

**Corso di laurea magistrale in
BIOTECNOLOGIE DELLA RIPRODUZIONE**

UNIVERSITA'
DEGLI STUDI
DI **TERAMO**

Corso di recupero
**Fisiologia cellulare/
Laboratorio di colture
cellulari**

Prof.ssa Luisa Gioia

II CITOSCHELETRO

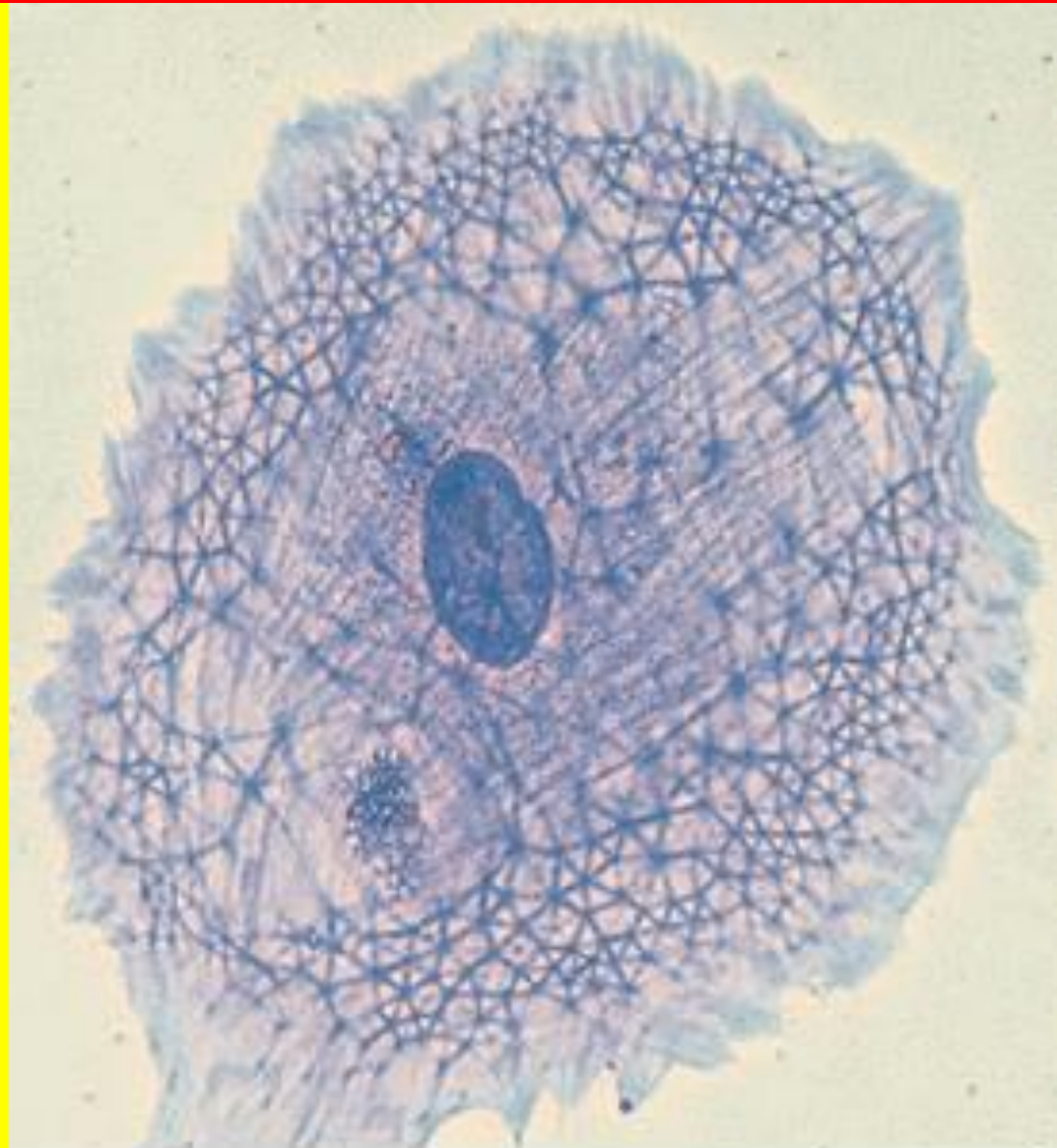
E' presente solo nelle cellule eucariotiche

E' una complessa struttura proteica 3D di filamenti e tubuli interconnessi che si estende nel citosol, dal nucleo alla faccia interna della membrana plasmatica.

