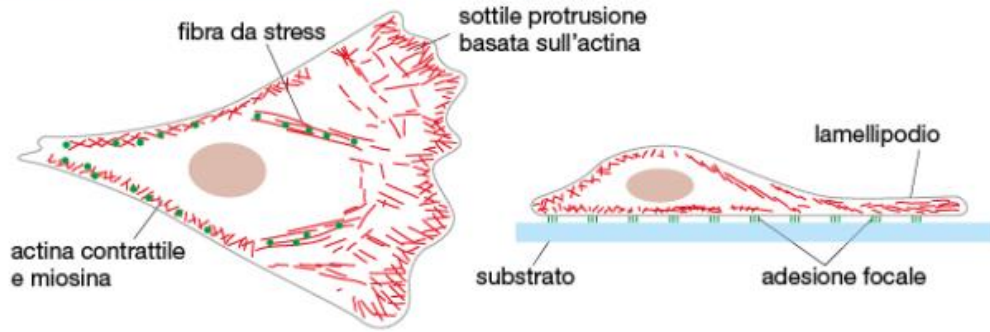
VISTA LATERALE

Modalità mesenchimale

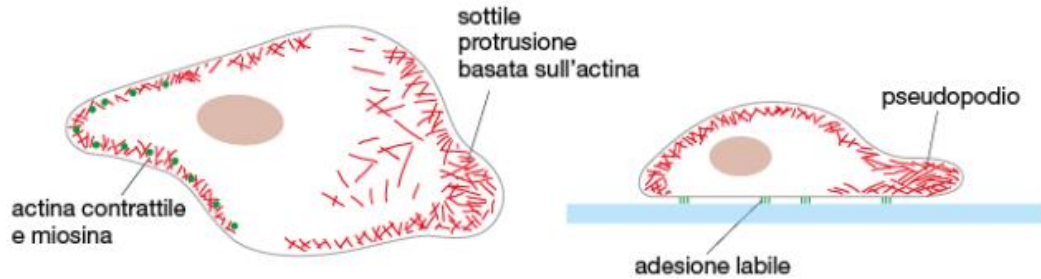
- **Arp2/3** nuclea **lamellipodio** al fronte → **protrusione**.
- **Cofilina** (preferenza ADP) **smonta** i filamenti **dietro** il fronte → flusso **assemblaggio davanti / disassemblaggio dietro** (tipo **treadmilling** di rete).
- **Richiede forte adesione** al substrato (integrine) → **giunzioni focali** collegate a **fibre da stress**.
- **Contrazione** di actina + **miosina II** nella **coda** e **turnover** delle adesioni spingono il **corpo** in avanti.
- **Lenta**: $< 1 \mu\text{m}/\text{min}$.

Modalità Ameboide

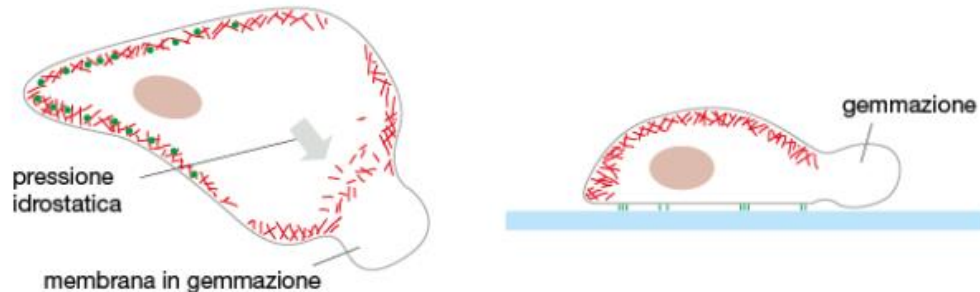
(A) MIGRAZIONE DI UNA CELLULA MESENCHIMALE



(B) MIGRAZIONE DI UNA CELLULA AMEBOIDE



(C) MIGRAZIONE DI UNA CELLULA IN GEMMAZIONE



VISTA DALL'ALTO

VISTA LATERALE

Modalità ameboide

- **Protrusioni esplosive** (pseudopodi 3D) via **attivazione locale di Arp2/3**.
- **Adesione** al substrato **ridotta** (non dipende molto da integrine), ma c'è comunque **trazione**.
- Cellule più **arrotondate**, velocità **molto maggiore** (fino a **centinaia di volte** più rapida della mesenchimale).
- Tipica di **leucociti** (es. **neutrofili**).

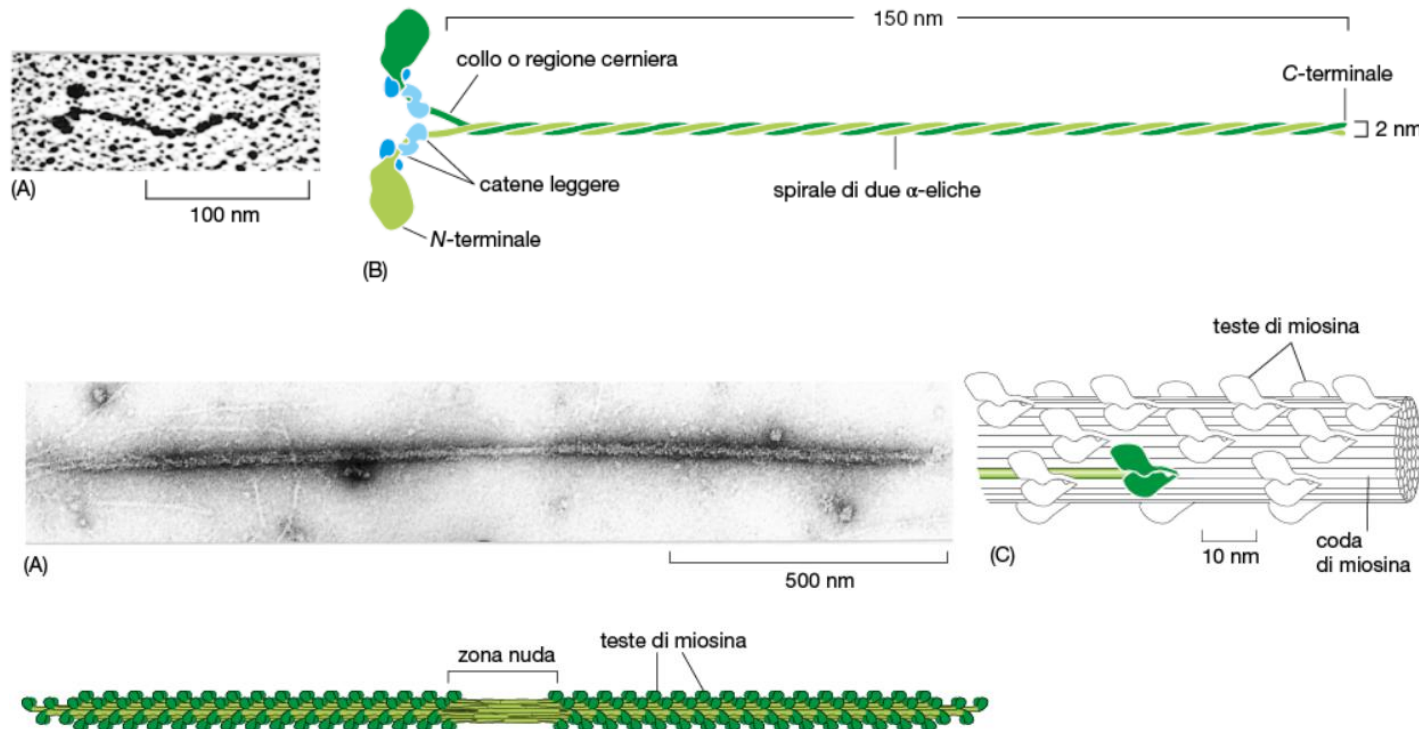
Blebbing

- Protrusione per **distacco locale** della **membrana** dalla **corteccia** → **pressione idrostatica spinge fuori un bleb**.
- Pressione generata da **contrazione actina-miosina** nella **parte posteriore**.
- Dopo l'estensione, si **ricostruisce** una **nuova corteccia di actina** sotto la membrana del bleb.

Actina e Miosina

Actomiosina: il modulo contrattile universale

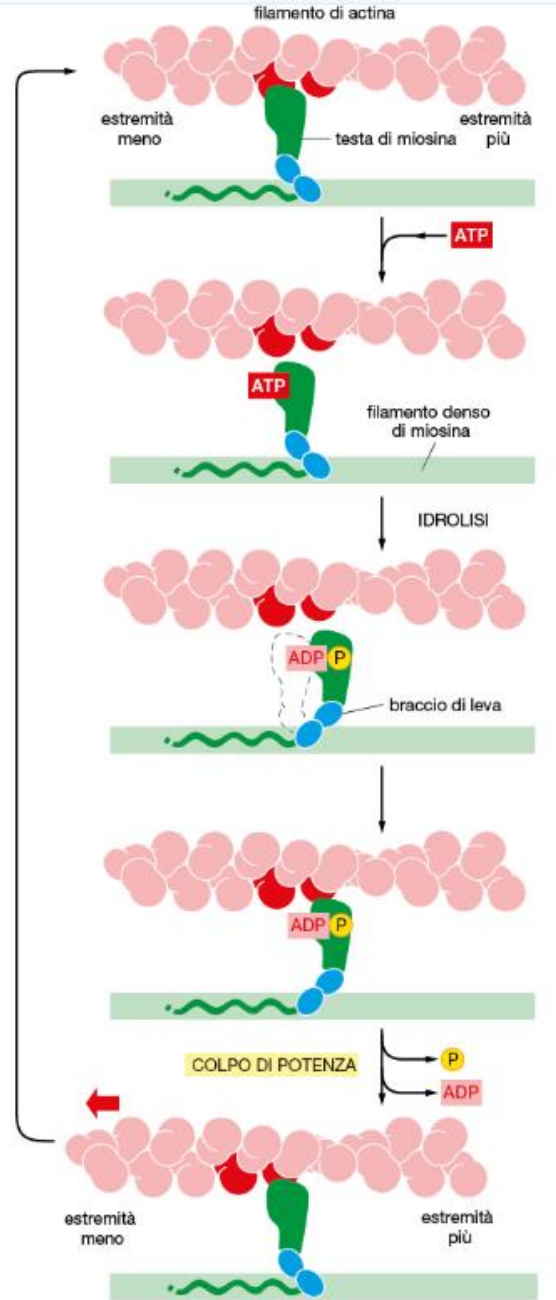
- Il citoscheletro di **actina** forma **strutture contrattili** grazie alla proteina motrice **miosina**.
- Il **complesso actina-miosina**:
 - genera **scorrimento dei filamenti** → **contrazione**;
 - è essenziale in **tutte** le cellule eucariote (es. **migrazione**);
 - guida la **contrazione muscolare**.



Superfamiglia delle miosine

- **Miosina II**: prima **proteina motrice** identificata (muscolo scheletrico).
- Struttura: **2 catene pesanti** → **teste N-term** (motore) + **coda coiled-coil** (dimerizzazione);
- **4 catene leggere** (2 tipi, una copia ciascuno per testa) **legate vicino alla testa**;
- **La coda si associa coda-coda con altre miosine** → **filamenti spessi bipolari**.

Scorrimento Actina-Miosina



1 ATTACCATA All'inizio del ciclo mostrato in questa figura, una testa di miosina priva di un nucleotide legato è saldamente bloccata su un filamento di actina in una configurazione di *rigor* (così chiamata perché è responsabile del *rigor mortis*, la rigidità cadaverica). In un muscolo in contrazione attiva questo stato è di breve durata, essendo rapidamente interrotto dal legame di una molecola di ATP.

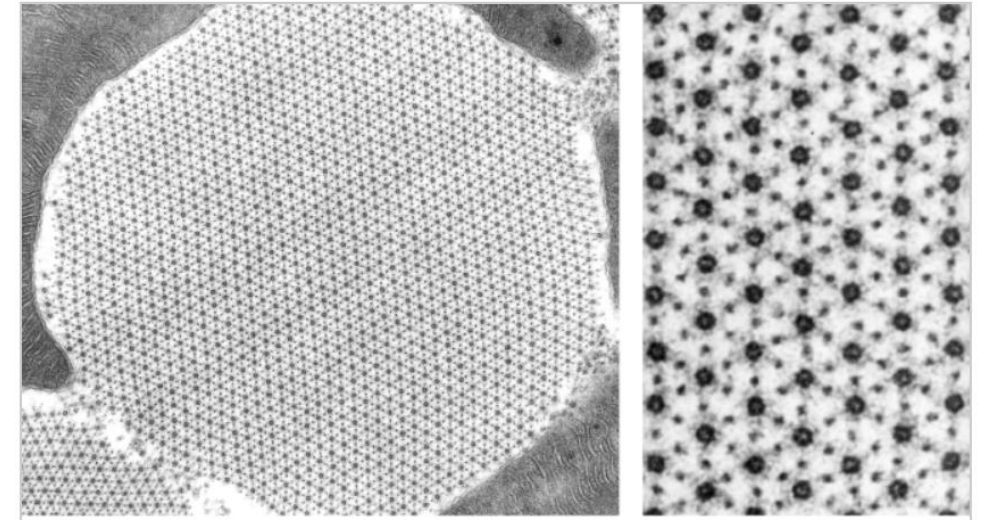
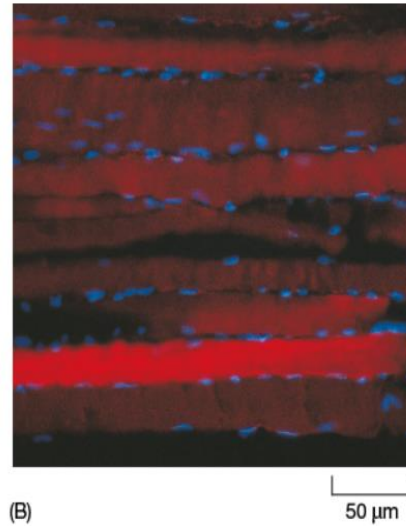
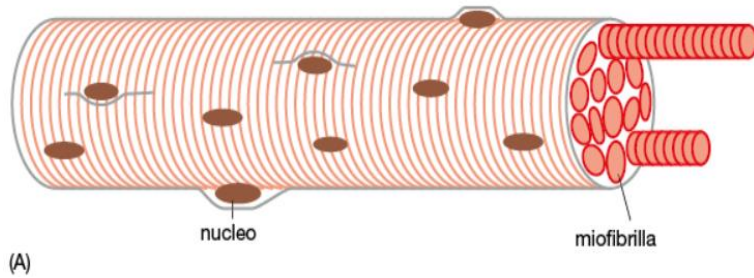
2 RILASCIATA Una molecola di ATP si lega alla grande fessura sul "retro" della testa (cioè sul lato più lontano dal filamento di actina) e immediatamente provoca un lieve cambiamento conformazionale del sito di legame all'actina, riducendo l'affinità della testa per l'actina. (Lo spazio disegnato qui tra la testa e l'actina enfatizza questa modifica, anche se nella realtà la testa probabilmente rimane molto vicina all'actina.)

3 CARICATA Il legame dell'ATP scatena un cambiamento conformazionale nella fessura che porta a una rotazione nel dominio del convertitore, causando l'oscillazione del braccio di leva verso l'esterno e uno spostamento della testa lungo il filamento di circa 5 nm. Si verifica l'idrolisi dell'ATP, ma l'ADP e il fosfato inorganico (P) rimangono saldamente legati alla proteina.

4 RI-LEGAME E COLPO DI POTENZA La testa di miosina si lega debolmente a un nuovo sito sul filamento di actina, causando il rilascio del fosfato inorganico prodotto dall'idrolisi dell'ATP, contemporaneamente allo stretto legame della testa all'actina. Questo rilascio determina il colpo di potenza, il cambiamento nella forma che genera la forza, durante il quale la testa recupera la sua conformazione originaria. Nel corso del colpo di potenza, la testa perde il suo ADP legato, tornando così all'inizio di un nuovo ciclo.

5 GENERAZIONE DI FORZA Alla fine del ciclo, la testa di miosina è di nuovo saldamente bloccata al filamento di actina in una configurazione di *rigor*. Si noti che la testa si è spostata in una nuova posizione sul filamento di actina.

Sarcomero



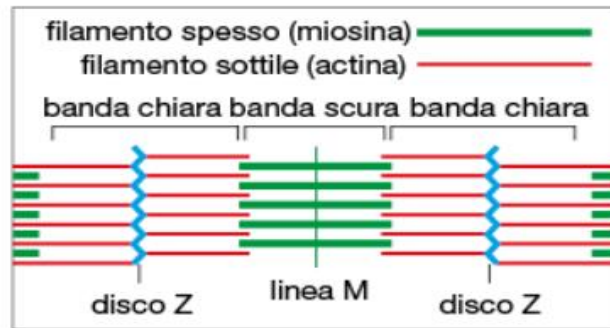
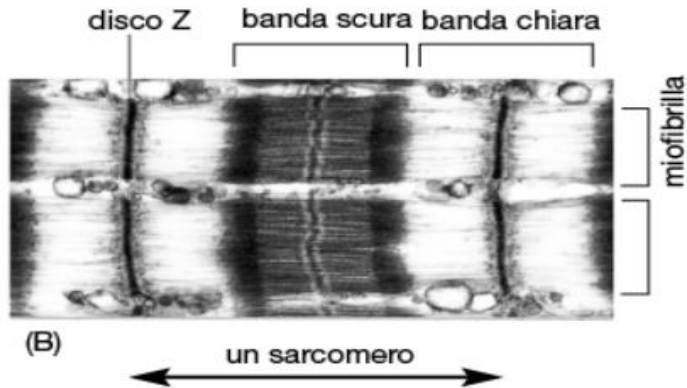
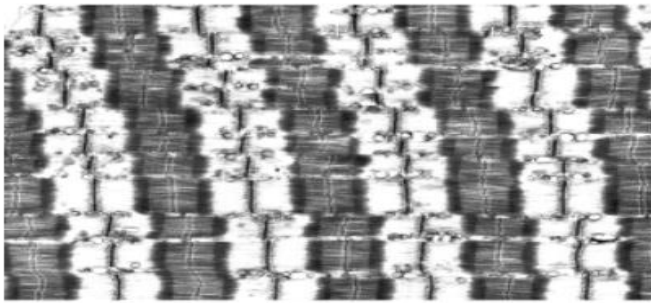
Contrazione muscolare = scorrimento attivo

- **Tutti i muscoli** (scheletrico, cardiaco, liscio) **contraggono grazie a actina + miosina II con ATP.**
- **Muscolo scheletrico: cellule giganti** (fibre) da **fusione** di molte cellule $\rightarrow$ **multinucleate** con nuclei subsarcolemmali.
- **Il citoplasma è pieno di miofibrille** (1–2 μm di diametro) lunghe quanto la cellula.

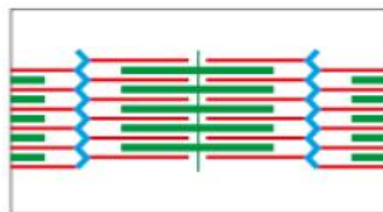
Sarcomero: l'unità ripetitiva

- **Le miofibrille sono catene di sarcomeri** $\rightarrow$ aspetto striato.
- **Ogni sarcomero = filamenti sottili** (actina + proteine) e **filamenti spessi** (miosina II) **parzialmente sovrapposti.**
- I filamenti sottili sono **ancorati con la loro estremità + al disco Z** (uno per lato); le – puntano verso il **centro.**

Sarcomero



(C)



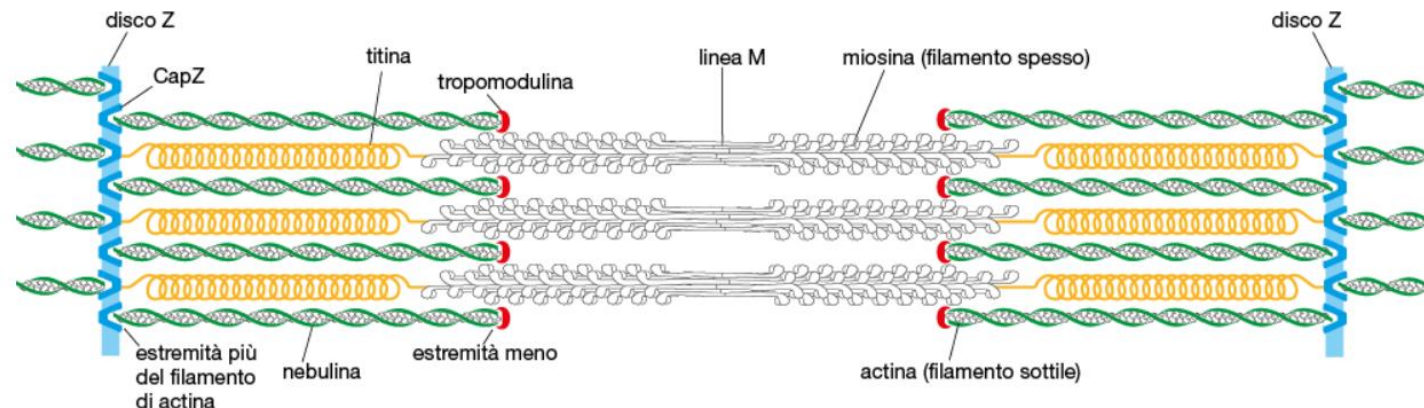
(D)

Il **sarcòmero** (gr. σάρξ sarks 'carne, corpo', μέρος meros 'parte') è l'**unità contrattile del tessuto muscolare striato, compresa tra due linee Z consecutive.**

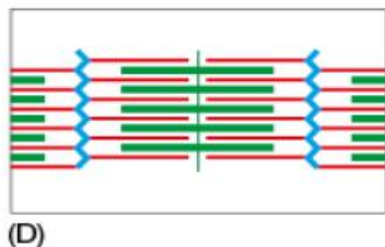
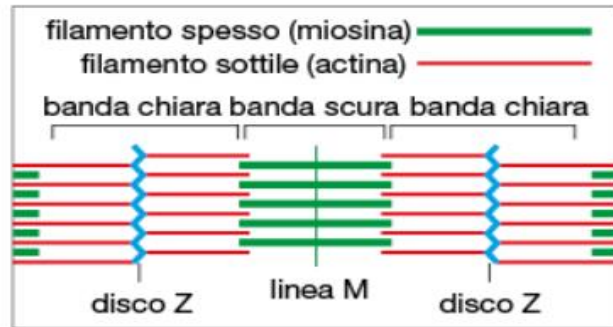
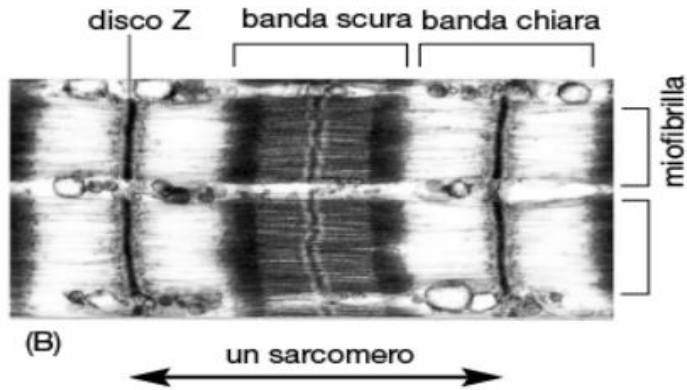
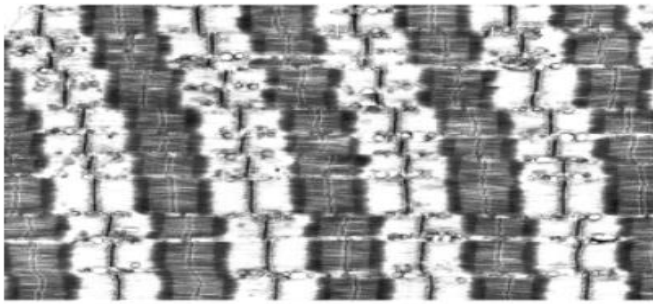
Le fibre muscolari contengono numerose miofibrille tubolari composte da sezioni ripetute di **sarcomeri, che appaiono al microscopio ottico come un'alternanza tra bande scure e chiare.**

I sarcomeri sono **composti da lunghe proteine fibrose che scivolano una sull'altra durante la contrazione muscolare.**

Due delle proteine più importanti presenti nel sarcomero sono la miosina, che forma il filamento spesso e l'actina, che forma il filamento sottile



Proteine accessorie in un sarcomero



Ciascuna **molecola gigante di titina** si estende dal **disco Z** alla **linea M**, per una distanza di oltre 1 μm .

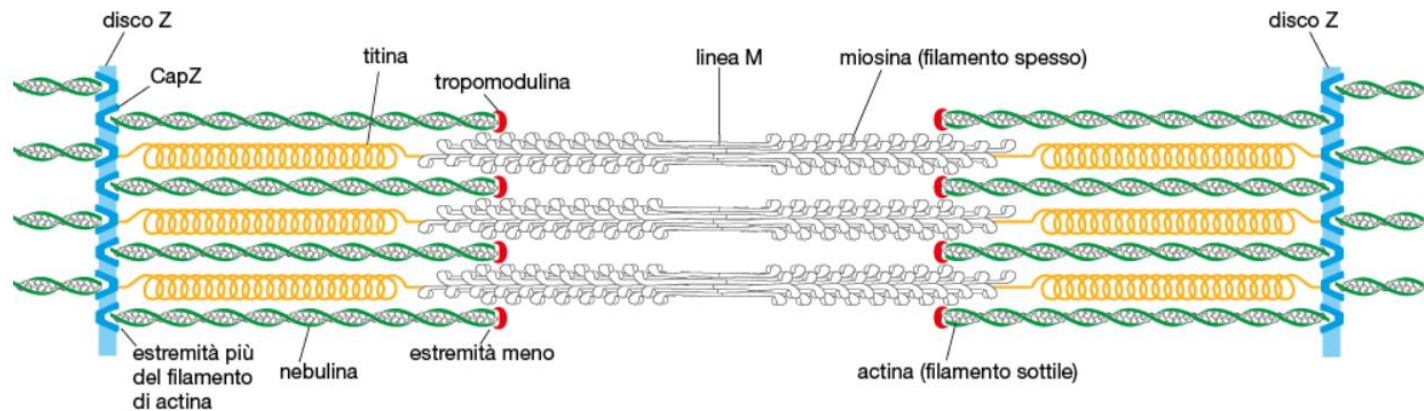
Parte di ciascuna molecola di **titina** è **strettamente associata a un filamento spesso di miosina**

Ciascuna molecola di **nebulina** ha esattamente **la stessa lunghezza di un filamento sottile**.

I **filamenti di actina** sono rivestiti anche di **tropomiosina**, legati a intermittenza alla **troponina** e incappucciati a entrambe le estremità.

La **tropomodulina** incappuccia l'**estremità meno** dei filamenti di actina;

CapZ ancora l'**estremità più** al **disco Z**, che contiene anche α -actinina (non mostrato).



La Distrofina

La distrofina è una **proteina di grandi dimensioni** fondamentale per la **stabilità delle membrane** delle fibre muscolari, **connettendo il citoscheletro** interno **alla matrice extracellulare**.

La sua **assenza o malfunzionamento**, causato da mutazioni nel gene che la codifica (situato sul cromosoma X), porta alle distrofie muscolari. Le forme più comuni sono la **Distrofia di Duchenne (DMD)**, dove la proteina è del tutto assente, e la **Distrofia di Becker (BMD)**, dove è presente ma alterata. Queste patologie causano **debolezza muscolare progressiva, colpendo cuore e muscoli respiratori**, e incidendo sulla qualità di vita.

Stabilità della membrana:

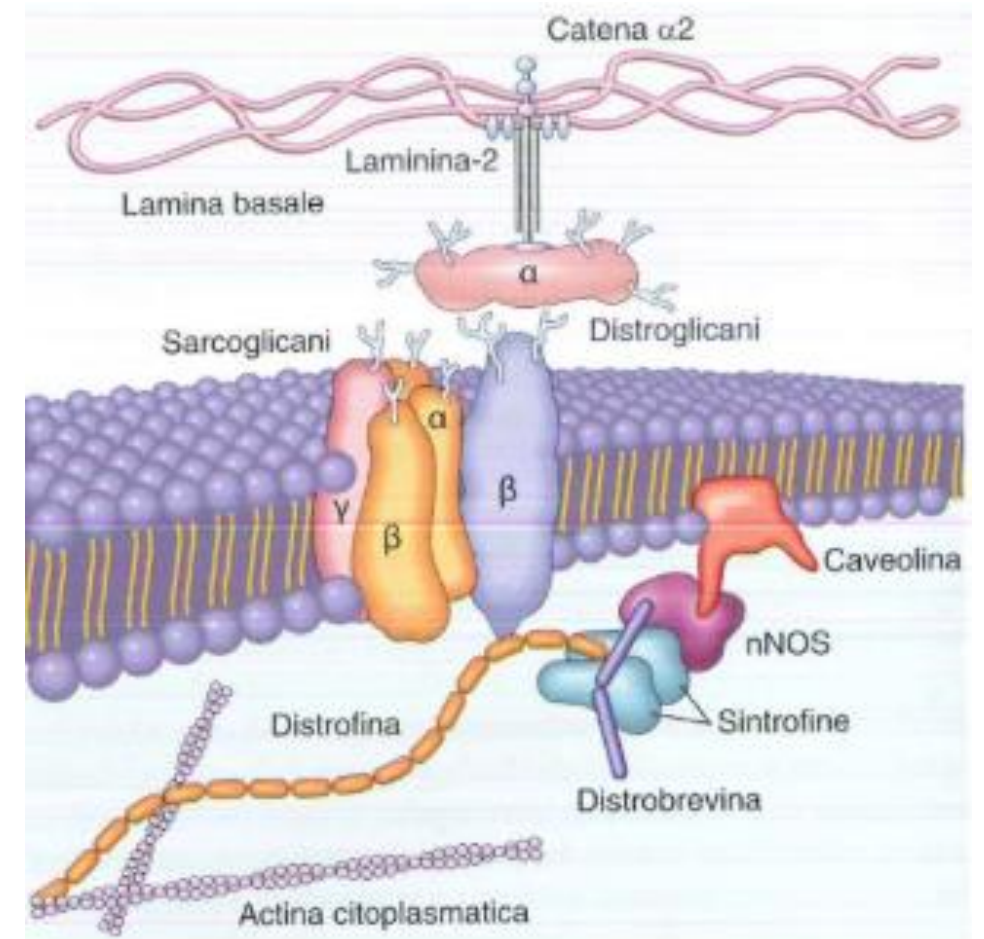
La distrofina **forma una impalcatura proteica, insieme ad altre proteine associate**, che **protegge la membrana della fibra muscolare (il sarcolemma) dalle sollecitazioni meccaniche** dovute al movimento.

Connessione strutturale:

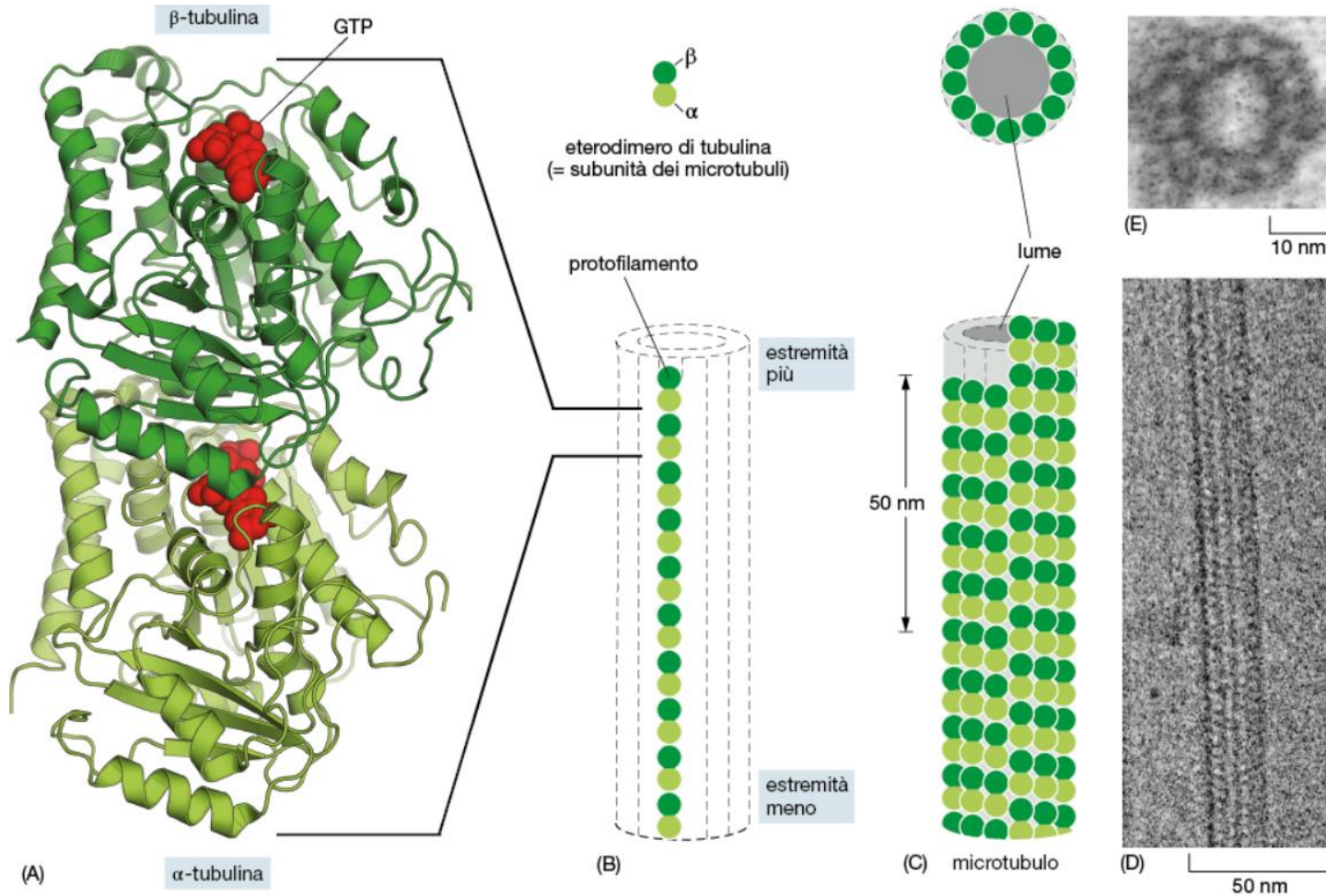
Collega il citoscheletro della fibra muscolare alla matrice extracellulare, garantendo la corretta integrità strutturale.

Regolazione del calcio:

Svolge un ruolo nella regolazione dello ione calcio all'interno della cellula.



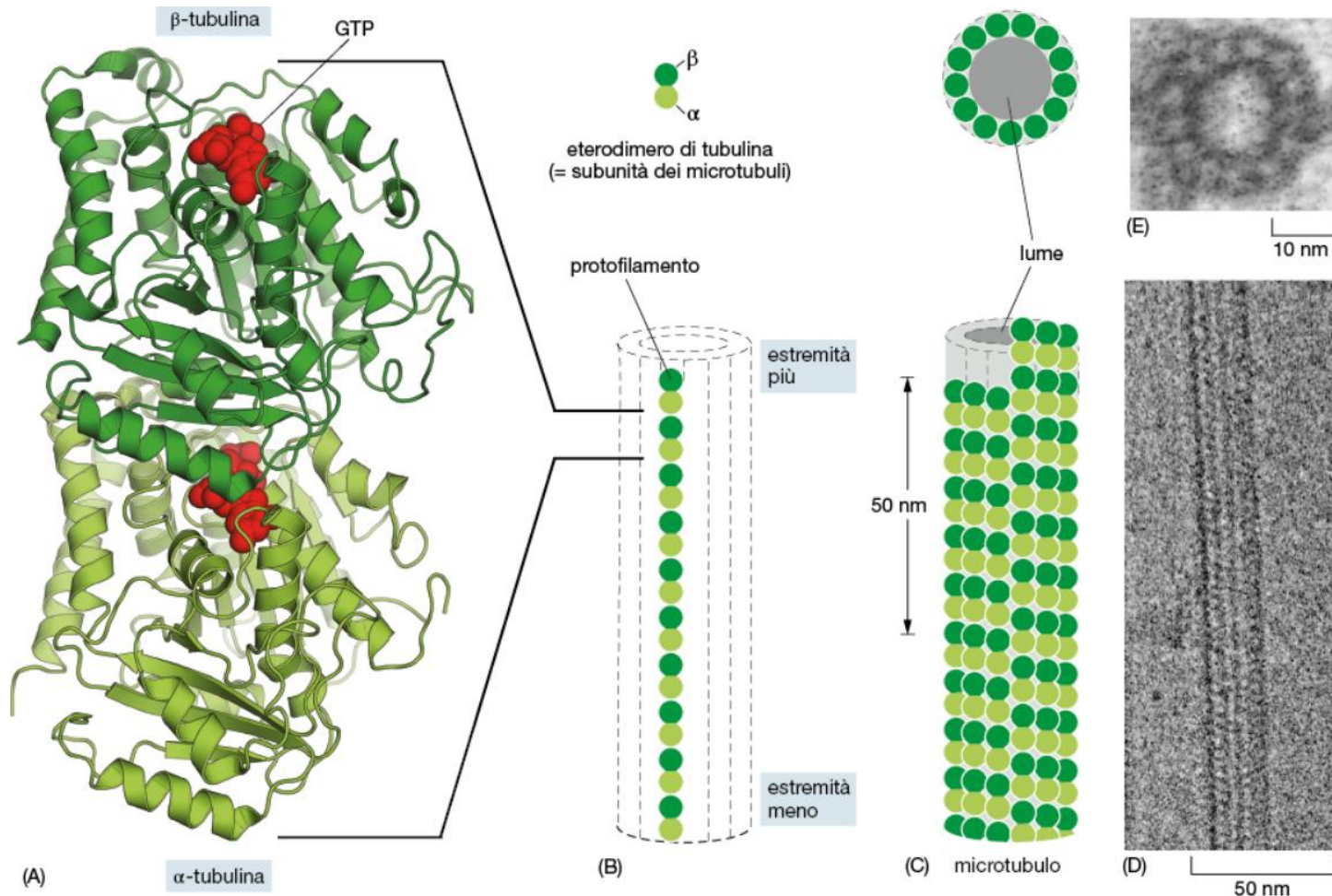
I Microtubuli



- Più **complessi strutturalmente** dei filamenti di actina, ma **altamente dinamici**.
- **Ruoli analoghi e cruciali:** organizzazione intracellulare, trasporto, fuso mitotico, ciglia/flagelli.

- **La subunità: eterodimero α/β -tubulina**
- Ciascun monomero: **~445–450 aa**; uniti da **interazioni non covalenti**.
- **Siti GTP su entrambi i monomeri:**
 - **α -tubulina-GTP: intrappolato** all'interfaccia del dimero $\rightarrow$ **non idrolizzato/scambiato**.
 - **β -tubulina: $GTP \leftrightarrow GDP$** (scambio/idrolisi) $\rightarrow$ **implicazioni dinamiche**.

I Microtubuli



13 protofilamenti → tubo cavo

- Microtubulo = **cilindro cavo** con **13 protofilamenti paralleli**.
- Ogni protofilamento: **pile testa-coda** di **eterodimeri α/β** ; poi **ripiegati** a formare il tubo.

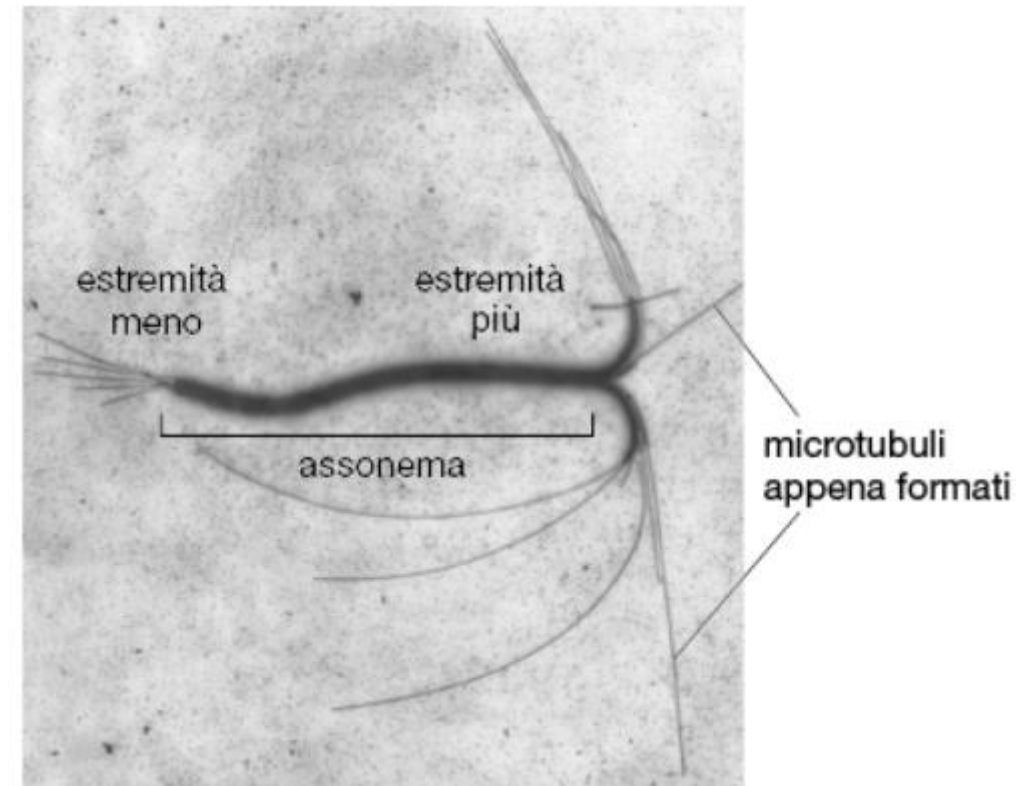
- **Longitudinale:** **Cima** di **β -tubulina** ↔ **Fondo** di **α -tubulina**
- **Laterale:** tra protofilamenti adiacenti i **contatti α - α** e **β - β** predominanti.
- **Leggero sfalsamento laterale**

- **Molteplici contatti** rendono i microtubuli **rigidi** e resistenti alla flessione.
- **Lunghezza di persistenza:** **>10×** quella dei filamenti di **actina** → gli **elementi più rigidi/diritti** nella maggior parte delle cellule animali.

Polarità strutturale e dinamica

Polarità strutturale e dinamica

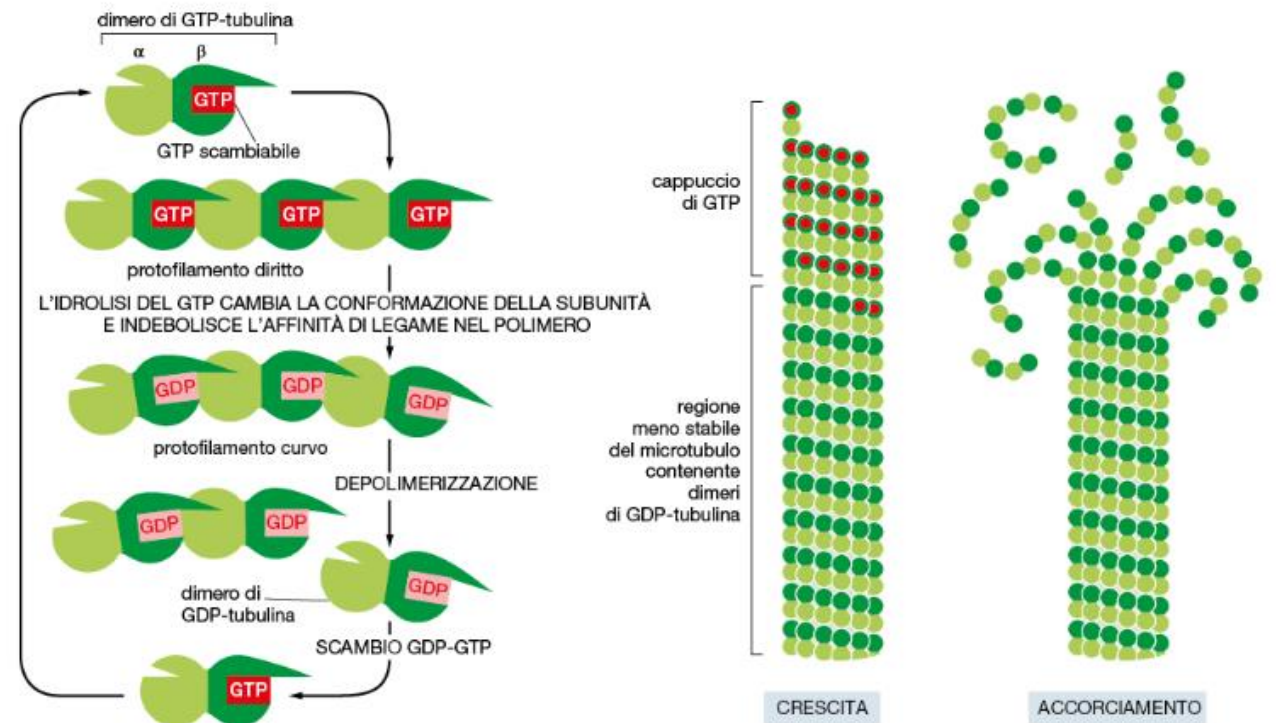
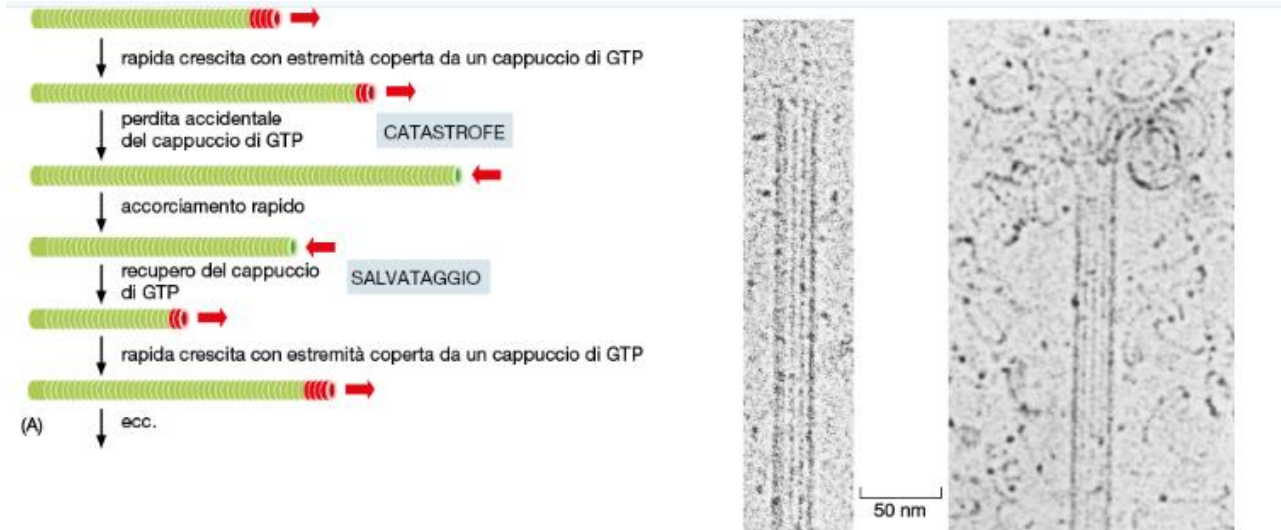
- **Tutte le subunità** di ciascun protofilamento **puntano nella stessa direzione**; i 13 protofilamenti sono **allineati in parallelo**.
- **Estremità meno**: espone **α -tubulina**;
- **Estremità più**: espone **β -tubulina**.
- **Come per l'actina**, questo **conferisce polarità**:
- **Estremità più** si **allunga/accorcia** più **rapidamente** dell'estremità meno



Instabilità Dinamica

Cos'è l'instabilità dinamica

- Le dinamiche dei microtubuli dipendono da **GTP** (come l'actina da **ATP**).
- L'idrolisi del GTP** avviene **solo** sulla **β -tubulina**
- Questa è lenta** nel dimeri libero; **accelerata** nel dimeri che **si assembla al microtubulo**.
- Esistono **due stati** del polimero: **forma T (GTP)** e **forma D (GDP)**.
- In condizioni fisiologiche: **T tende a polimerizzare, D a depolimerizzare**.