Fornisce struttura architettonica e sostegno alle cellule eucariotiche che possono così assumere e mantenere una forma complessa.

Conferisce alle cellule un elevato livello di organizzazione interna.

Fornisce alle cellule contrattilità.



10 μm

Funzioni del CITOSCHELETRO

- organizzazione spaziale del citoplasma
- sostegno alla m. plasmatica
- forma e movimento della cellula
- traffico intracellulare di organelli e molecole
- resistenza della cellula agli stress meccanici
- divisione cellulare: segregazione dei cromosomi e citochinesi
- movimento delle cellule sul substrato
- contrazione muscolare

**MOVIMENTI INTRACELLULARI E
MOTILITA' DELLE CELLULE
STESSE (spz, globuli bianchi, neuroni)**

**Il citoscheletro è anche
strettamente associato con i
processi di **SEGNALAZIONE** e
di **ADESIONE CELLULARE****

CONTATTI FOCALI:

tipo specializzato di
attacchi tra i filamenti di
actina e MEC che
permette alle cellule di
esercitare una trazione sul
substrato a cui sono
attaccate

STRESS FIBERS: consistono di fasci contrattili di
filamenti di actina e di miosina II che terminano in
corrispondenza della membrana plasmatica dove si
localizzano gruppi di proteine di adesione
transmembrana (*integrine*)

Funzioni del CITOSCHELETRO

- organizzazione spaziale del citoplasma
- sostegno alla m. plasmatica
- forma e movimento della cellula
- traffico intracellulare di organelli e molecole
- resistenza della cellula agli stress meccanici
- divisione cellulare: segregazione dei cromosomi e citochinesi
- movimento delle cellule sul substrato
- contrazione muscolare

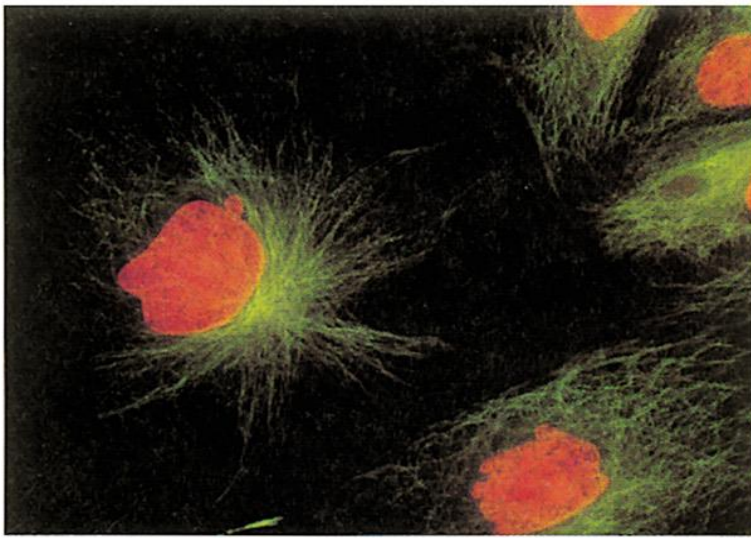
MATRICE EXTRACELLULARE (MEC)

Supporto, protezione, riserve energetiche, ancoraggio per cellule e tessuti

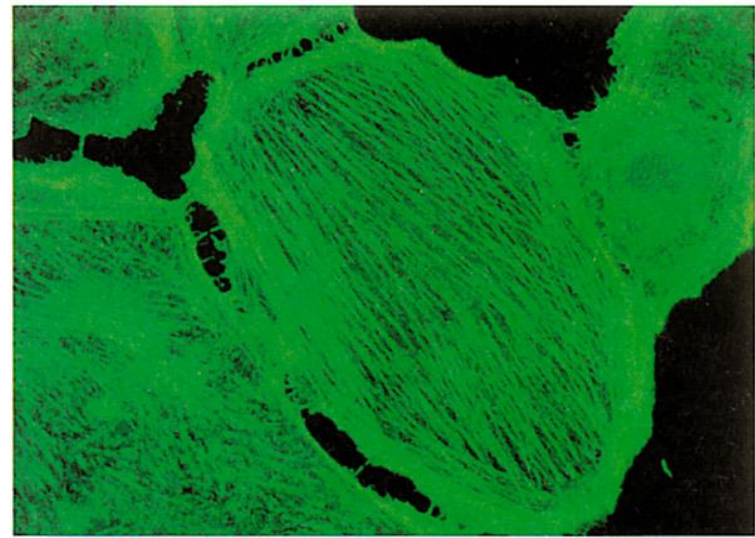
MOLECOLE DI ADESIONE

- Adesione cellula-cellula e cellula-strutture circostanti
- Integrità e comunicazione tissutale