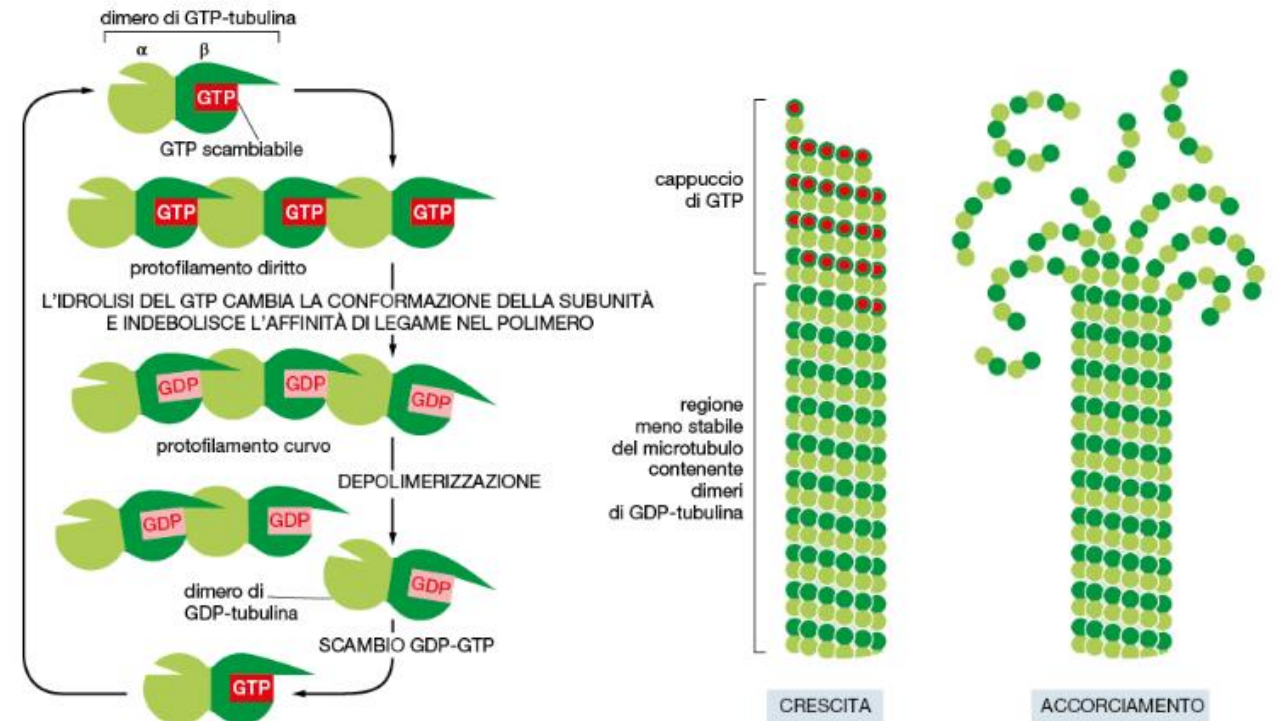
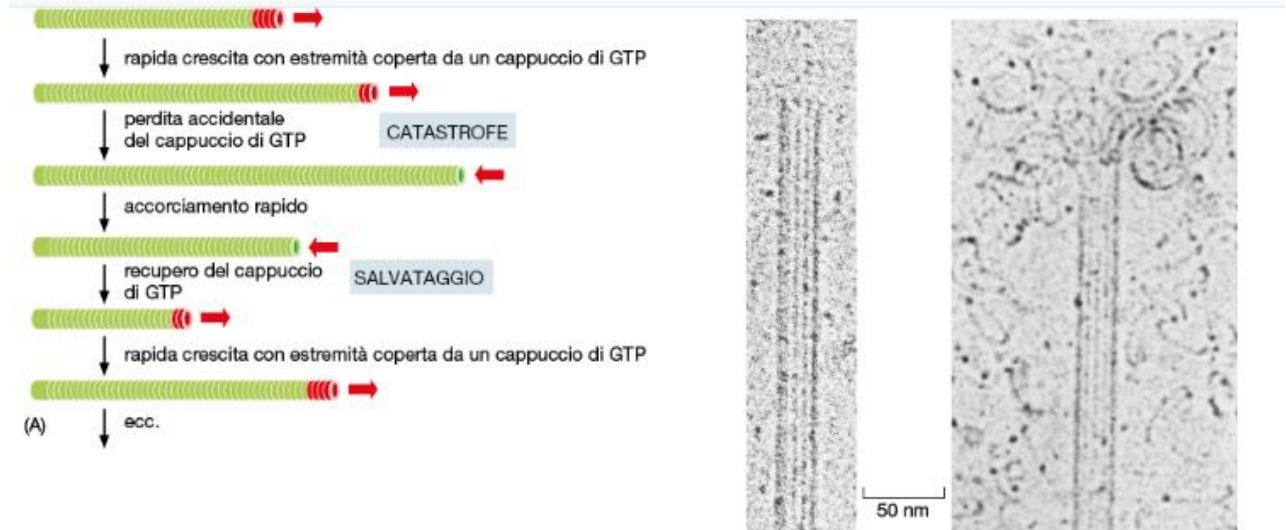
Instabilità Dinamica

Il cappuccio di GTP (GTP-cap)

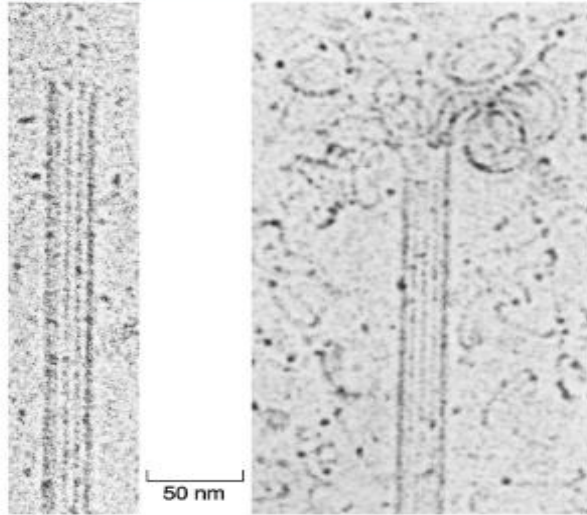
- Stato dell'estremità = **competizione tra aggiunta di GTP-tubulina e idrolisi del GTP terminale**.
- **Crescita rapida** → nuova subunità arriva prima dell'idrolisi → estremità resta in **T** → **GTP-cap**.
- Se l'idrolisi "raggiunge" la crescita → l'estremità diventa **D** → predisposizione all'**accorciamento**.

Transizioni:

- **Catastrofe** = Rapido accorciamento che non compensa la formazione del Cap;
- **Salvataggio** = Accorciamento rapido che consente la riformazione del Cap.

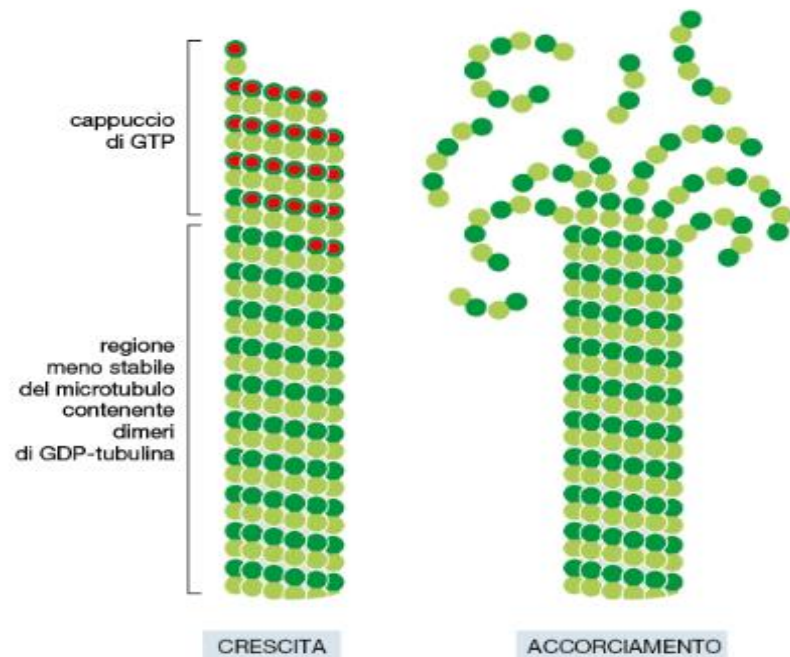


Instabilità Dinamica



Base strutturale (modello classico)

- **Polimerizzazione avviene prima dell'idrolisi**: subunità **T** favoriscono **protofilamenti rettilinei** che si **impacchettano** bene lateralmente (lattice regolare).
- **Polimerizzazione avviene dopo l'idrolisi**: subunità **D** tendono a una **conformazione curva** (meno compatibile con la parete cilindrica) → **instabilità**.



Osservazioni e conseguenze

- **EM in vitro/in vivo**: estremità di microtubuli **in crescita** con **protofilamenti curvi**; il **raddrizzamento** può avvenire **dopo** l'incorporazione grazie ai contatti laterali del lattice.
- **Perdita del GTP-cap**: i protofilamenti **GDP** “**si aprono**” e **si arrotolano** (peeling) → **depolymerizzazione rapida** (catastrofe).

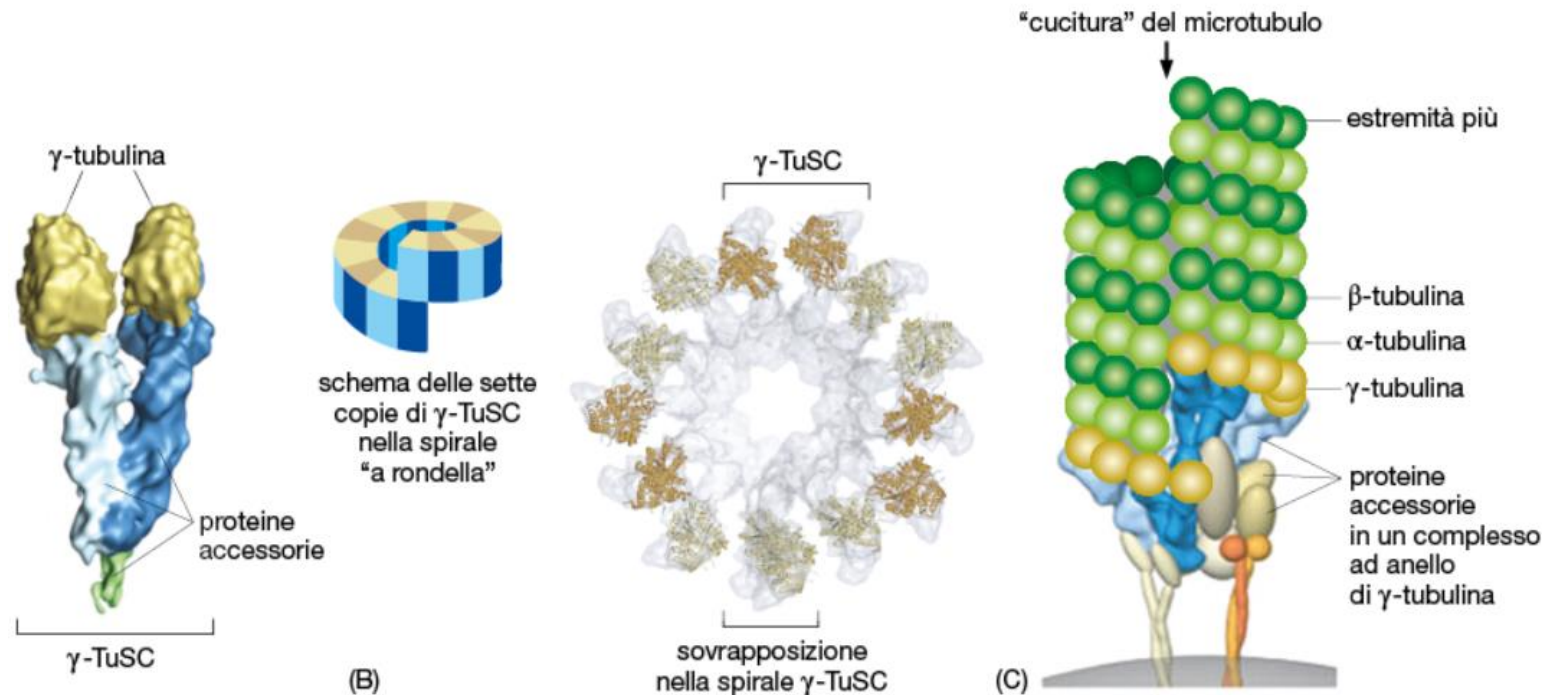
Nucleazione Microtubuli

Nucleazione MT: perché serve aiuto

- La **nucleazione spontanea** richiede **alte [tubulina]** (molti eterodimeri cooperanti).
- Le cellule usano **fattori dedicati**: la **γ -tubulina** e complessi associati.

γ -tubulina e MTOC

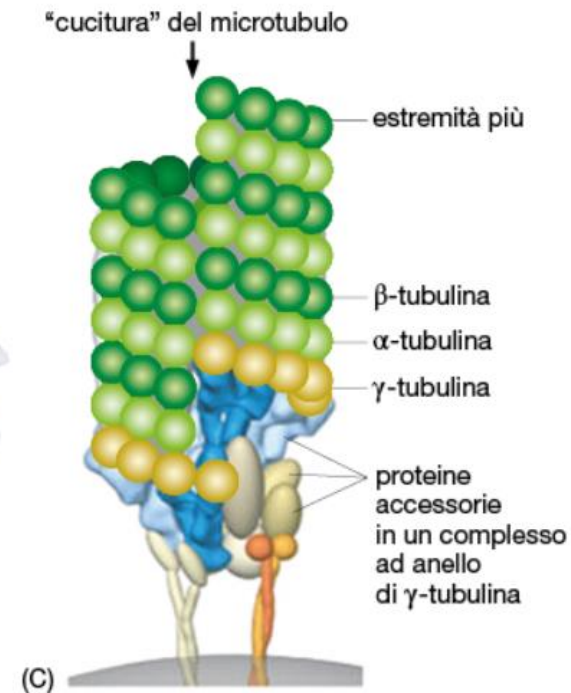
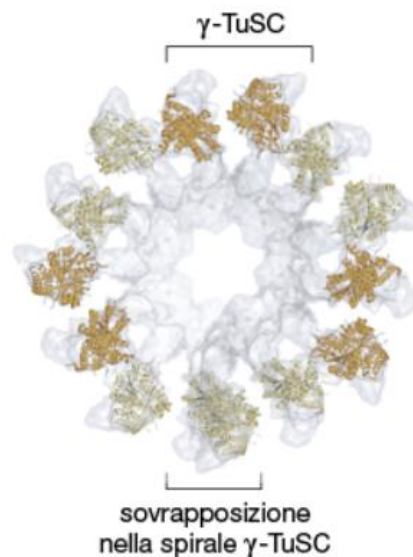
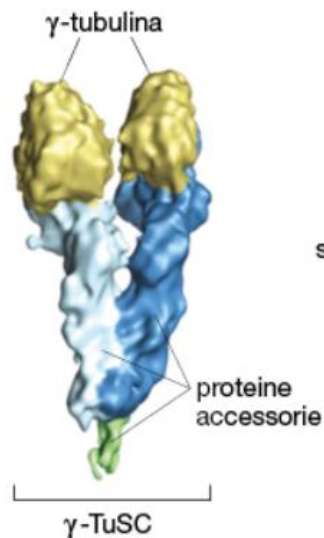
- Oltre a **α/β -tubulina** (lattice), la **γ -tubulina** (minoritaria) **nuclea i microtubuli in eucarioti** dal lievito all'uomo.
- I **microtubuli sono nucleati in siti specifici: MTOC** (MicroTubule-Organizing Center), ricchi di **γ -tubulina**



γ -TuSC e γ -TuRC

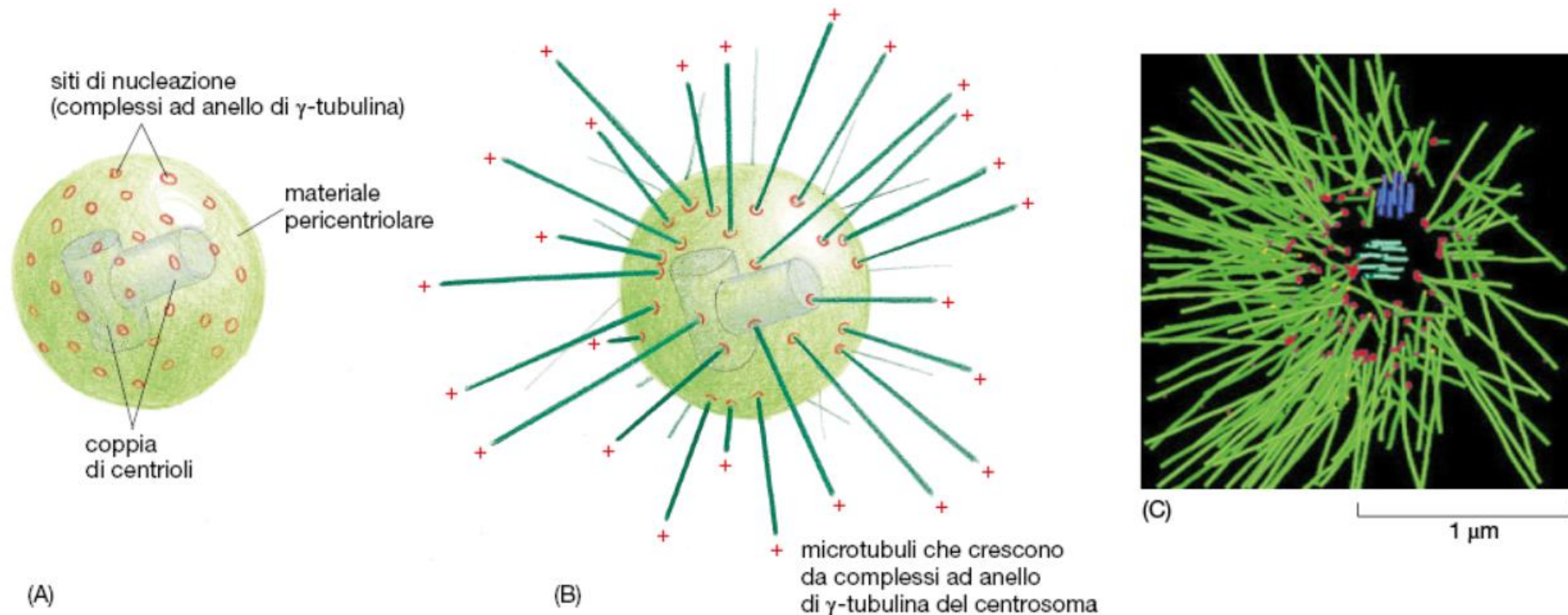
- **γ -TuSC**: 2 γ -tubuline + 2 proteine accessorie formano unità di base.
- 7 γ -TuSC $\rightarrow$ formano una **spirale** con **13 γ esposte in orientamento circolare** che **fanno da stampo** per 13 protofilamenti.
- Con ulteriori **subunità accessorie** $\rightarrow$ **γ -TuRC** che **nuclea l'estremità meno** del microtubulo.

- La **spirale** introduce una “**cucitura**” (seam) longitudinale **nel microtubulo**.
- Le **estremità** – sono **ancorate/nucleate**; le **estremità +** puntano **verso l'esterno e si allungano**

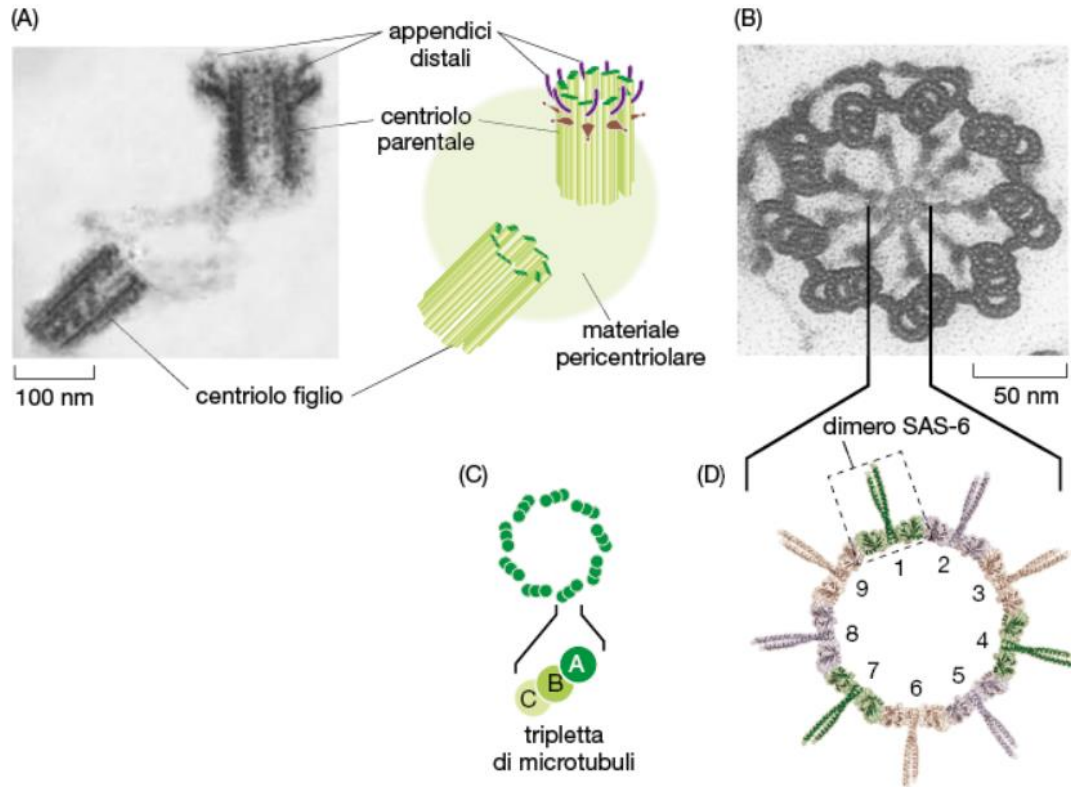


Il Centrosoma come MTOC

- **Unico MTOC** ben definito in molte cellule animali: **centrosoma**, vicino al nucleo.
- Un centrosoma **recluta** > 50 copie di **γ -TuRC**.
- **Tuttavia** molte cellule hanno **centinaia di MT**: molte estremità – sono **staccate dal centrosoma**.
- **Ablazione del centrosoma non blocca** la nucleazione (**γ -TuRC citoplasmatici**).
- Esistono **proteine** che **ancorano γ -TuRC al centrosoma**; i meccanismi di attivazione della nucleazione **restano poco chiari**.



Centrioli e Materiale Pericentriolare



Centrioli e materiale pericentriolare

- Il centrosoma **contiene 2 centrioli** disposti **a L**.
- **Centriolo**: cilindro “a botte” **contiene 9 triplette** di **microtubuli** (**A** completa + **B** e **C** incomplete) → **simmetria a 9**.
- **SAS-6**: dimeri a spirale; **9 dimeri** formano un **anello centrale** che **imposta la simmetria**.
- I centrioli + numerose proteine reclutano il **materiale pericentriolare (PCM)**, matrice densa che nuclea i MT (**condensato biomolecolare**).
- I **centrioli** funzionano anche da **corpi basali** per l'**assonema ciliare**.

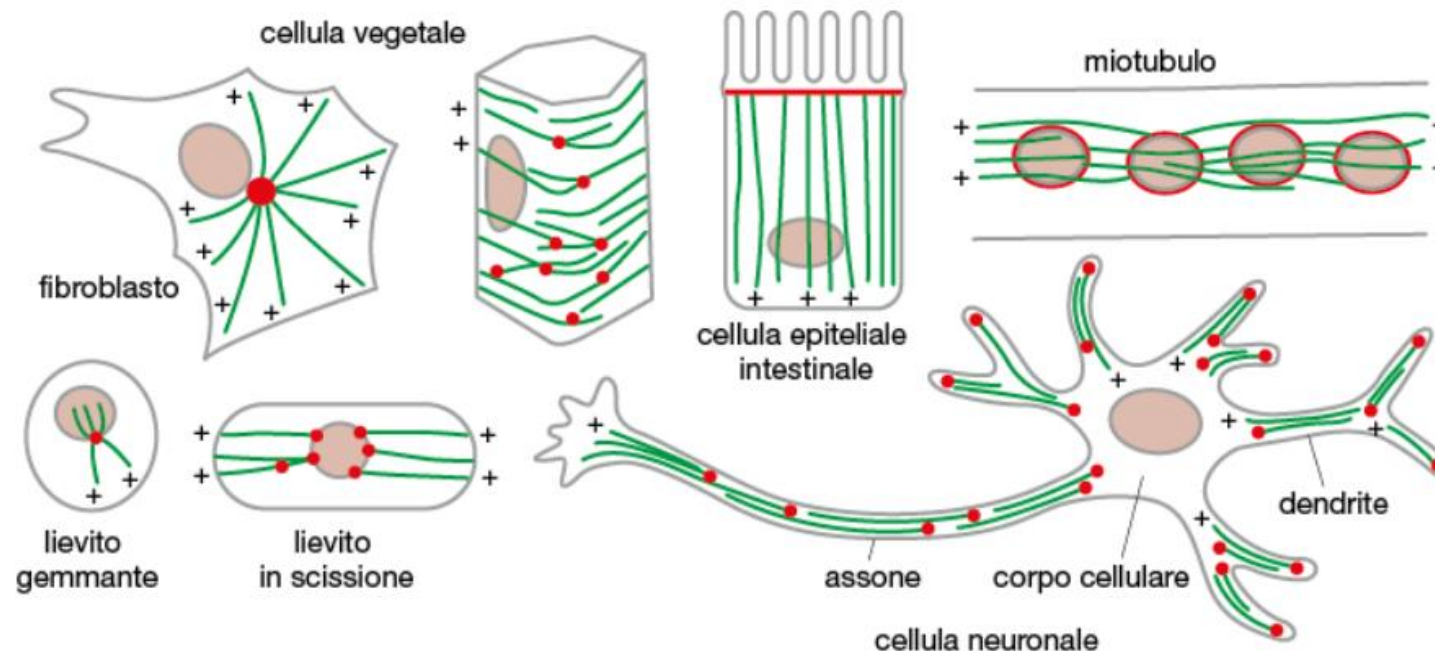
Organizzazione dei MT: varia tra i tipi cellulari

Fibroblasti e MTOC alternativi

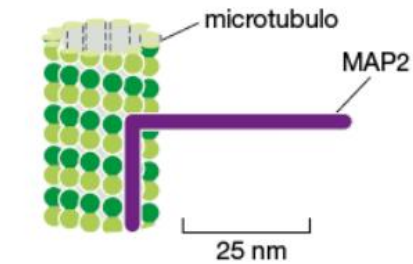
- **Fibroblasti** Estremità + verso la **periferia**, Estremità – vicine al **nucleo**.
- Molte **estremità – svincolate dal centrosoma**;
- **Apparato di Golgi** può fungere da **MTOC** (soprattutto in cellule **mesenchimali**).
- La rete MT fornisce un **sistema di coordinate** per **posizionare organuli**.

Polarità negli epiteli

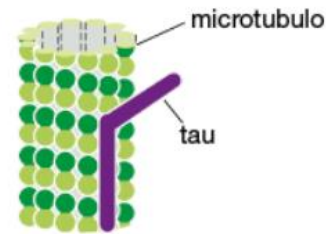
- In cellule **epiteliali polarizzate**: le **Estremità –** si **riposizionano apicalmente**;
- i **MT** si **allineano** lungo l'**asse** lungo della **cellula** con le **Estremità +** verso la **base**
- Le **Estremità –** possono essere **stabilizzate** da **γ -TuRC** o da **proteine di capping**
- In assenza di stabilizzazione, le **Estremità –** possono fungere da **siti di depolimerizzazione**.



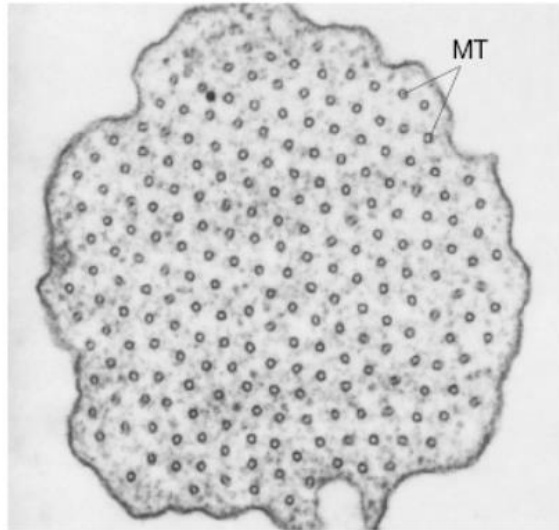
MAP: Microtubule Associated Proteins



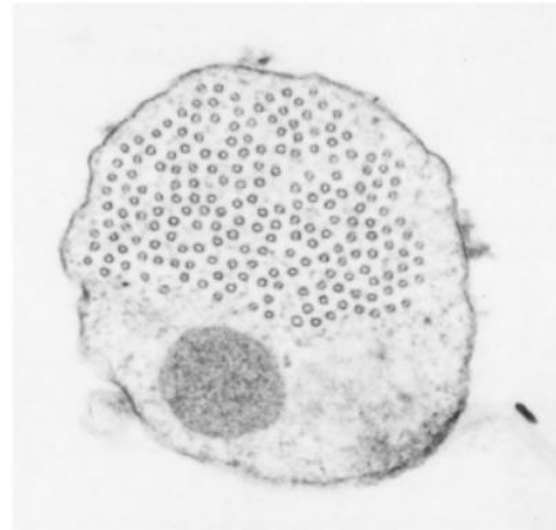
(A)



(B)



(C)



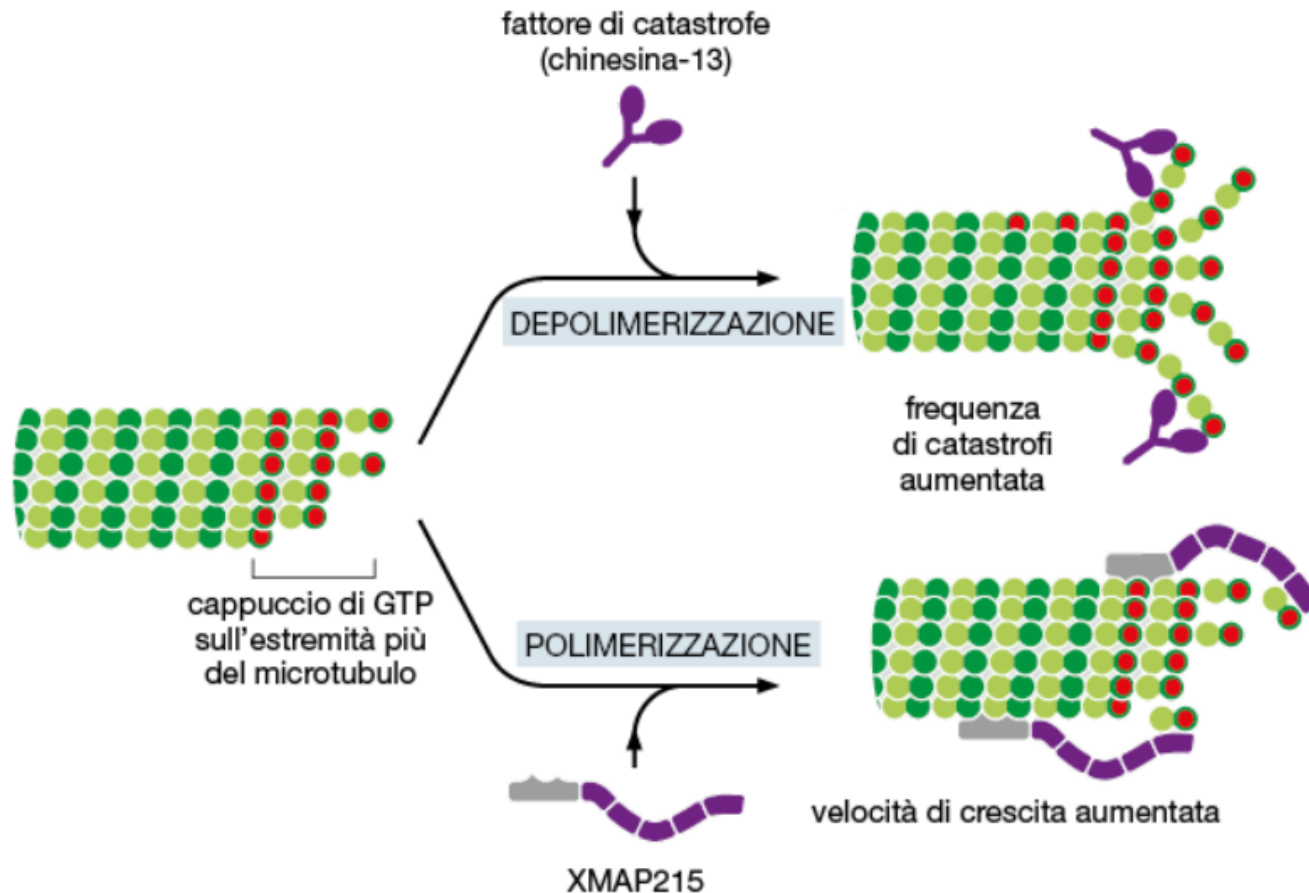
(D)

- **MAP** = *Microtubule-Associated Proteins*.
- Le **code C-terminali** (~20 aa) di α e β tubulina sono ricche di **Glu/Asp** → **superficie del MT negativa**.
- Molte **MAP** sono **cariche positivamente** → **interazioni elettrostatiche** con il lattice.
- Funzioni: **stabilizzare** MT; **collegarli** ad altri componenti cellulari; **modularne** la **dinamica**.

Spaziatura controllata: MAP2 vs tau

- **MAP2** (dominio sporgente **lungo**) → fasci **stabili** ma **tenuti distanti**.
- **Tau** (dominio sporgente **corto**) → fasci **molto compatti**.

Proteine che modulano la stabilità dei microtubuli



Fattori di catastrofe: kinesina-13

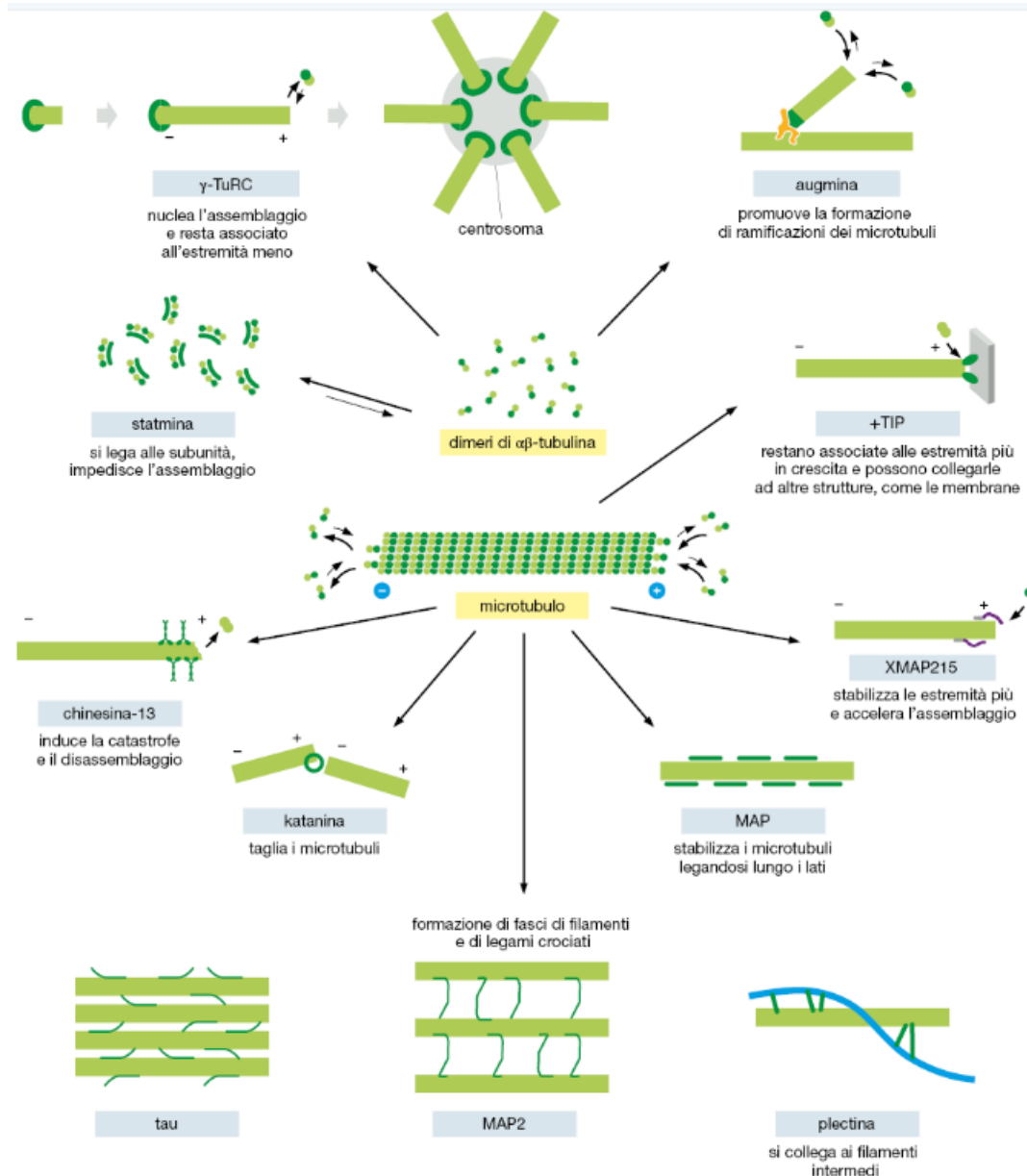
- Famiglia di **chinesine** che agiscono come **fattori di catastrofe (kinesin-13s)**.
- **Meccanismo:** si legano alle **estremità** dei MT e **separano i protofilamenti**, abbassando la **barriera energetica** che impedisce la transizione al **protofilamento curvo** tipico dell'**accorciamento**.
- **Effetto:** promuove transizioni cattastofe: crescita→accorciamento.

Polymerase della +: XMAP215

XMAP215 (conservata dal **lievito** all'**uomo**):

- **Si lega ai dimeri** di tubulina liberi e li **traghetta alla +** del MT.
- **Accelera** notevolmente la **polimerizzazione** (analogia funzionale con le **formine** dell'actina).
- **Effetto:** stabilizza la crescita quando presente alla punta.

Principali Proteine Accessorie del Citoscheletro di Microtubuli

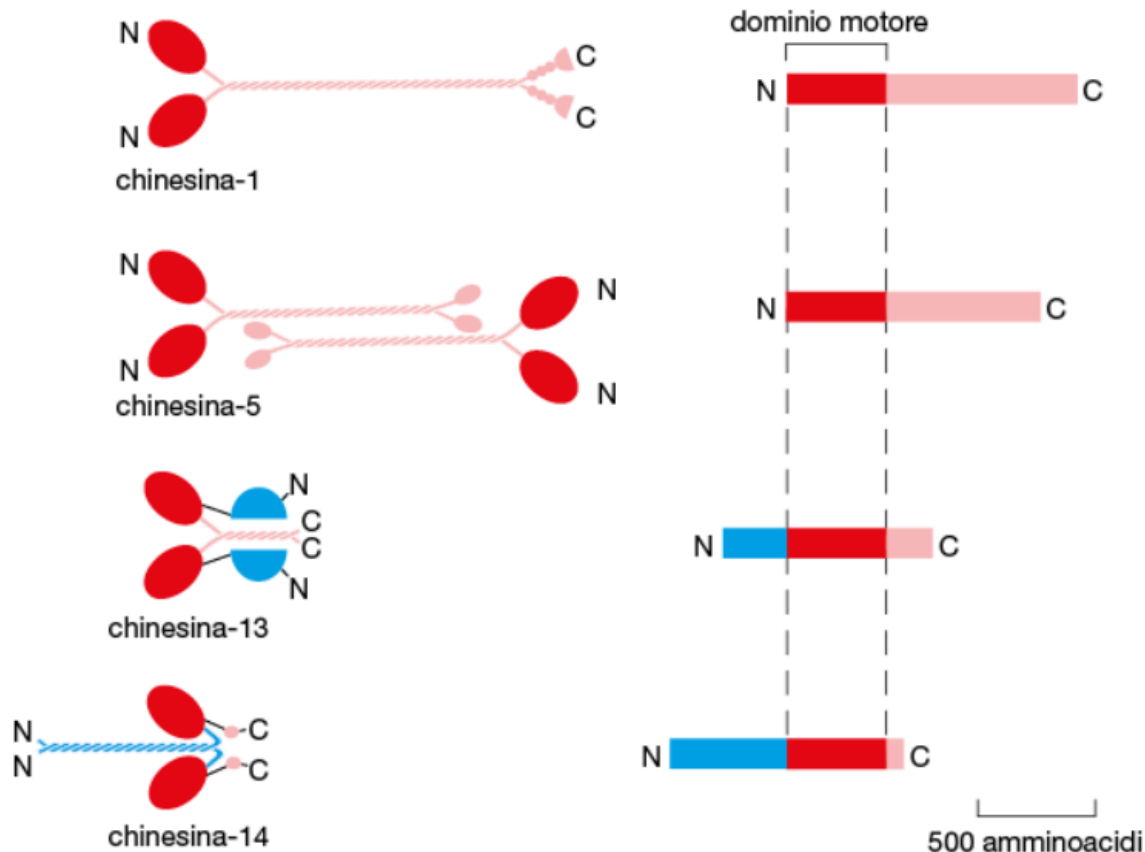


Alcune delle principali proteine accessorie del citoscheletro di microtubuli.

A eccezione di due classi di proteine motrici, è mostrato un esempio dei tipi principali.

Tuttavia, la maggior parte delle cellule contiene più di un centinaio di proteine diverse che legano i microtubuli; come per le proteine associate all'actina, è probabile che vi siano tipi importanti di proteine associate ai microtubuli che non sono ancora stati riconosciuti.

Proteine Motore dei Microtubuli



Due famiglie di motori su microtubuli:

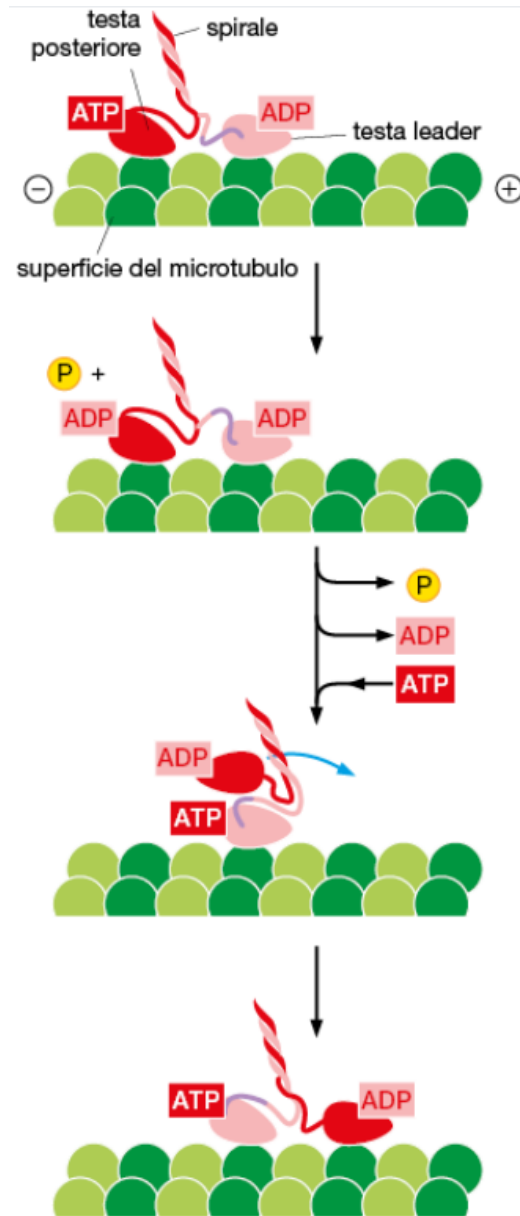
Chinesine e dineine: 3 funzioni principali

- **Trasporto a lunga distanza** di organuli/macromolecole.
- **Scorrimento MT-MT** → disposizioni specifiche (neuroni, epiteli; fuso mitotico).
- **Regolazione della dinamica** dei MT.

Superfamiglia delle chinesine

- **Condividono il dominio motore**, resto molto diversificato.
- **Kinesina-1:** 2 **catene pesanti** (teste motrici) + **coda coiled-coil** (dimerizzazione).
- **Direzionalità:**
 - Motore **N-terminale** → **verso +** (la maggior parte).
 - Motore **C-terminale** → **verso -**.
 - **Kinesina-13:** motore **centrale**, **non cammina**: **depolimerizza** le estremità.