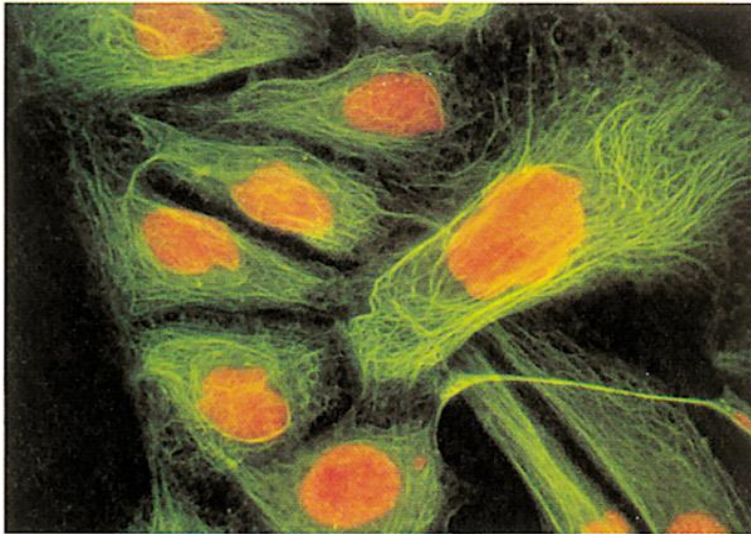
MOVIMENTI INTRACELLULARI E MOTILITA' DELLE CELLULE STESSE (spz, globuli bianchi, neuroni)



(a) Microtubuli



(b) Microfilamenti



(c) Filamenti intermedi

5 μ m

I principali **tipi di fibre** che costituiscono il citoscheletro sono:

- **MICROFILAMENTI**
- **MICROTUBULI**
- **FILAMENTI INTERMEDI**

Vengono visualizzati nelle cellule mediante microscopia ottica in **fluorescenza** usando specifiche sonde fluorescenti

Le lunghe fibre del citoscheletro sono strutture polimeriche

I principali **tipi di fibre** che costituiscono il citoscheletro sono:

- **MICROFILAMENTI**
- **MICROTUBULI**
- **FILAMENTI INTERMEDI**

ciascun tipo di filamenti ha proprietà meccaniche diverse e una dinamica diversa, ma condividono tutti alcuni principi fondamentali