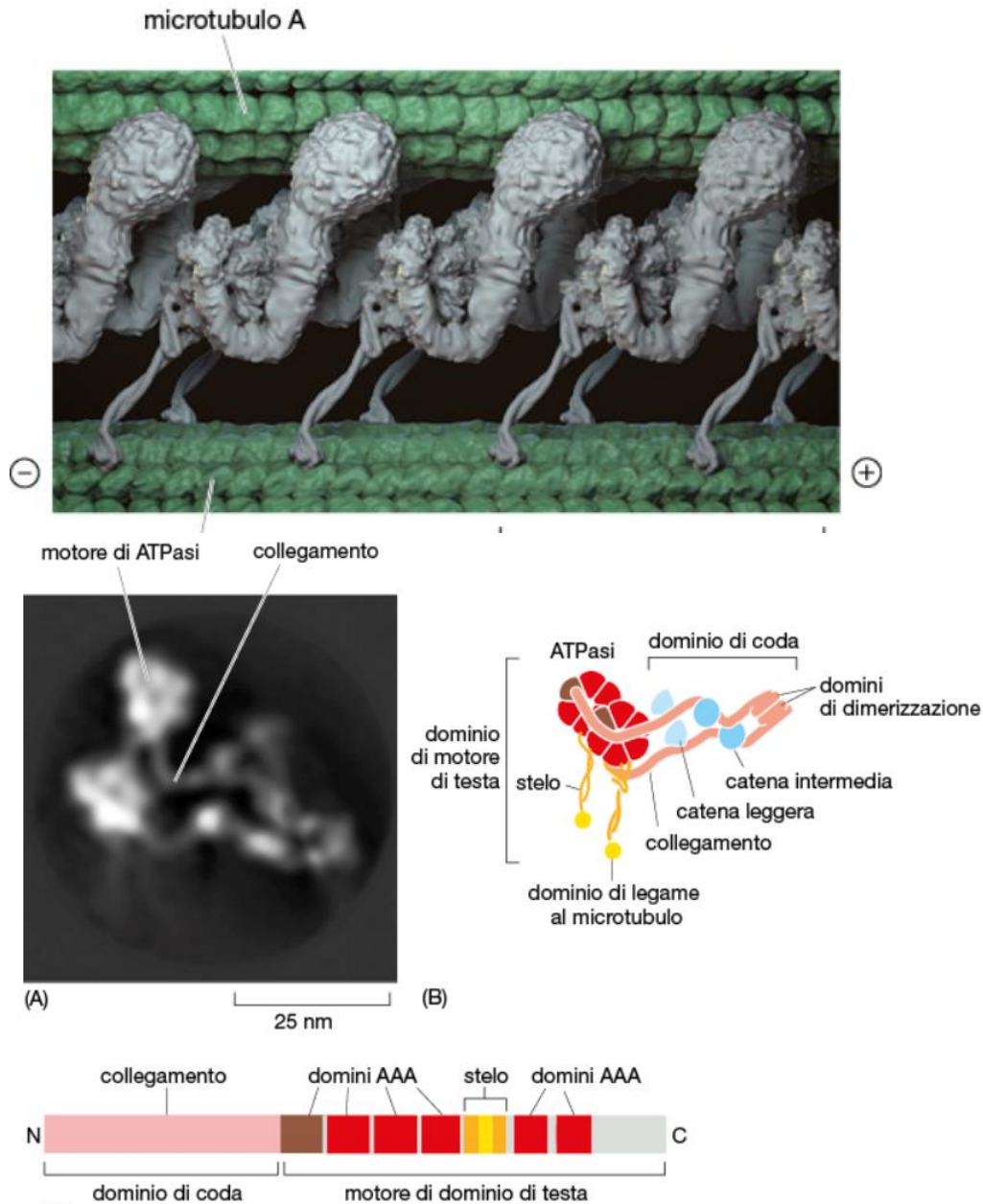
Ciclo della Kinesina-1: motori verso l'Eestremità +



Passi da 8 nm: ciclo della kinesina-1

- Micro-movimenti al sito **ATP** regolano **attacco/distacco** del **linker** del collo.
- La **testa posteriore** sorpassa la **partner** e si lega 8 nm più avanti (**passo per dimeri $\alpha\beta$**).
- **Cicli ATP** delle due teste **coordinati** → marcia **processiva** “testa dopo testa”.

Dineine: motori verso l'Eestremità +

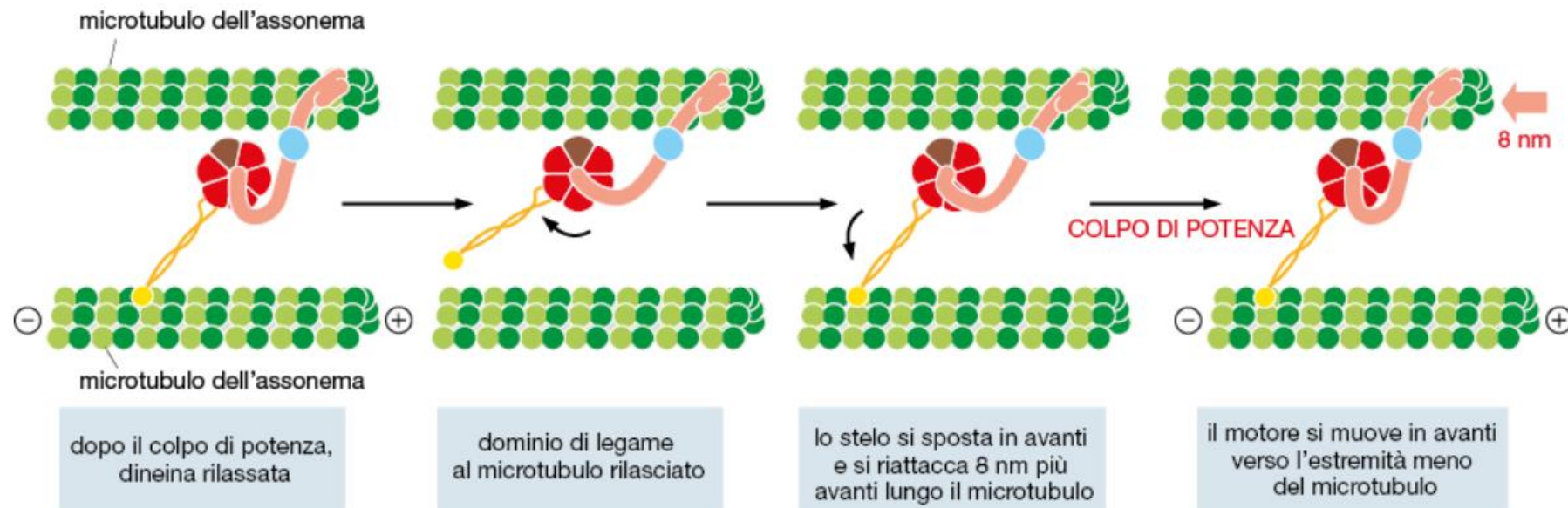


Dineine: i motori verso “-”

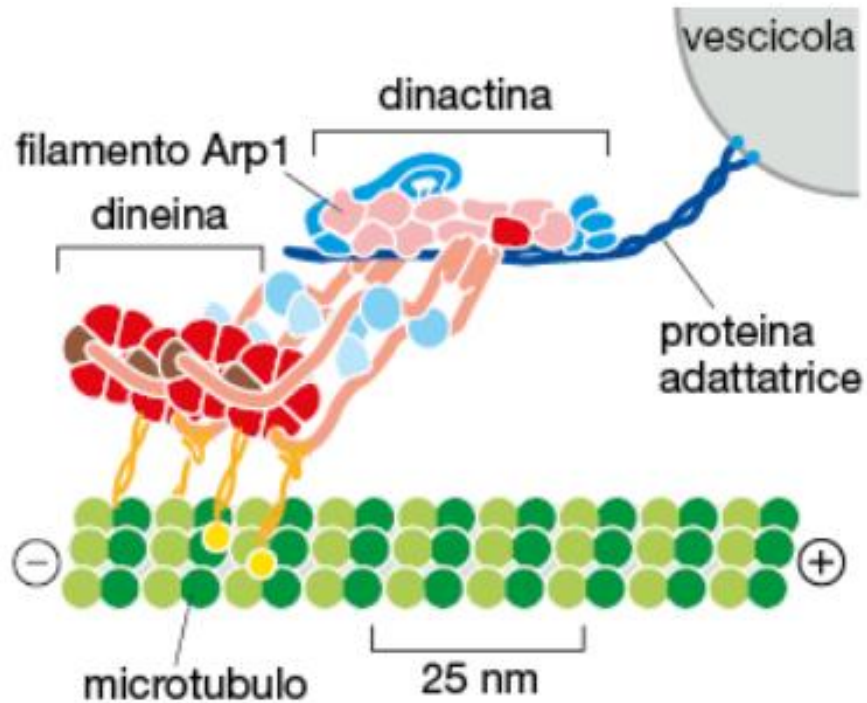
- Composte da 1–3 catene pesanti (motore) + catene intermedie / intermedie-leggere / leggere.
- Due rami principali:
 - **Dineine citoplasmatiche:**
 - **Dineina-1** : **trasporto organuli/mRNA**, **posizionamento centrosoma/nucleo** in migrazione, **fuso** mitotico/meiotico.
 - **Dineina-2**: solo in eucarioti con **ciglia**; trasporto IFT **retrogrado** (punta → base).
 - **Dineine assonemiche**: mono/etero-dimeri/trimeri (1–3 motori) **specializzate nello scivolamento rapido che muove cilia/flagelli**.
- Tra i motori **più grandi e più veloci**; accoppiano **ATP** a **attacco/distacco** e **power-stroke**.

Trasporto intracellulare polarizzato

- In interfase: MT con l'Estremità – verso **centro/centrosoma**, e l'Estremità + verso **periferia**.
- **Centripeto** ($\rightarrow -$): **dineina-1** citoplasmatica.
- **Centrifugo** ($\rightarrow +$): ≥ 15 diverse **chinesine**.
- Al contrario, nel **neurone**: **anterogrado** veloce (kinesina) ai terminali; **retrogrado** (dineina-1) verso soma.



Motori e Patologie da difetti di dineina



ER e Golgi dipendono dai MT

- **RE:** reticolo di tubuli **allineato** ai MT fino al bordo cellulare.
- **Golgi:** vicino al centrosoma.

Selettività del carico

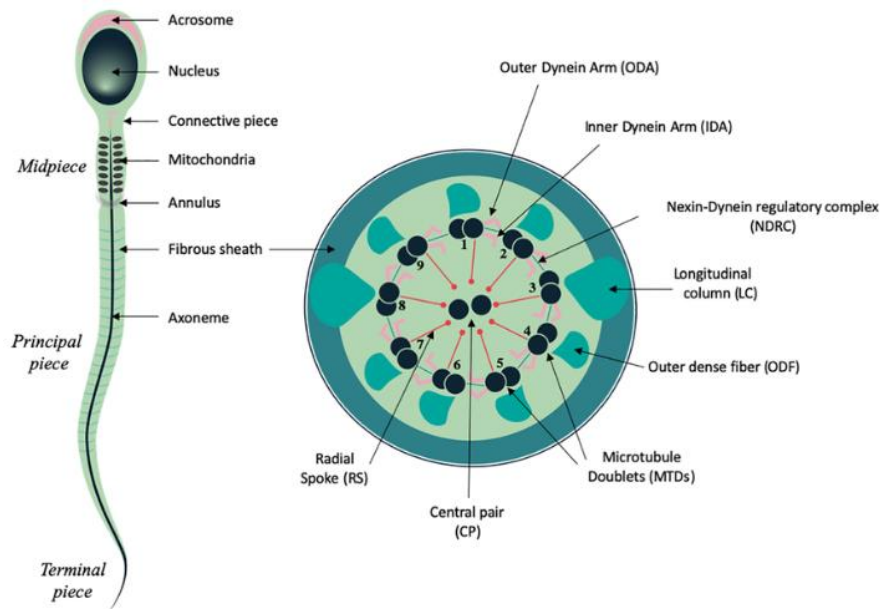
- **Code e catene leggere** specifiche **indirizzano** i motori ai compartimenti corretti.
- **Molte altre proteine** regolano **attacco** al carico e **attività del motore** (critiche nei neuroni).

Motori e patologie neurologiche

- **Lissencefalia:** difetti in **Lis1** (lega la dineina), essenziale per **migrazione nucleare** → **fallisce il posizionamento dei neuroni in corteccia** durante lo sviluppo → ritardi e deficit neurologici.
- **Mutazioni** in **dinactina** o nella **coda della dineina citoplasmatica** → **neurodegenerazione** umana/murina, con ↓ **trasporto retrogrado assonale** → evidenza dell'importanza del **traffico MT-dipendente**

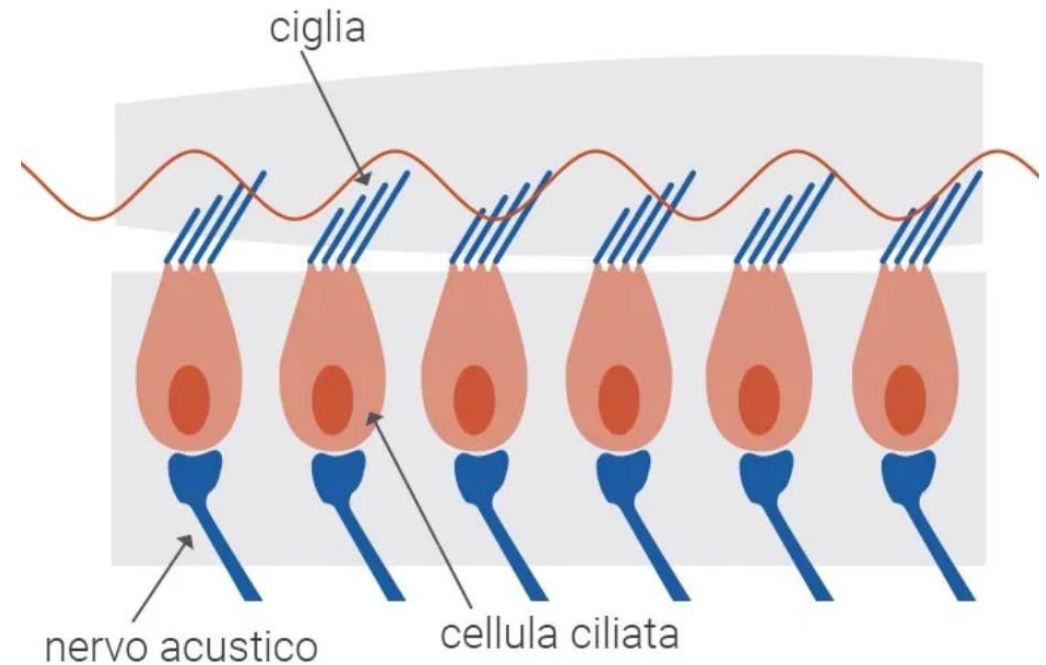
Macchine motili basate su MT

- **Le ciglia e i flagelli** sono **strutture mobili altamente specializzate** ed efficienti **costituite da microtubuli e dineina**.
- **Flagelli**: spermatozoi e molti protozoi → **moto ondulatorio** per nuoto in liquidi.
- **Ciglia**: stesso principio, **battito a frusta** (stile “rana”).



Importanza fisiologica delle Ciglia

- Si trovano nel tratto respiratorio: **densità elevatissima di ciglia** → trasporto di **muco, polveri, batteri** verso la bocca (clearance mucociliare).
- **Ovidotto**: ciglia **trasportano l’oocita** verso l’utero.



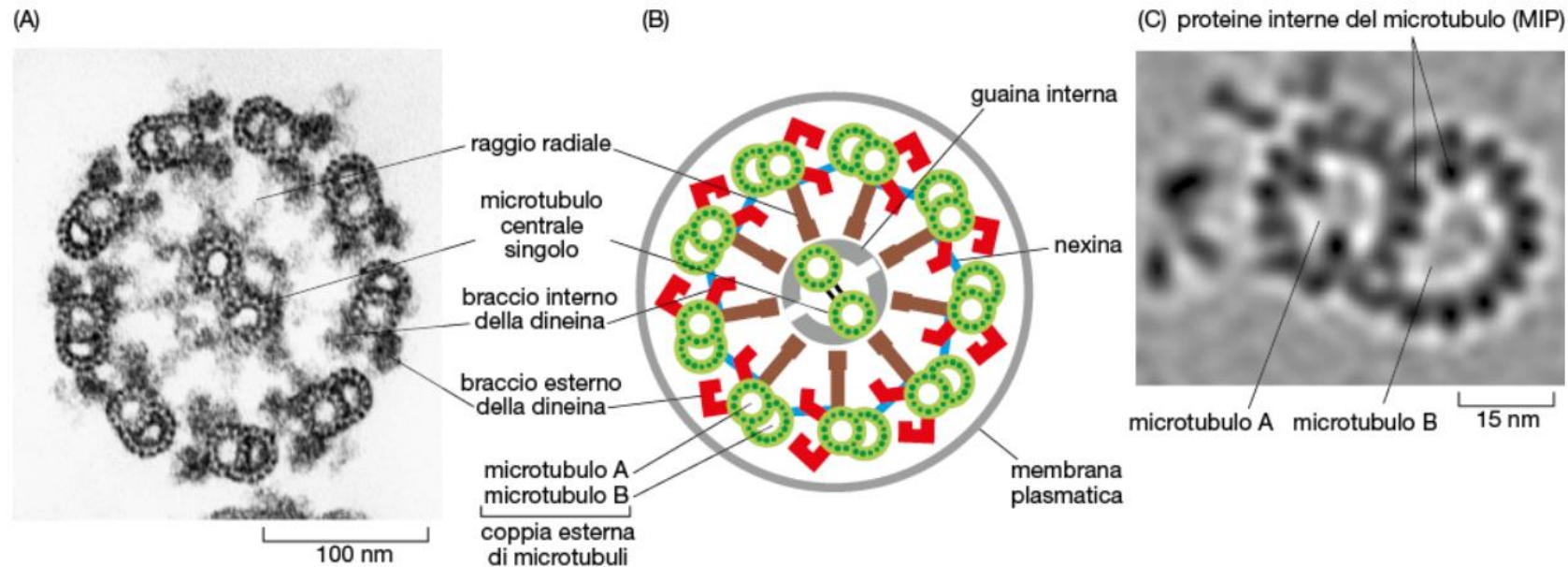
NB: Flagello Batterico è una struttura completamente diversa e non correlata a quella eucariote

Assonema: Unità Funzionale

Architettura dell'assonema

- Il **movimento** di un **ciglio** o di un **flagello** è dato dalla **rotazione** del suo **core**, detto **assonema**.
- **Schema 9+2**: nove doppiette periferiche che circondano due microtubuli singoli centrali.
- **Ogni doppietta**: **A** (microtubulo completo) + **B** (incompleto) fusi (parete condivisa).
- I microtubuli si **estendono in continuità** lungo tutta la lunghezza dell'assonema.

- **Dineine assonemiche**: “ponti” motori tra doppiette adiacenti.
- **Collegamenti elastici** (es. **nexin**) tra doppiette → limitano lo **scorrimento**.
- **Raggi radiali** → collegano doppiette periferiche alla **coppia centrale**.
- **Proteine accessorie** disposte a **intervalli regolari** lungo i MT → **cross-link** e stabilità.



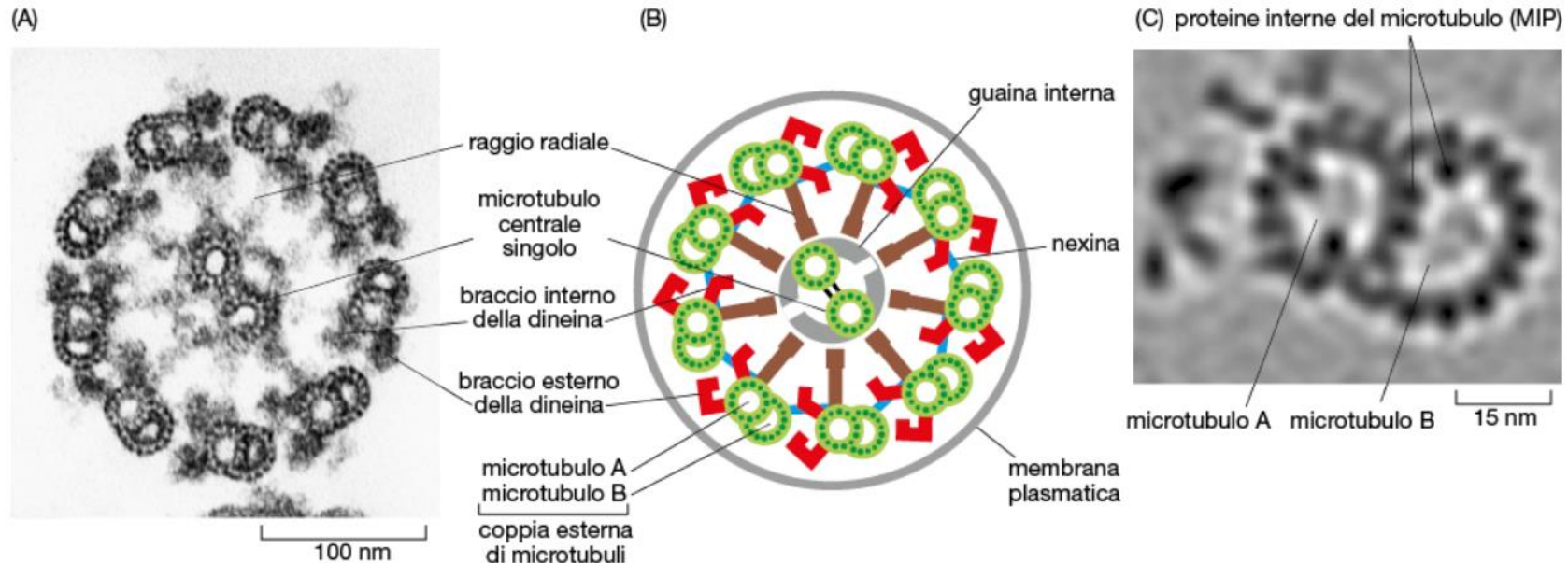
Treadmilling

Come si genera il movimento

- Il **dominio motore** della **dineina**, attivato da **ATP**, tenta di **scorrere** sulla doppietta adiacente.
- Lo **scorrimento** è **convertito in curvatura** perché i **collegamenti** (nexin, raggi radiali, ancoraggi) **impediscono lo slittamento libero**.
- Non tutte le dineine sono attive insieme → **onda** di attivazione → **battito/ondulazione** coordinata.

Ciglia: ciclo di battito

- **Colpo efficace**: asta ciliare **rigida**, spinge fluido/particelle.
- **Colpo di recupero**: asta **si flette**, minimizza resistenza e **ritorna** alla posizione iniziale.
- La ripetizione ciclica → **trasporto direzionale** del fluido sulla superficie epiteliale.