Composti da subunità diverse che conferiscono le proprietà al filamento finale

-Strutture dinamiche e adattabili

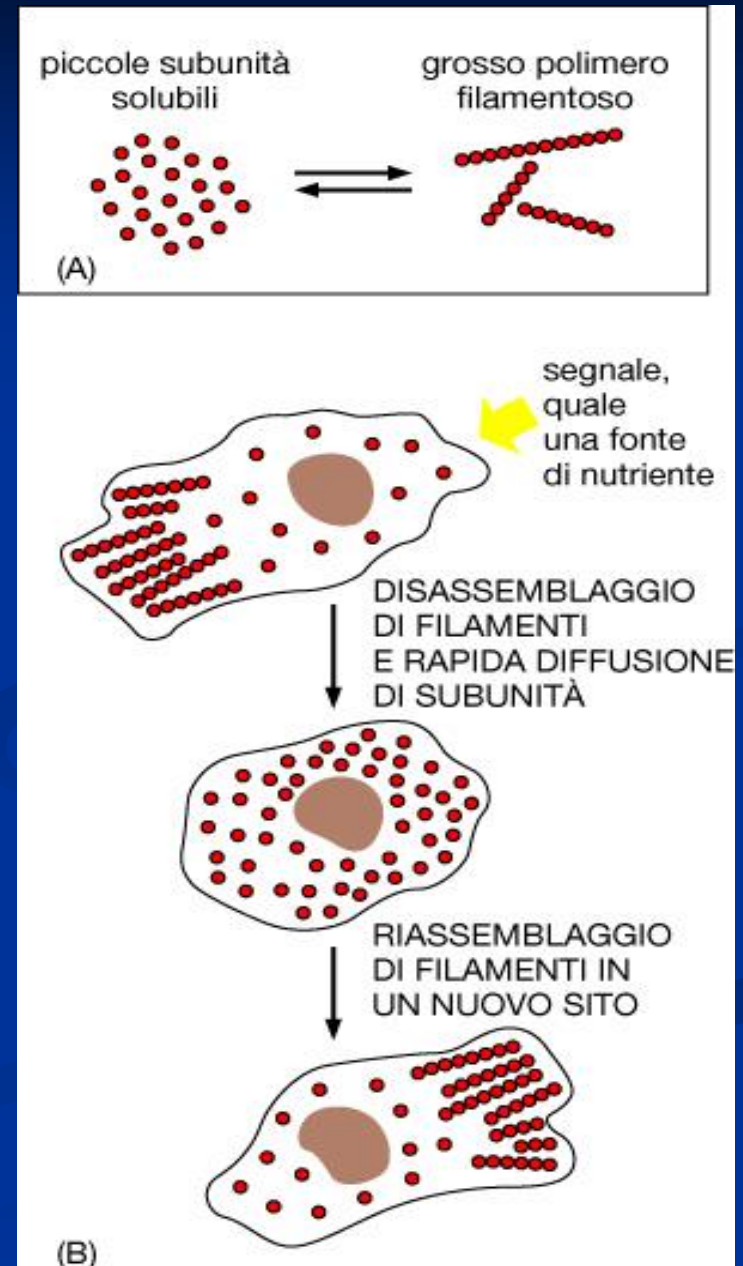
-Cambiano o persistono per periodi temporali variabili

Le fibre del citoscheletro non funzionano da sole, ma associate a **PROTEINE ACCESSORIE**:

- sono essenziali sia per l'assemblaggio controllato che per il funzionamento dei filamenti citoscheletrici
- comprendono i *motori proteici* che muovono gli organelli o i filamenti stessi.

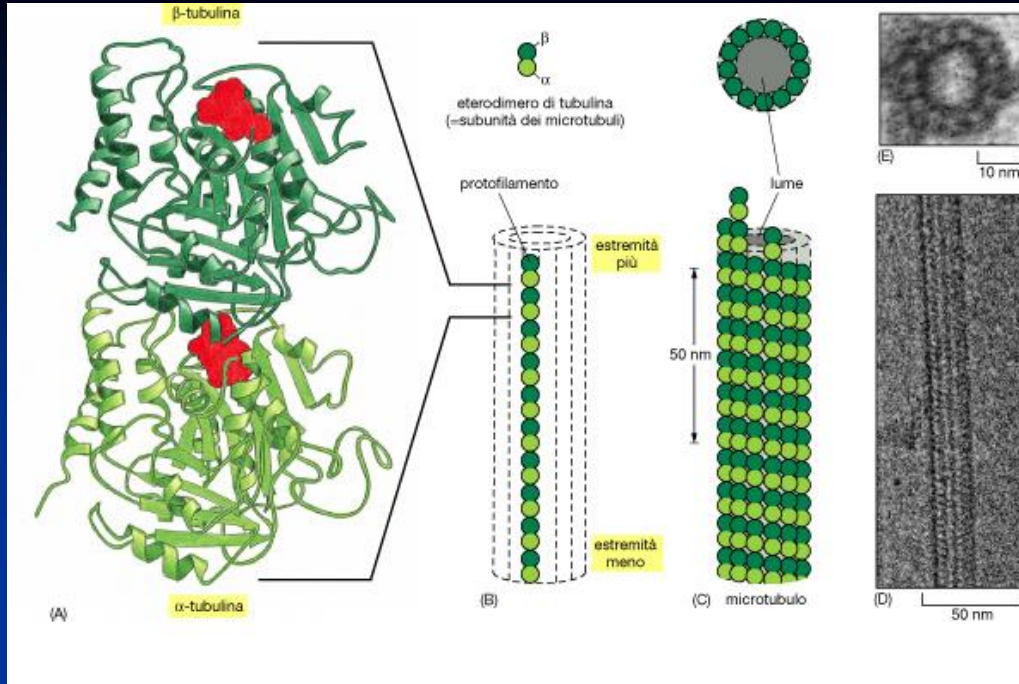
Ciascun tipo di filamento è formato da subunità proteiche più piccole

Le cellule possono subire **rapide riorganizzazioni strutturali** disassemblando filamenti in un sito e riassembleandoli in un altro sito lontano



*Struttura di:
una subunità del microtubulo
di un filamento del microtubulo
e di un microtubulo*

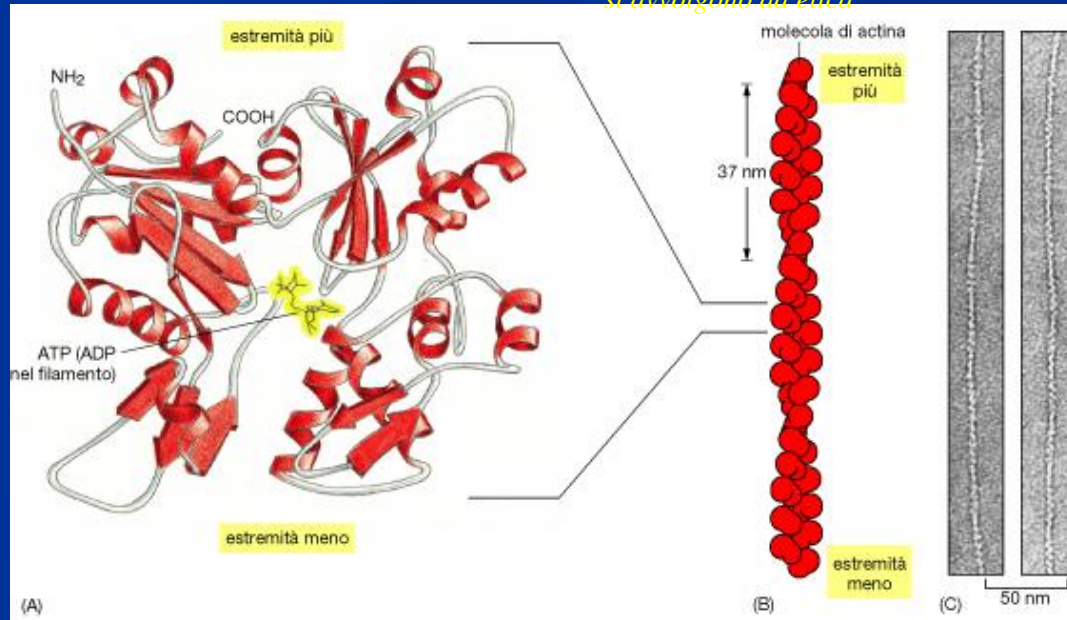
Le subunità di actina e tubulina si assemblano testa-coda creando filamenti che sono polari