Cambiamenti Citoscheletrici Durante la Divisione

Fibroblasto in movimento (interfase):

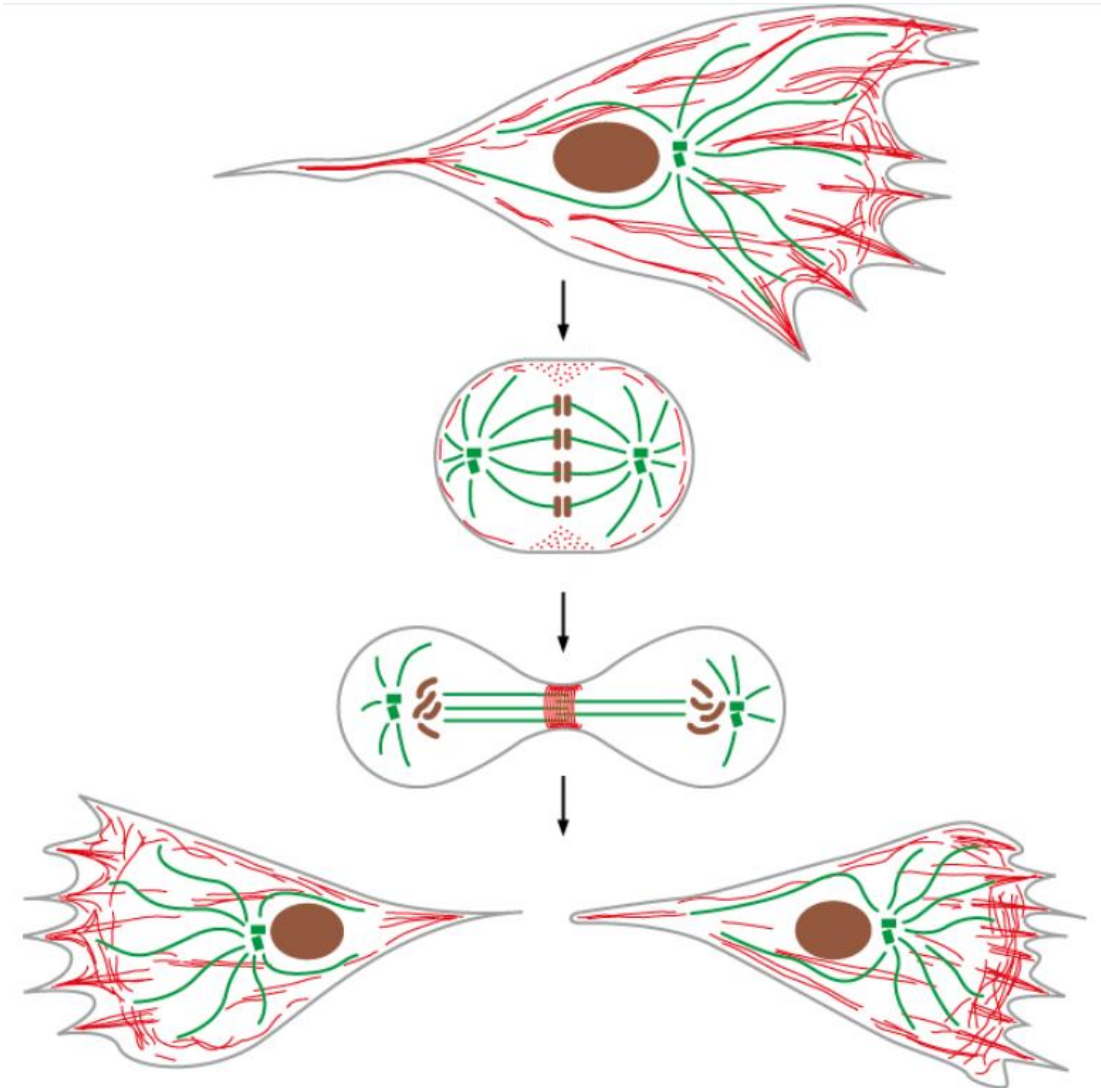
- Citoscheletro di **actina** dinamico e polarizzato (rosso).
- Formazione di **lamellipodi e filopodi** che spingono il bordo anteriore verso destra.
- **Microtubuli (verde)** organizzati da un **MTOC** posto davanti al nucleo → mantengono la polarità.

Durante la divisione:

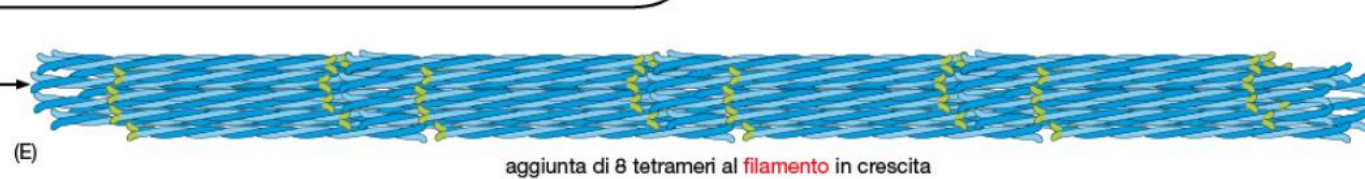
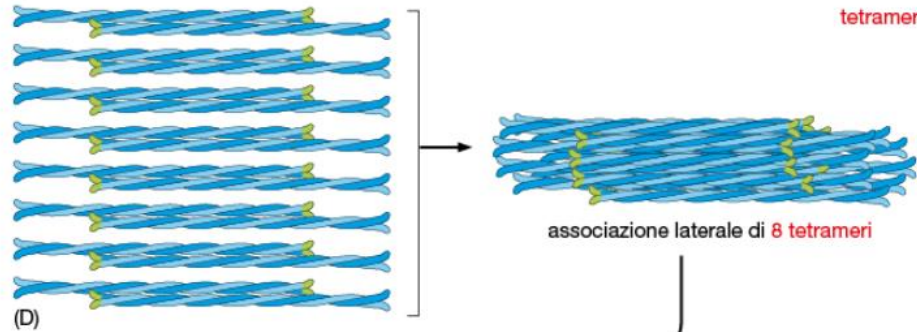
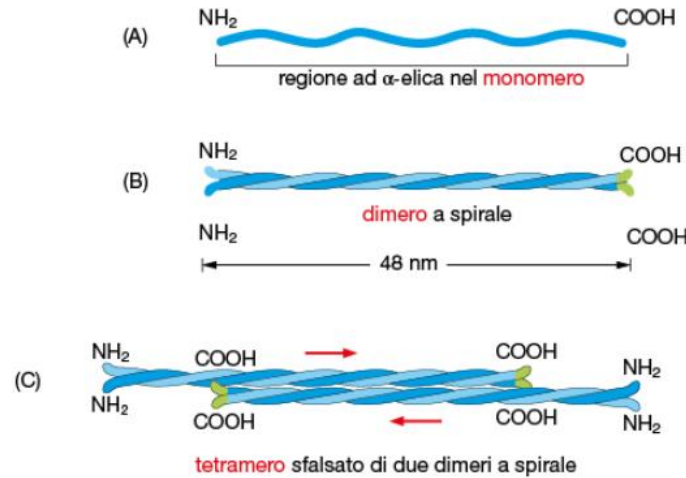
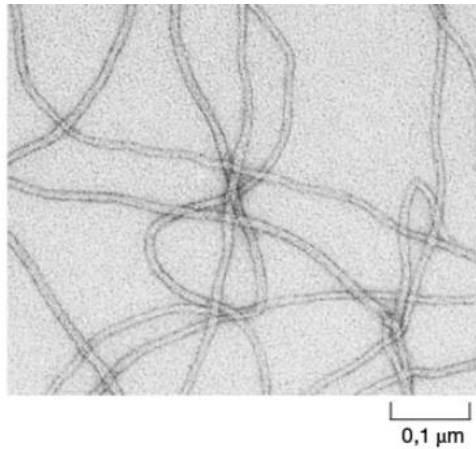
- La cellula diventa **sferica**.
- I **microtubuli** si **riorganizzano** in un **fuso mitotico bipolare**, responsabile dell'allineamento e separazione dei **cromosomi duplicati** (marrone).
- I **filamenti di actina** formano un **anello contrattile** al centro della cellula → citodieresi.

Dopo la divisione:

- Le **cellule figlie** ricostruiscono i rispettivi citoscheletri di actina e microtubuli.
- Tornano appiattite e capaci di **strisciare autonomamente**.



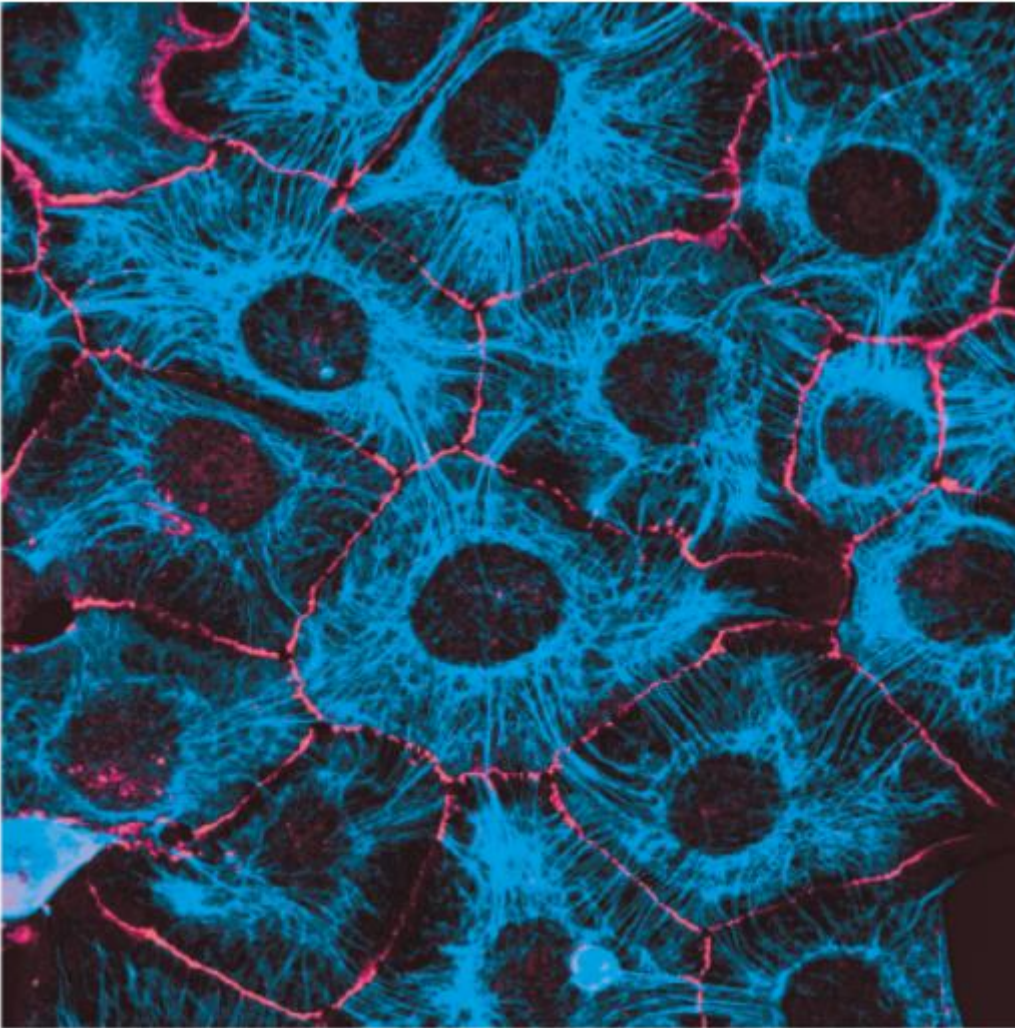
Filamenti Intermedi



Filamenti intermedi & contesto evolutivo

- Tutte le cellule eucariote: **actina** e **tubulina** presenti.
- Il 3° grande sistema citoscheletrico, i **filamenti intermedi (FI)**, forma filamenti **citoplasmatici** solo in **alcuni metazoi** (vertebrati, nematodi, molluschi).
- I FI sono **evidenti** in cellule esposte a **stress meccanici**; in genere **assenti** in animali con **esoscheletri rigidi** (es. artropodi, echinodermi).
- Funzione generale: conferire **forza meccanica** ai tessuti di animali “**molli**”.

Filamenti Intermedi



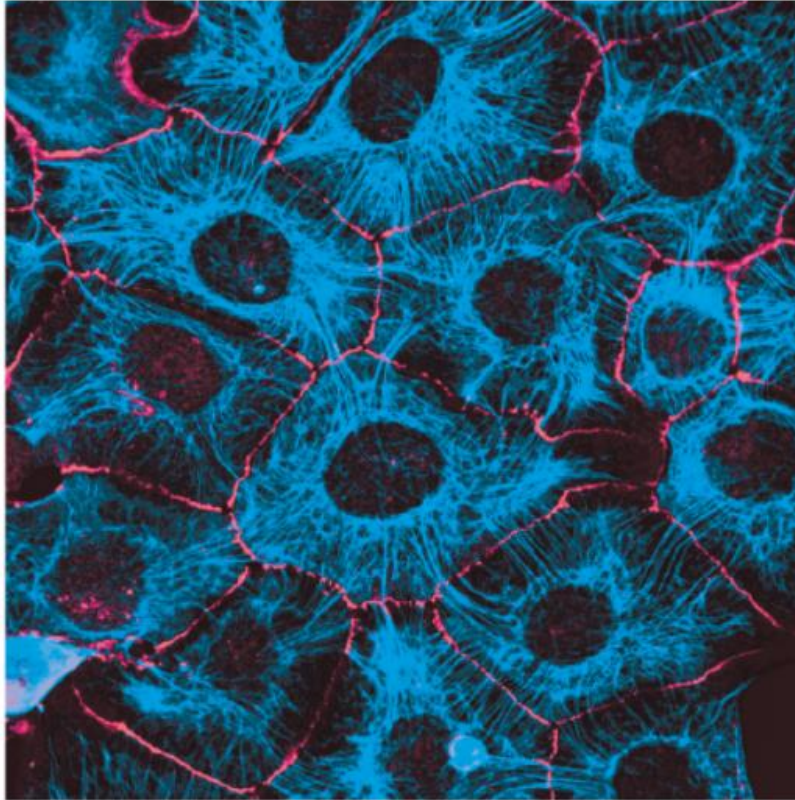
Legame con le lamine nucleari

- I FI citoplasmatici sono **strettamente correlati** alle **lamine nucleari** (presenti in molti eucarioti; **assenti** negli organismi unicellulari).
- Le **lamine** formano un **reticolo** sulla **membrana interna** dell'involucro nucleare: **Siti di ancoraggio** per **cromosomi** e **pori** nucleari.

Diversità genetica

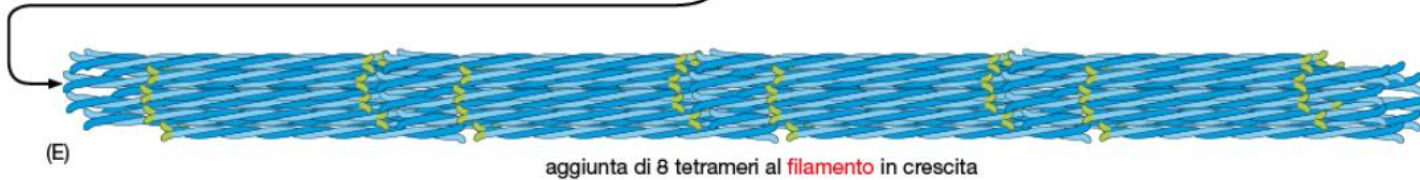
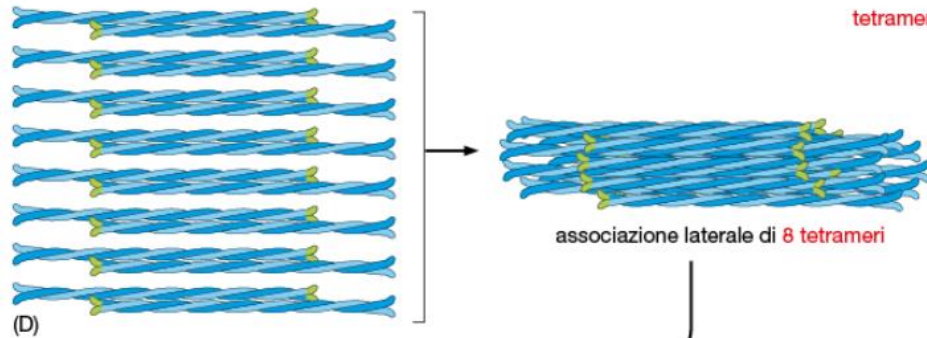
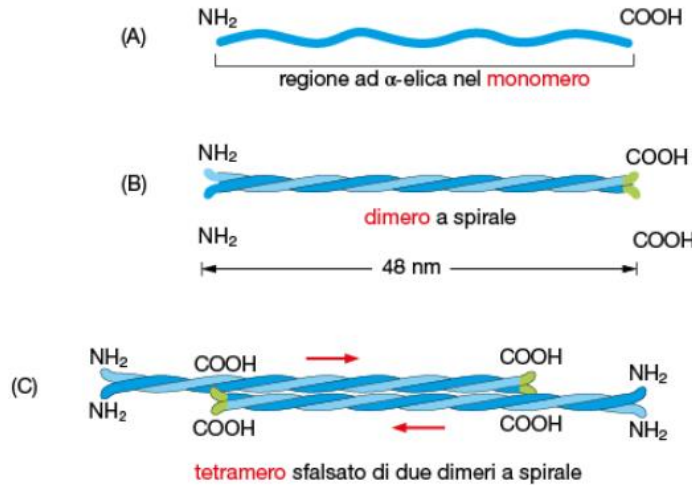
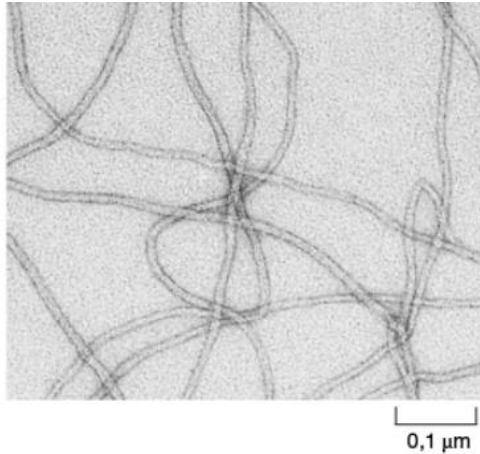
- **A differenza di actina/tubulina** (poche isoforme, molto conservate), i FI **sono ampiamente diversificati**.
- **~70 geni umani** codificano proteine FI con **funzioni specifiche di tipo cellulare**.
- **Cheratine**: 54 varianti nel genoma umano (≈ 20 epiteliali; ≈ 10 specifiche di capelli/unghie).

Tipi di Filamenti Intermedi



Tipo di filamento intermedio	Polipeptidi componenti	Localizzazione
Nucleare	Lamine A, B e C	Lamina nucleare (rivestimento interno dell'involucro nucleare)
Simile a vimentina	Vimentina	Molte cellule di origine mesenchimale
	Desmina	Muscolo
	Proteina fibrillare acida gliale	Cellule gliali (astrociti e alcune cellule di Schwann)
	Periferina	Alcuni neuroni
Epiteliale	Cheratine di tipo I (acide)	Cellule epiteliali e loro derivati (per esempio, capelli e unghie)
Epiteliale	Cheratine di tipo II (neutre/basiche)	
Assonale	Proteine dei neurofilamenti (NF-L, NF-M e NF-H)	Neuroni

Filamenti Intermedi: Architettura



Architettura modulare dei FI

- Proteine **allungate** con **dominio centrale conservato ad α -elica** con
- **Monomero $\rightarrow$ Dimero**: 2 monomeri in **parallelo** si avvolgono (**spirale**).
- **Dimero $\rightarrow$ Tetramero**: 2 dimeri in **antiparallelo** e **sfalsati** $\rightarrow$ **tetramero** (subunità solubile).

Proprietà uniche rispetto ad actina/MT

- **Nessun sito di legame per ATP/GTP** nelle subunità dei FI.
- **Il tetramero ha estremità identiche** (due dimeri opposti) $\rightarrow$ i FI **non sono polari** (assenza di “+”/“–”).
- **Assemblaggio**: tetrameri si associano **lateralmente** $\rightarrow$ **8 protofilamenti paralleli** $\rightarrow$ **32 spirali α -elica**

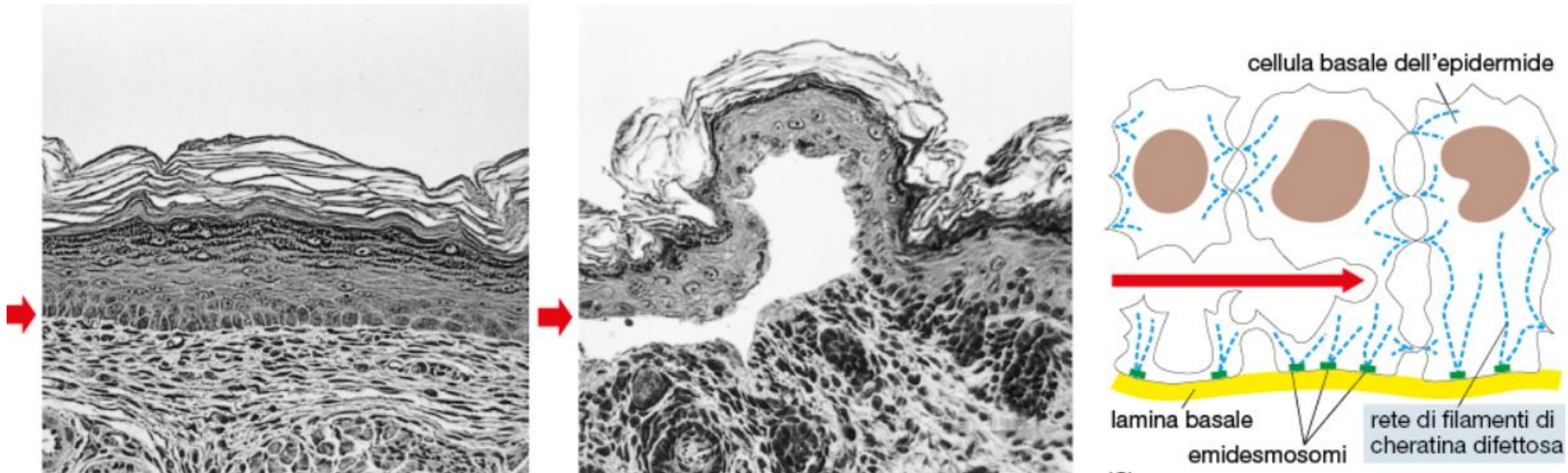
I Filamenti Intermedi: Le Cheratine

La famiglia più vasta: le cheratine: circa **54** cheratine nel genoma umano:

- **Tipo I (acide) e Tipo II (neutro/basiche) → eterodimeri 1:1.**
- Una **stessa cellula epiteliale** può esprimere **più cheratine** che **co-polimerizzano** in un'unica **rete**.
- **Reti** stabilizzate da **legami disolfuro** → sopravvivono alla **morte cellulare** (pelle esterna, **capelli, unghie, artigli, squame**).

Meccanica “da corda”: robusti ma flessibili

- **Flessibili** (si piegano facilmente), ma **difficili da rompere**.
- **Estensibilità:** possono allungarsi **> 3×** della lunghezza iniziale.
- Le **forti interazioni idrofobiche laterali** (coiled-coil) spiegano la resistenza **“tipo corda”**.