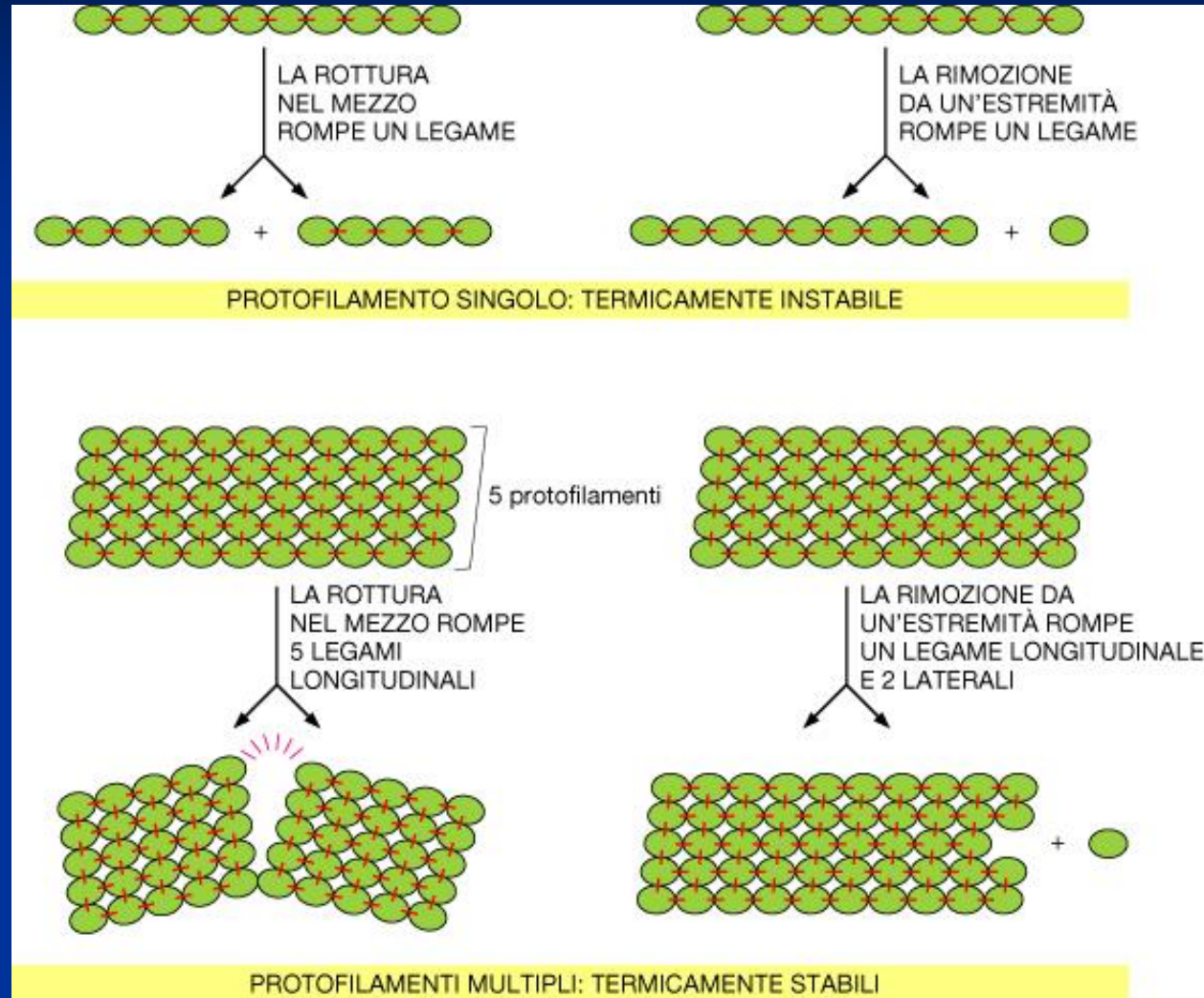
Filamento di actina: 2 protofilamenti tenuti insieme da contatti laterali che si avvolgono ad elica

*Struttura di:
un monomero di actina
e di un filamento di actina*

Il monomero di actina ha un ATP attaccato in una profonda fessura al centro della molecola

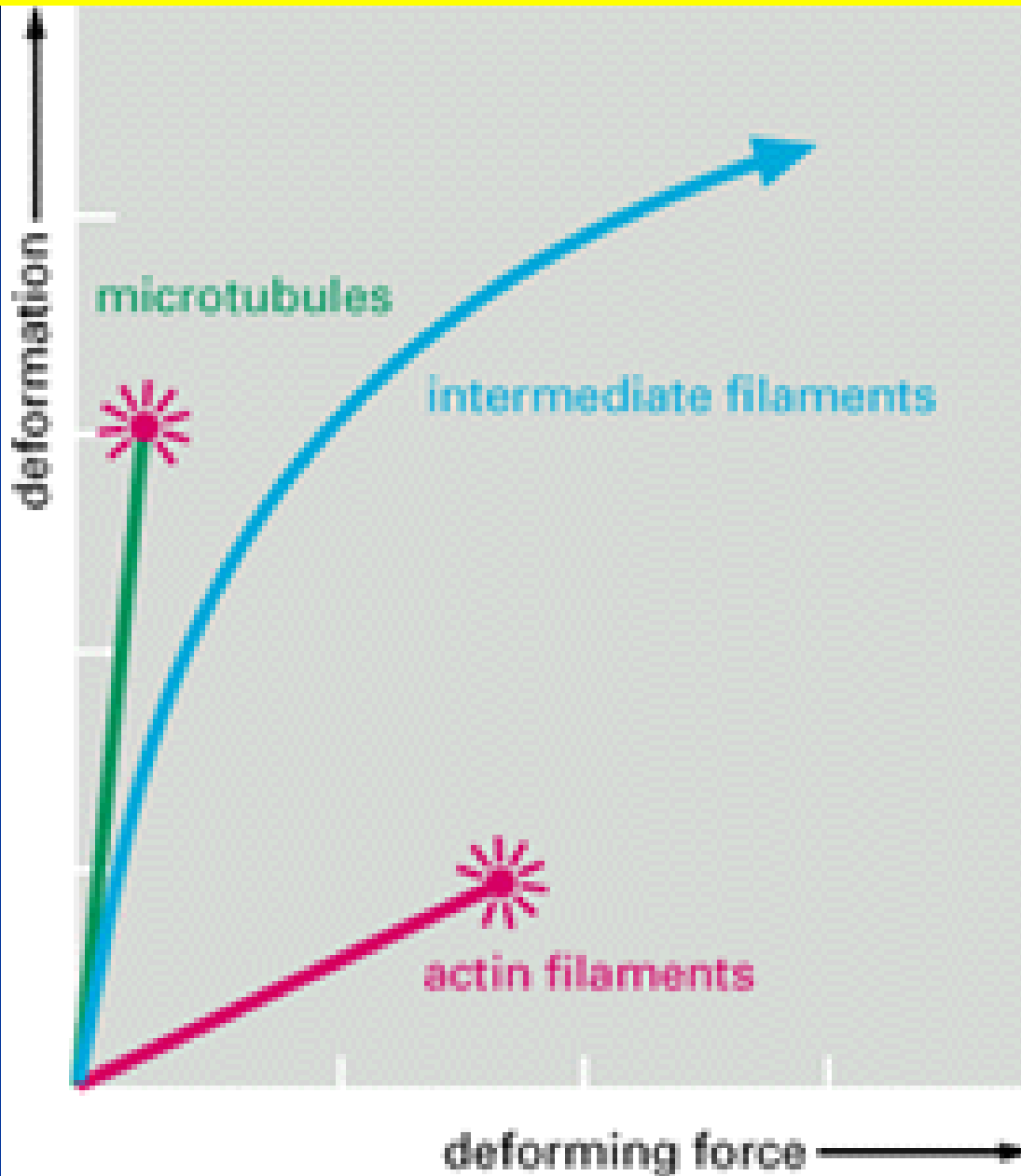


I polimeri del citoscheletro combinano forza con adattabilità perché sono costituiti da **protofilamenti multipli** che si associano fra loro lateralmente



interazioni idrofobiche e legami non covalenti deboli

Proprietà meccaniche dei polimeri di actina, tubulina e vimentina: *reticoli sottoposti a tensione in un viscosimetro*



I **filamenti intermedi** si deformano facilmente, ma sopportano anche notevoli tensioni e stiramenti.

I **microfilamenti** ed i **microtubuli** sono invece più rigidi e meno deformabili.