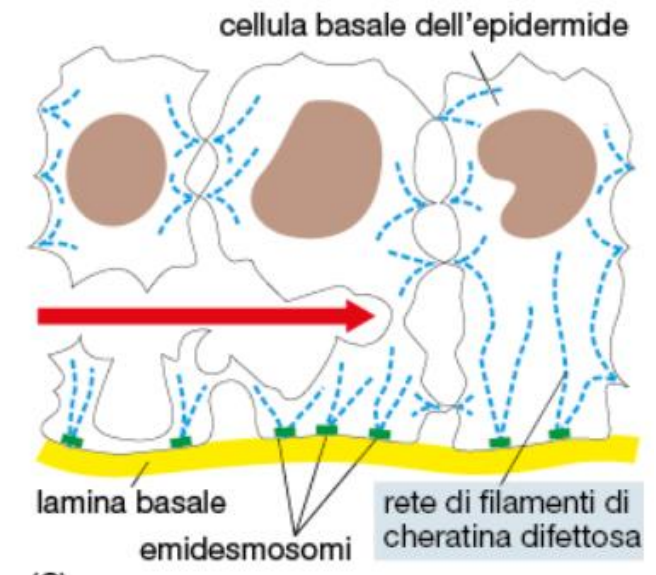
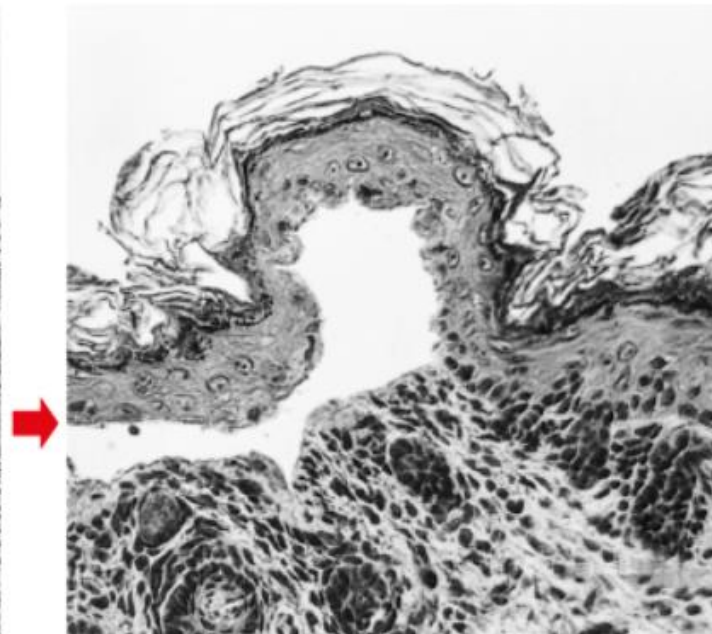
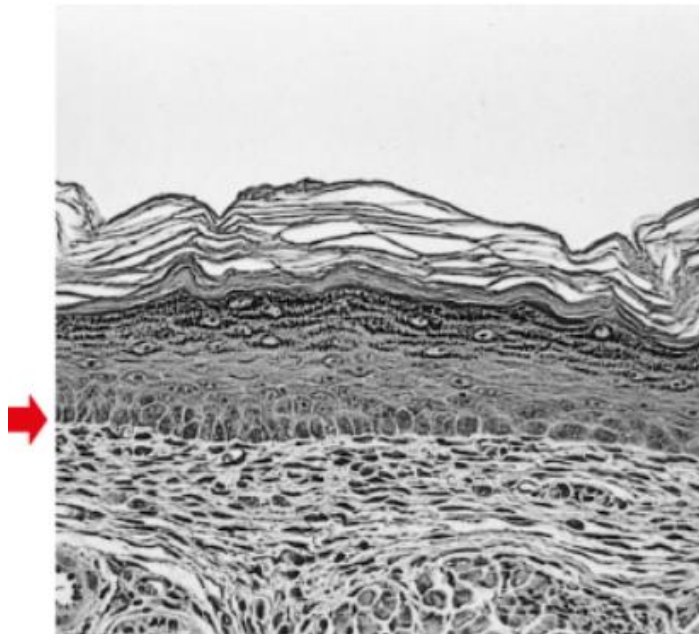
I Filamenti Intermedi: Le Cheratine

Cheratine: valore diagnostico & ancoraggi

- **Profilo di cheratine** è un **marker istologico** nei **carcinomi** (indica **tessuto d'origine** → guida la terapia).
- **Filaggrina** “fascetta” i filamenti → **indurisce** gli strati epidermici esterni;
 - Mutazioni **filaggrina** → predisposizione a **eczema** (pelle secca).

Cheratine & patologie bollose

- **Epidermolisi bollosa semplice (EBS)**: cheratine **difettose** nello **strato basale** → vesciche che si formano anche con **minimi stress** (rottura cellule basali).
- Comune denominatore: **rottura cellulare**, **disorganizzazione/ammasso** del citoscheletro di cheratina.



I Filamenti Intermedi: I Neurofilamenti

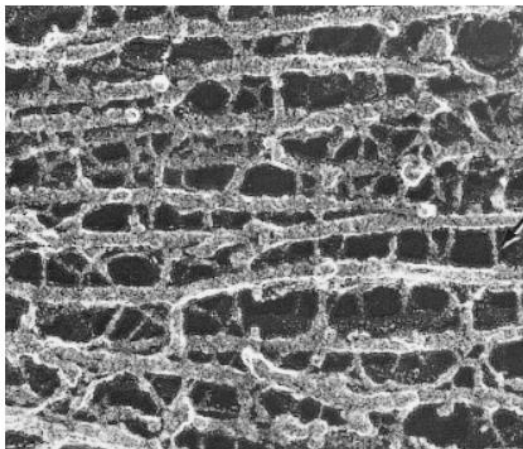
Neurofilamenti: architettura e funzione

- **3 proteine principali: NF-L, NF-M, NF-H** → **co-assemblano** in **eteropolimeri**.
- **Code C-terminali** (lunghe) di **NF-H/NF-M** si **agganciano** a filamenti vicini
- **Densità elevata** lungo gli **assoni** dei vertebrati → **forza** e **stabilità** dei lunghi processi.

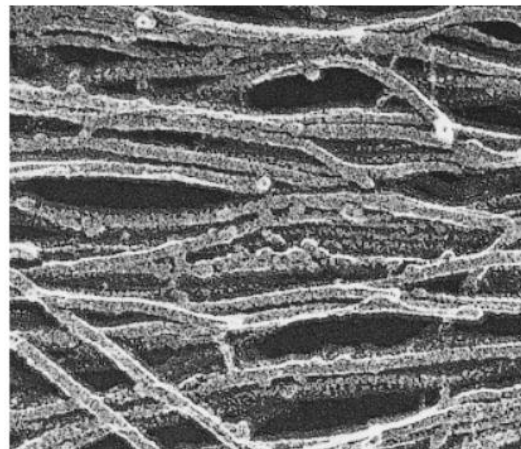
Neurofilamenti: dinamica lungo l'assone

- **Durante la crescita assonale:** nuove subunità si **incorporano lungo** tutta la lunghezza del **filamento** (non solo alle estremità).
- Dopo il contatto col bersaglio, il **diametro dell'assone** può **aumentare fino a 5×**.
- Espressione dei geni dei neurofilamenti **controlla il diametro assonale** → **influenza la velocità di conduzione**.

SLA associata a **accumulo/assemblaggio anormale** di neurofilamenti in **soma** e **assoni** dei motoneuroni
→ **disturbo del trasporto** assonale

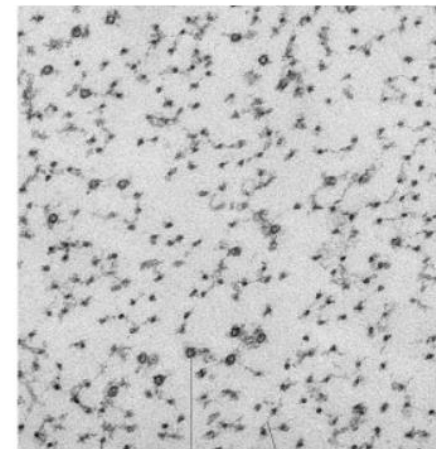


(A)



(B)

100 nm

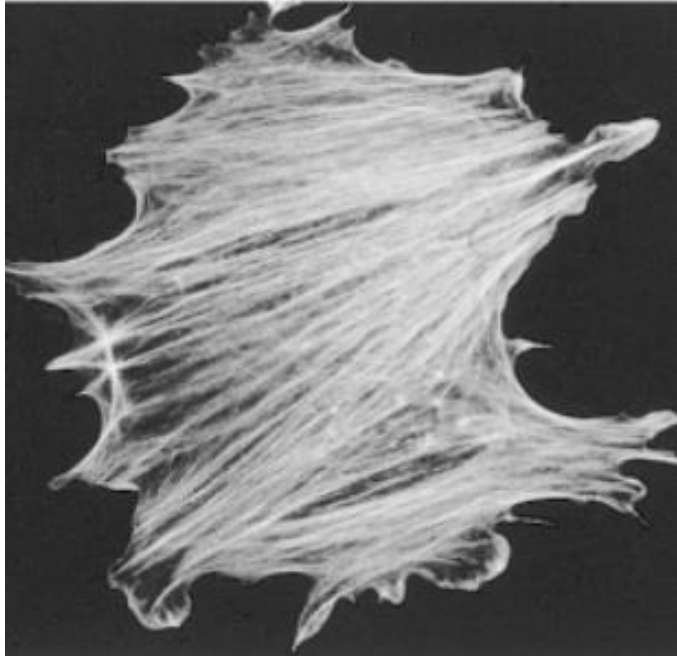


(C)

microtubulo
neurofilamenti
ponte proteico

250 nm

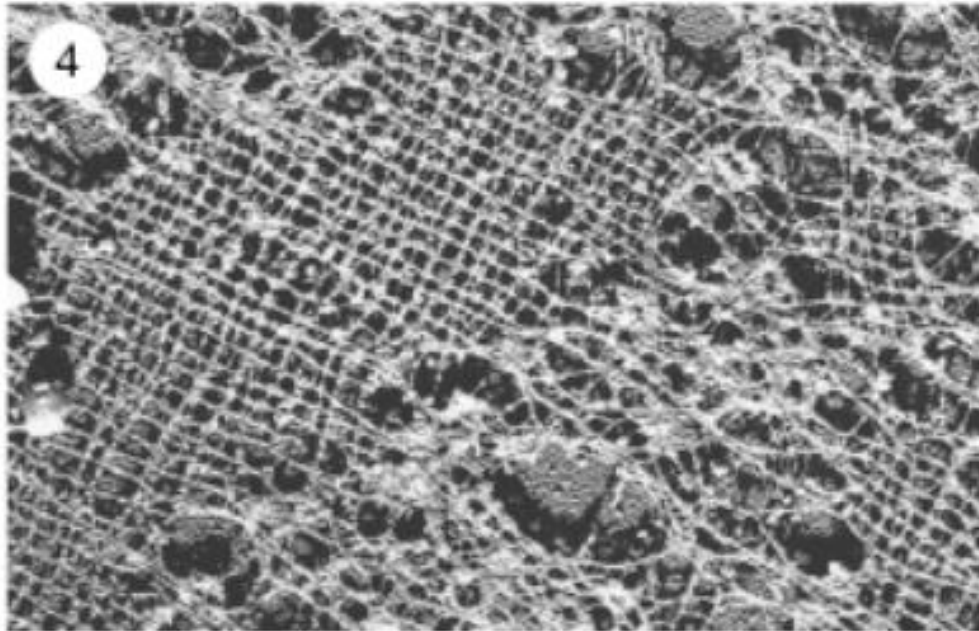
I Filamenti Intermedi: Vimentina-like



Famiglia “vimentina-like”: focus desmina

- **Desmina** (muscolo **scheletrico**, **cardiaco**, **liscio**) forma **scaffold** attorno ai **dischi Z** del sarcomere
- Topi **desmina-KO**: sviluppo muscolare iniziale **normale**, ma da adulti **anomalie** (fibre **mal allineate**, ecc.).
- Nell'uomo: mutazioni **desmina** → **distrofie muscolari**, **miocardiopatie** → ruolo chiave nella **stabilizzazione** della fibra.

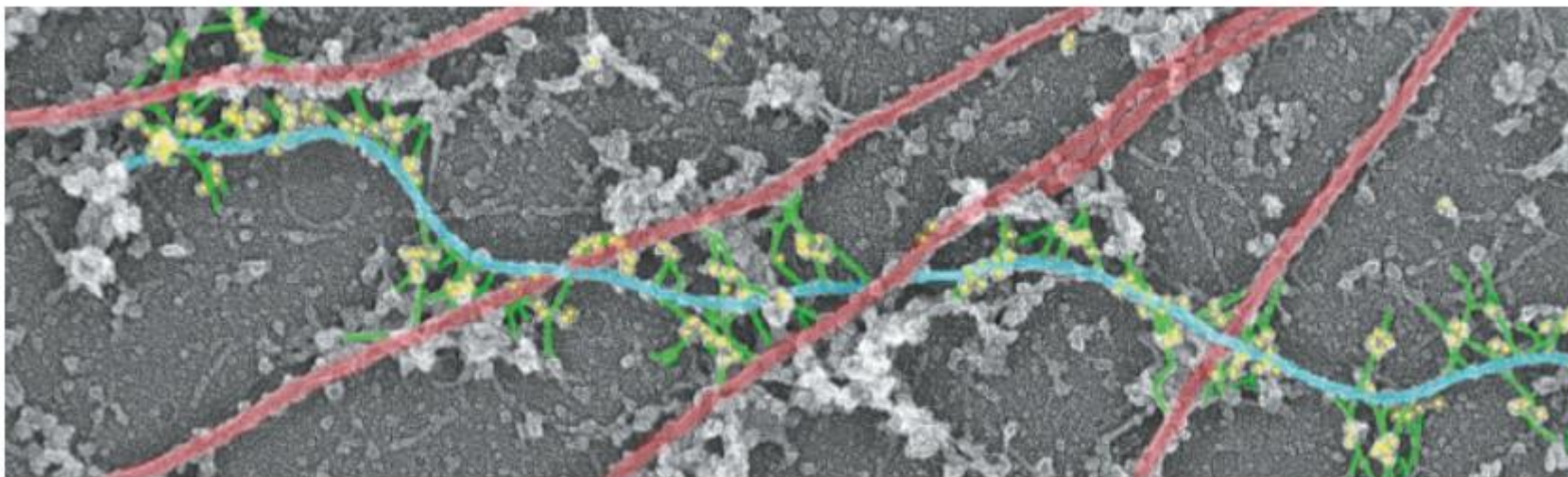
I Filamenti Intermedi: Lamine



Lamins & lamina nucleare: oltre la meccanica

- La **lamina nucleare**: **stabilità meccanica** del nucleo.
- **Lamins di tipo A** (+ altre proteine dell'involucro): **scaffold** per **trascrizione**, **organizzazione cromatina**, **trasduzione del segnale**.
- **Laminopatie**: per lo più **mutazioni della lamina A**, spesso **tessuto-specifiche**.
 - Fenotipi **scheletrici** e **cardiaci**: spiegabili con **involucro nucleare indebolito** → danno/morte cellulare.
 - Ulteriore meccanismo: **alterazioni patologiche** e **specifiche di tessuto** dell'**espressione genica**.

Plachine: ponte tra citoscheletri e giunzioni



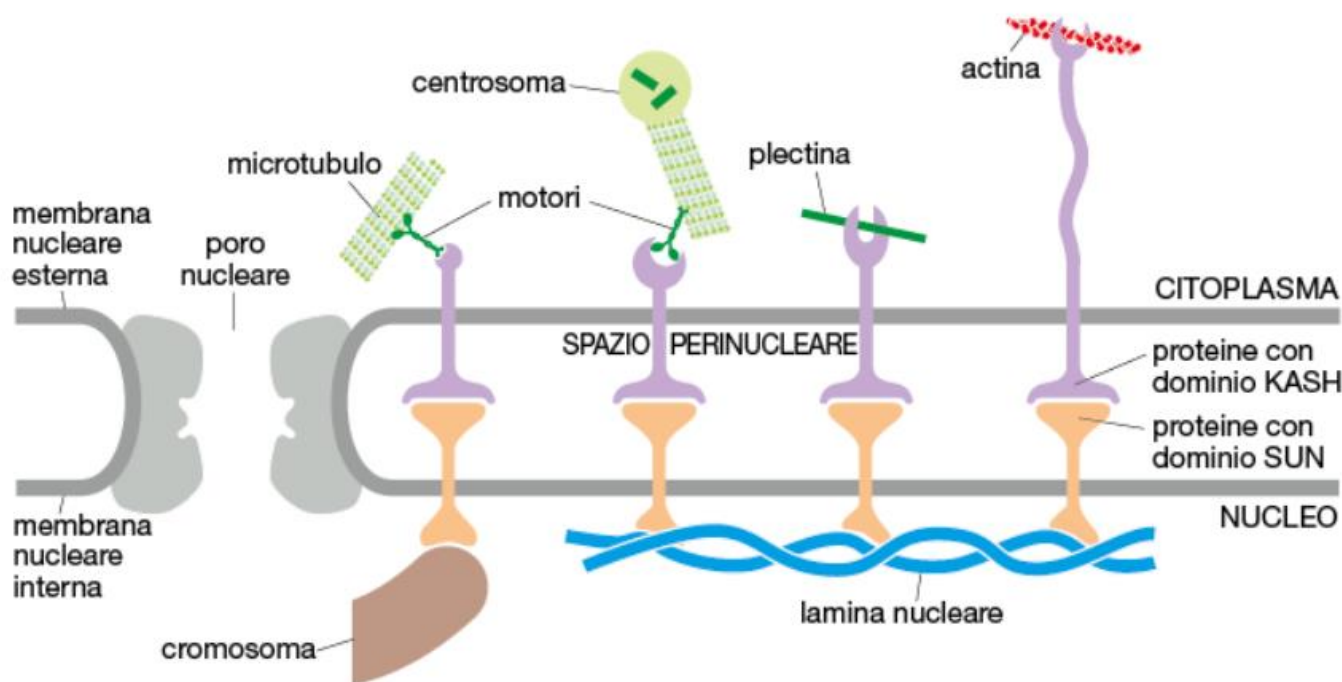
Plachine: ponte tra citoscheletri e giunzioni

- Le **plachine** sono **grandi proteine modulari** con **più domini** in grado di **connettere**:
 - filamenti del **citoscheletro** tra loro
 - e il citoscheletro a **complessi giunzionali** di membrana.
- **Funzione generale**: integrare reti di **filamenti intermedi (FI)**, **microtubuli (MT)** e **actina**, creando **continuità meccanica** intracellulare.

Plectina: evidenze genetiche e fenotipi

- **Mutazioni** nel gene **plectina** → malattia **combinata**:
 - **Epidermolisi bollosa** (rottura FI di **cheratina** nella pelle)
 - **Distrofia muscolare** (rottura FI di **desmina**)
 - **Neurodegenerazione** (rottura **neurofilamenti**).
- Conclusione: **la plectina può non essere essenziale per l'assemblaggio iniziale dei FI**, ma il suo **cross-linking** è **indispensabile** per **sopportare** gli **stress meccanici** tipici dei vertebrati.

Dalle plachine al nucleo: il ponte SUN-KASH



- **Plectina** e altre **plachine** si associano a complessi che **connettono** il **citoscheletro** al **nucleo**.
- Questi **ponti** attraversano l'**involucro nucleare** collegando **citoplasma** ↔ **lamina/cromosomi**.

Funzioni del ponte SUN-KASH

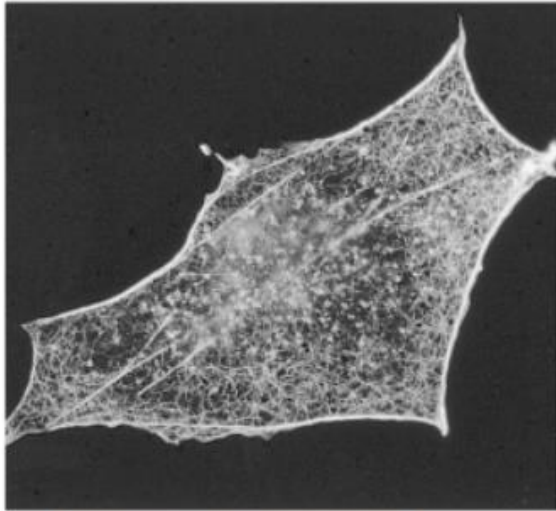
- **Accoppiamento meccanico** del **nucleo** al **citoscheletro**.
- **Movimenti cromosomici** in **meiosi**.
- **Posizionamento** di **nucleo** e **centrosoma**.
- **Migrazione nucleare**.
- **Organizzazione globale** del **citoscheletro**.

Complessi SUN-KASH

- **SUN** (membrana **nucleare interna**): si lega a **lamina nucleare** o **cromosomi**.
- **KASH** (membrana **nucleare esterna**):
 - si **lega direttamente** ai **filamenti di actina**
 - e **indirettamente** a **MT** e **FI** via **proteine motrici** e **plachine**.
- **SUN-KASH** si **agganciano tra loro** nel **lume** dell'involucro nucleare → **ponte continuo** nucleo-citoscheletro.
- Questi complessi sono spesso indicati come **LINC** (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton).

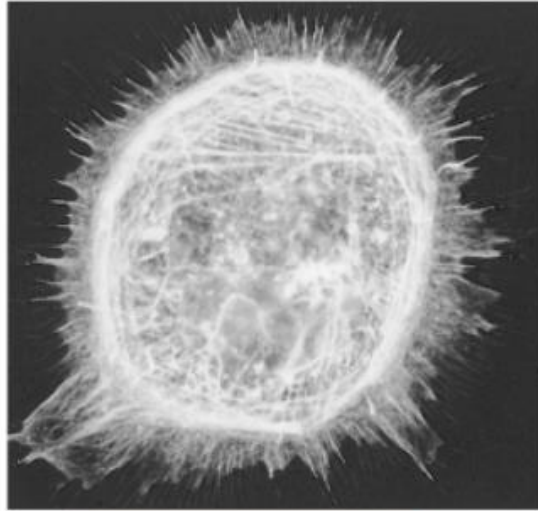
Rho GTPasi: interruttori di polarità

marcatura dell'actina

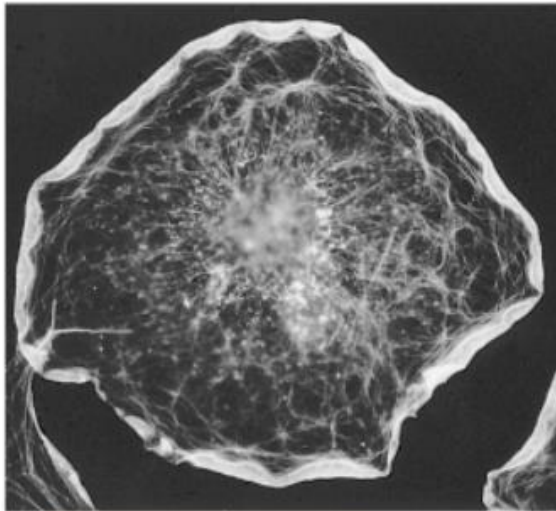


(A) CELLULA QUIESCENTE

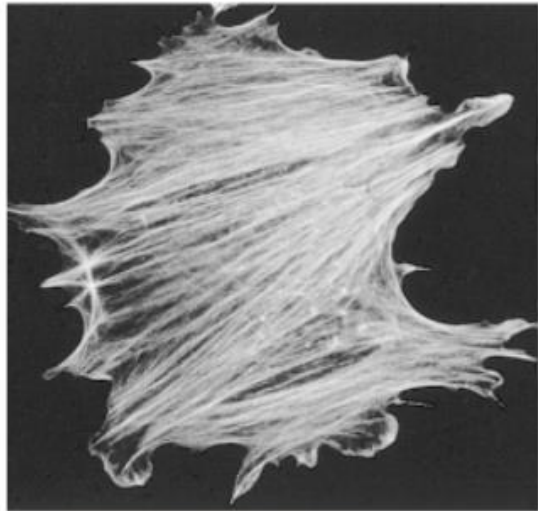
marcatura dell'actina



(B) ATTIVAZIONE DI Cdc42



(C) ATTIVAZIONE DI Rac



(D) ATTIVAZIONE DI Rho

20 μ m

La **polarità** controlla:

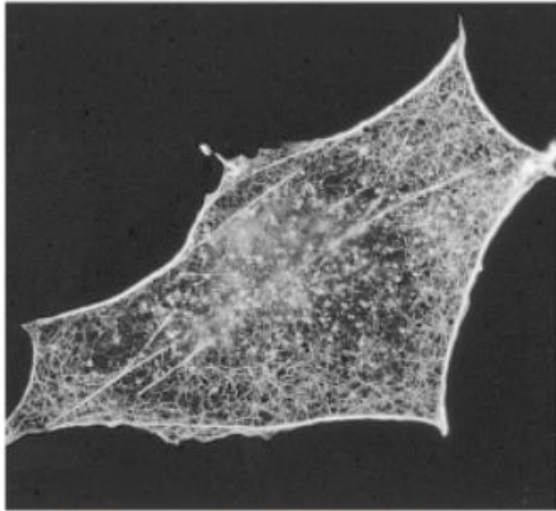
- **Direzione** di **secrezione** e **segnalazione**
- **Orientamento** della **divisione** cellulare
- **Percorso** di **migrazione**
- **Risposta** a **segnali extracellulari** o **stimoli intracellulari** → creazione di **domini di superficie** distinti
- **Coordinamento** con il **citoscheletro** per costruire **strutture diverse** in regioni diverse della cellula.
- Essenziale per: **divisioni orientate** nei tessuti e **sviluppo** coerente dell'organismo.

Rho GTPasi

- **Famiglia Rho** (piccole GTPasi monomeriche): **Cdc42**, **Rac**, **Rho**.
- **Interruttori GTP/GDP**:
 - **GEF**: attiva (GDP → **GTP**)
 - **GAP**: inattiva (↑ idrolisi **GTP** → **GDP**)
 - **GDI**: sequestra forma GDP e **inibisce lo scambio**.
- **Localizzazione sub-membrana**: punto di **convergenza** di segnali di polarità → **rimodellamento actina** locale.

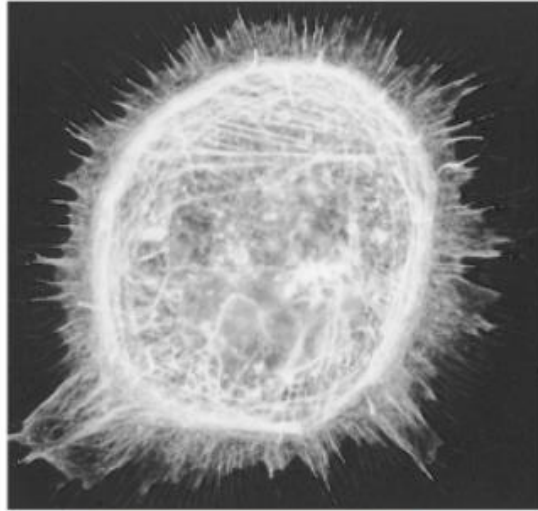
Rho GTPasi: Effetti morfologici in fibroblasti

marcatura dell'actina

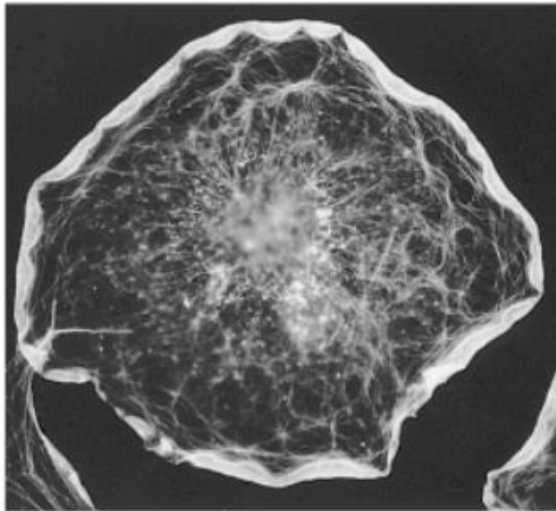


(A) CELLULA QUIESCENTE

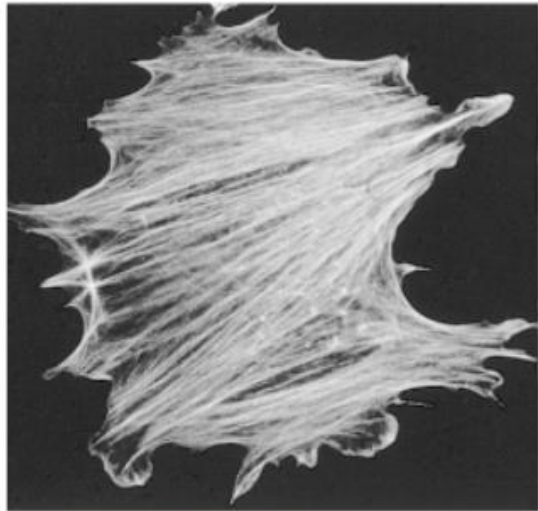
marcatura dell'actina



(B) ATTIVAZIONE DI Cdc42



(C) ATTIVAZIONE DI Rac



(D) ATTIVAZIONE DI Rho

20 μ m

- **Cdc42** attiva $\rightarrow$ **filopodi** lunghi, multipli.
- **Rac** attiva $\rightarrow$ **lamellipodi** periferici (protrusioni “a lenzuolo”).
- **Rho** attiva $\rightarrow$ **fibre di stress** (actina + **miosina II**) e **adesioni focali** (integrine + adattatori).
- Nota: in fisiologia **non** sono attive **ovunque**; agiscono con **precisa regolazione spatio-temporale** per generare **strutture polarizzate**.

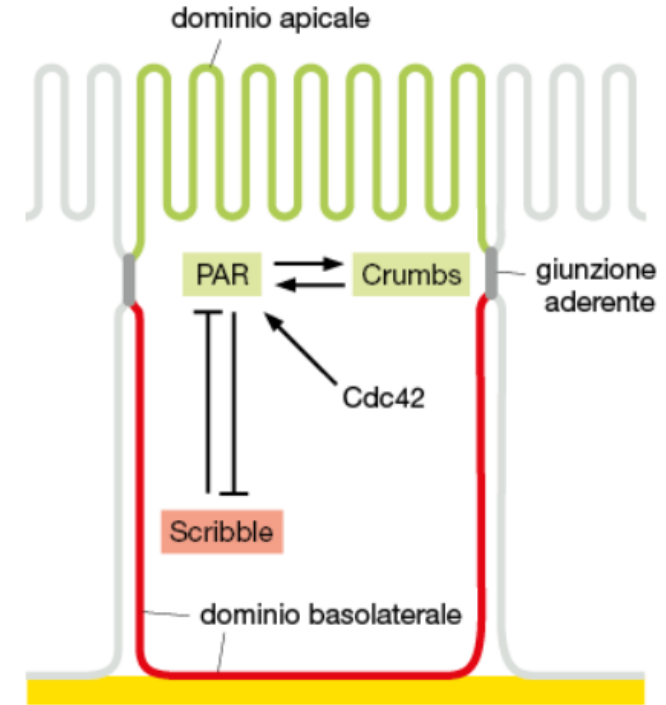
Cdc42: regolatore “master” della polarità

- **Cdc42** è la Rho-GTPasi **più conservata** e un **regolatore principale** della polarità in molti tipi cellulari.
- **Hub** che collega **sensori** di polarità $\rightarrow$ **effettori** del citoscheletro (soprattutto **actina**).

Polarità epiteliale: contesto e funzioni

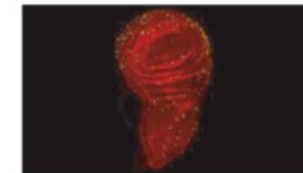
Polarità epiteliale: contesto e funzioni

- **Epiteli** = fogli di cellule strettamente connesse → **barriere selettive** (pelle↔esterno; lume intestinale↔tessuti).
- **Due domini** distinti: **Apicale** (verso esterno/lume) e **Basolaterale** (verso matrice + cellule adiacenti).
- **Innesco della polarità**: segnali da **cellule adiacenti** e **matrice extracellulare**.
- **Fase iniziale cruciale**: formazione delle **giunzioni cellula-cellula** che **separano** apicale vs basolaterale e **coesionano** il foglio

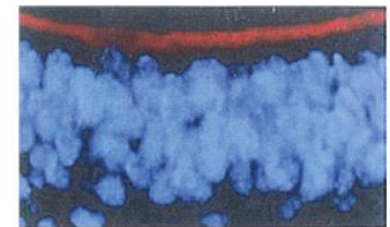


Origine delle conoscenze: Drosophila

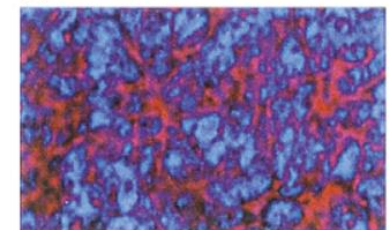
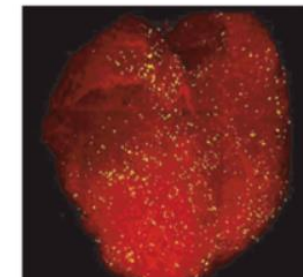
- Screening genetici hanno identificato **mutanti** con **difetti di polarità**.
- Regolatori chiave **apicali**: **Cdc42** e **proteine PAR** (anteriori).
- Due **categorie** aggiuntive:
 - **Crumbs** (apicale)
 - **Scribble** (basolaterale).



(B)

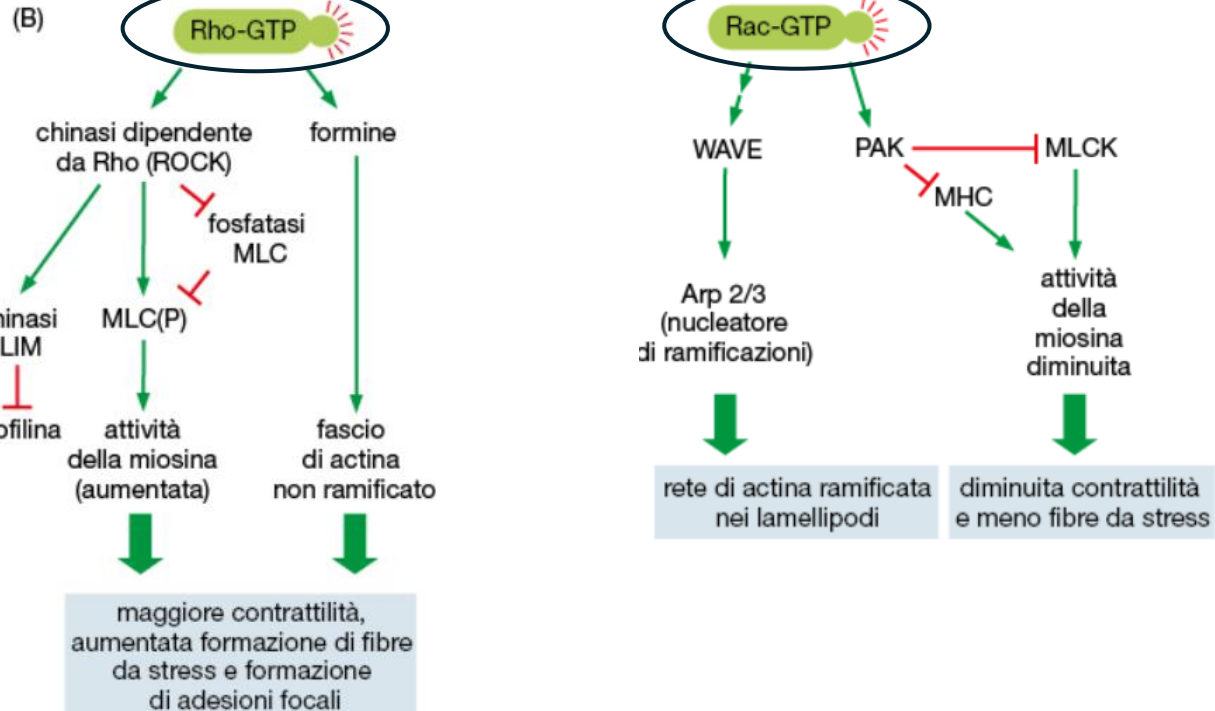
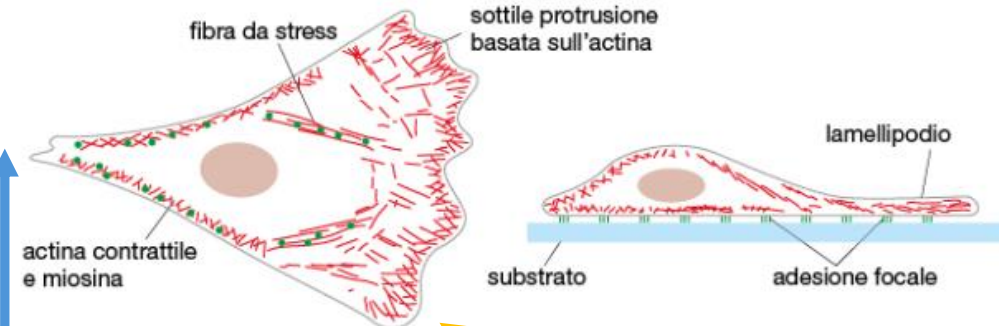


(D)



Polarità dinamica nella migrazione cellulare

(A) MIGRAZIONE DI UNA CELLULA MESENCHIMALE



Perché “dinamica”?

- Le cellule migranti richiedono **coordinazione a lunga distanza** tra **fronte** e **retro**.
- Il **citoscheletro** coordina **forma**, **organizzazione**, **meccanica** lungo tutta la cellula.
- Attori centrali: Rho-GTPasi** e **proteine di polarità** già introdotte.

Cdc42 imposta la direzione

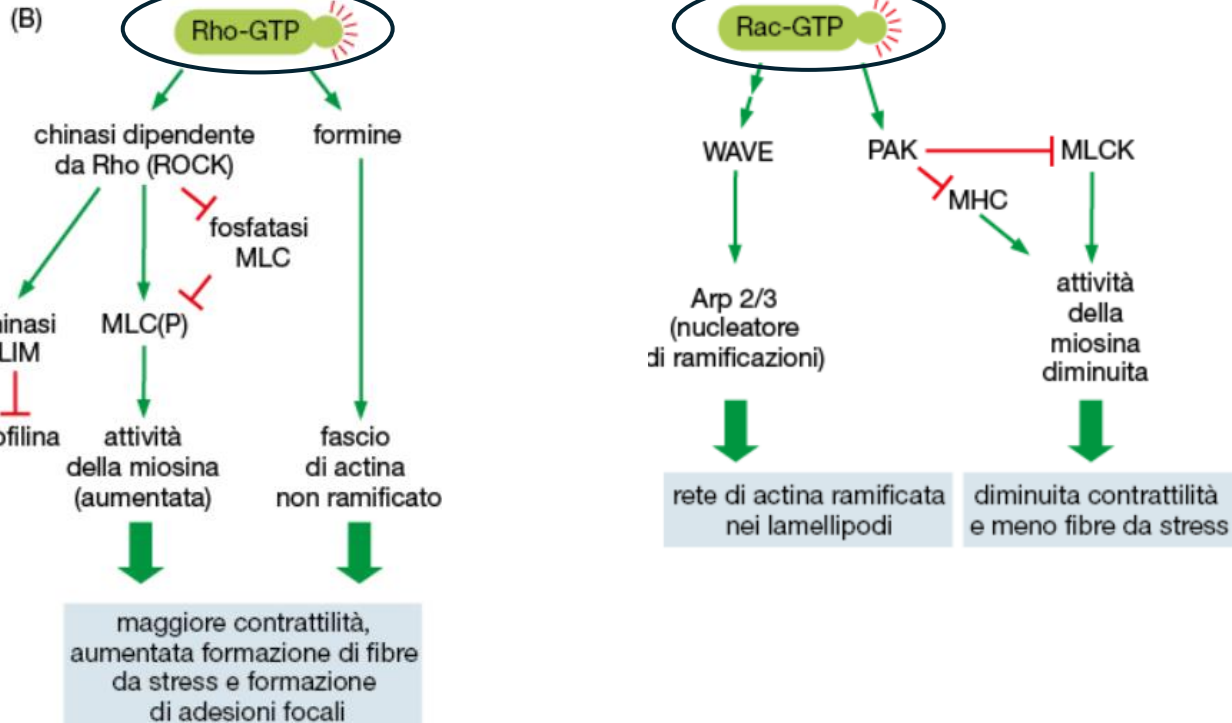
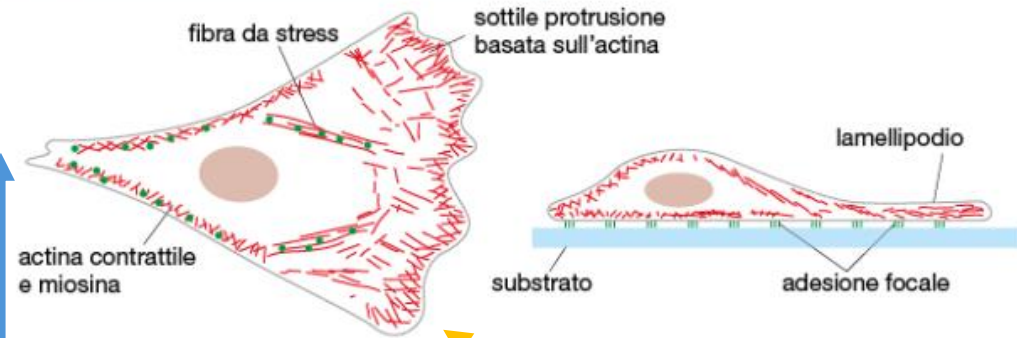
- Cdc42** stabilisce la **polarità globale** della cellula migrante.
- Cdc42** favorisce anche **filopodi** (sensing).

Antagonismo Rac ↔ Rho

- Rac** attivo **solo al fronte**; **Rho** prevale **al retro**.
- Antagonismo reciproco**:
- Esito: **fronte protrusivo** (Arp2/3/lamellipodi) vs **retro contrattile** (formine/ROCK/miosina II).

Polarità dinamica nella migrazione cellulare

(A) MIGRAZIONE DI UNA CELLULA MESENCHIMALE



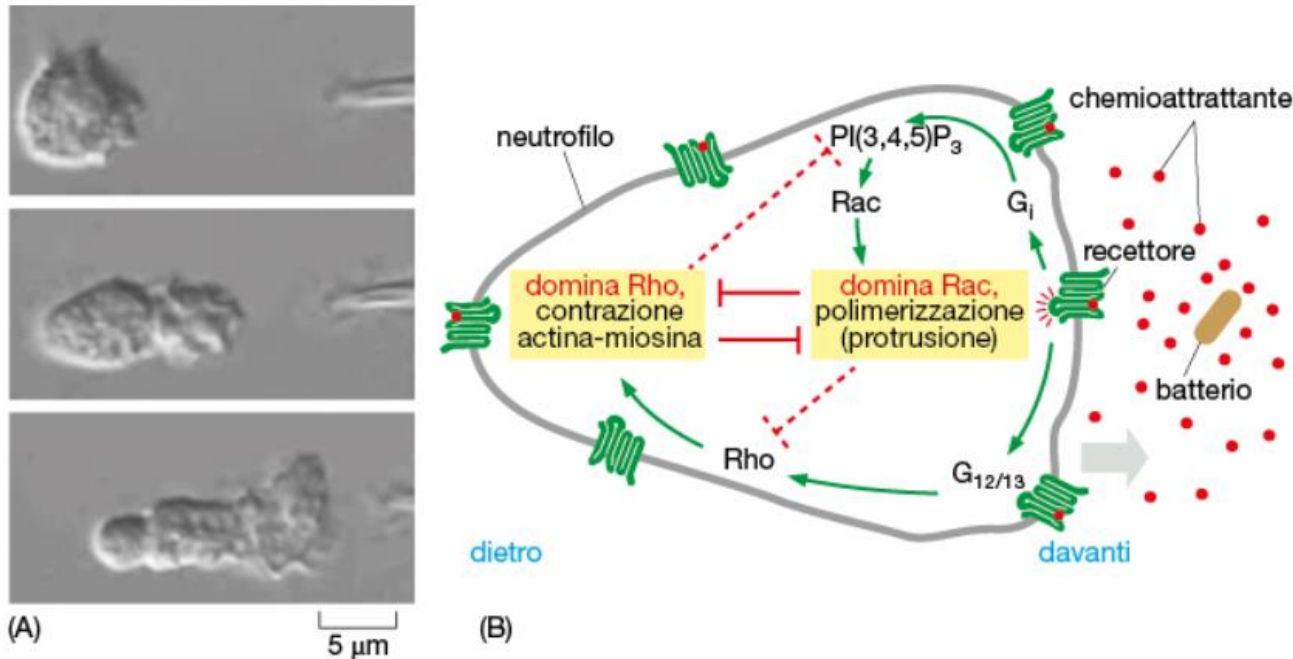
Fronte (leading edge): Rac → WAVE → Arp2/3

- **Rac-GTP:**
 - **recluta** WAVE alla **membrana** e **stabilizza** lo stato **aperto (attivo)**.
- **WAVE attiva** → **Arp2/3** nuclea **filamenti ramificati** sui lati di filamenti esistenti → **rete dendritica**.
- Output: **lamellipodi** che **spingono** il margine anteriore.

Retro (trailing edge): Rho → Formine & ROCK

- **Rho-GTP:**
 - **attiva formine** → **nucleazione + allungamento di cavi dritti** (non ramificati).
 - **attiva ROCK** → **attiva LIMK**, che **fosforila e inibisce cofilina** → **stabilizza** filamenti.
 - **ROCK inibisce la fosfatasi delle catene leggere della miosina** → **↑ fosforilazione MLC** → **↑ attività miosina II**.
- Output: **fibre da stress + adesioni focali** (tensione e trazione posteriori).

Chemiotassi: definizione e sensibilità del sensing



Chemiotassi = movimento **verso/lontano** da **sorgenti** di sostanze **diffusibili**.

- **Segnali esterni** → **recettori di membrana** → **attivano Rho-GTPasi** → **polarità + apparato motile**.
- **Neutrofili**: recettori per **peptidi N-formilati** (derivati da proteine batteriche con **N-formil-Met**).

GPCR → PI3K → PI(3,4,5)P₃ → Rac → Arp2/3

- **Ligando chemioattrattante** su **GPCR** → **PI3K** attiva
- **PI3K** genera **PI(3,4,5)P₃ (PIP₃)** → **attiva Rac**.
- **Rac-GTP** → **complesso Arp2/3** → **protrusione di lamellipodi** (rete densa ramificata F-actina)

Via parallela: Rho → contrattilità (miosina) e separazione fronte/retro

- Lo **stesso ligando** attiva un'altra via → **Rho-GTP** → ↑ **contrattilità** actomiosinica (miosina II).
- **Rho** domina **retro** → **retrazione + tensione**.
- Mantiene **polarità funzionale**: **spinta davanti**, **trazione dietro**

Il Neutrofilo: un Modello di Plasticità Citoscheletrica

I **neutrofili** sono cellule immunitarie che **inseguono e fagocitano** microrganismi patogeni.

Durante la migrazione estendono **sporgenze ricche di filamenti di actina di nuova polimerizzazione**; si muovono in modo **polarizzato** verso la fonte di attrazione (es. batteri).

Quando la preda cambia direzione il neutrofilo **disassembla e riassembla rapidamente** la rete di actina; riesce a **invertire polarità e direzione** in pochi secondi.

Questo continuo ciclo di **disassemblaggio, nuova polimerizzazione, rimodellamento**, permette al neutrofilo di:

- cambiare direzione in **pochi minuti**;
- **inseguire attivamente** microrganismi mobili;
- mantenere un **movimento coordinato e adattivo**.