La polimerizzazione dei filamenti può essere alterata da sostanze chimiche

Sostanze che influenzano i Fil. Actina e i MT

ACTINA

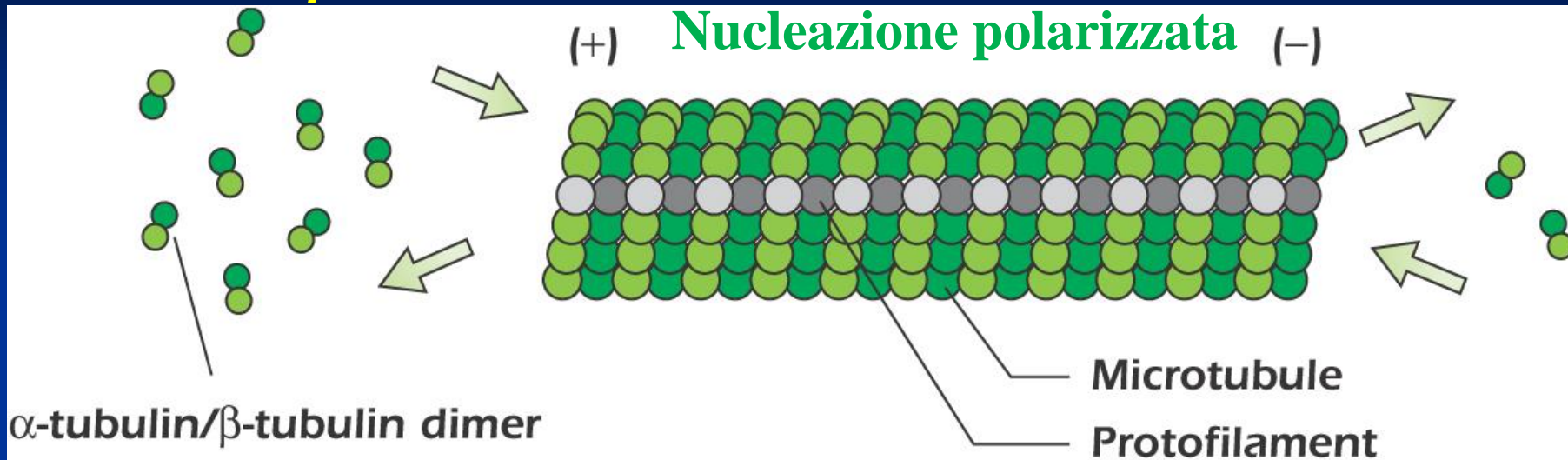
Falloidina	Si lega ai filamenti e li stabilizza
Citocalasina	Incappuccia le estremità + dei filamenti
Latrunculina	Si lega alle subunità e ne impedisce la polimerizzazione

MICROTUBULI

Taxolo	Si lega ai MT stabilizzandoli
Colchicina, Colcemid	Si lega alle subunità e ne impedisce la polimerizzazione
Vinblastina, Vincristina	Si lega alle subunità e ne impedisce la polimerizzazione
Nocodazolo	Si lega alle subunità e ne impedisce la polimerizzazione

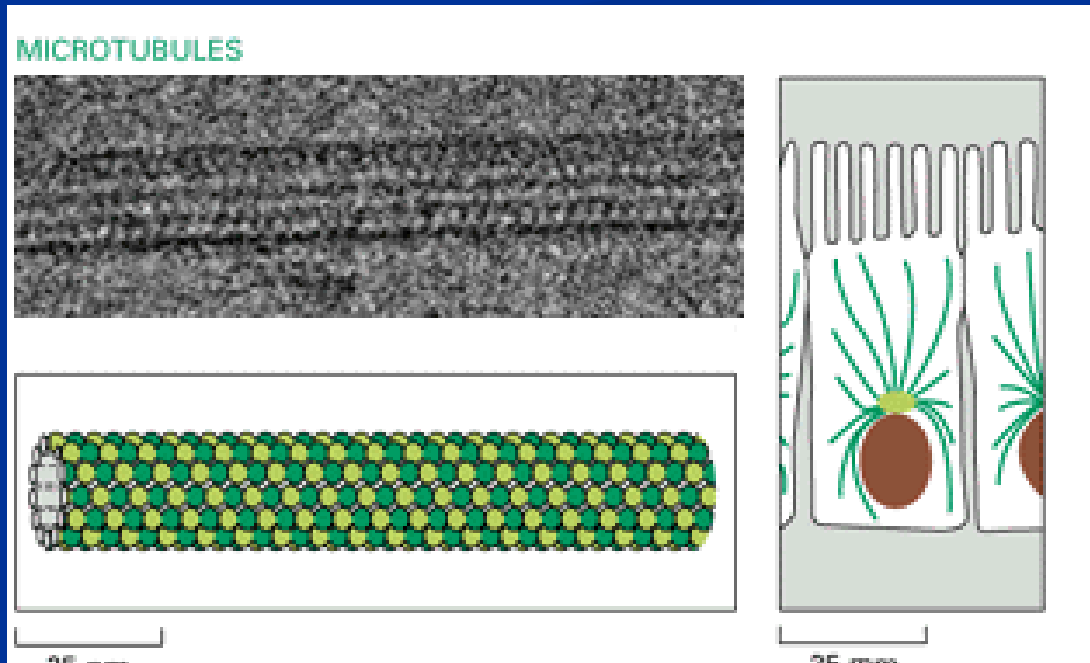
Dimeri di
TUBULINA:
subunità: α e β

MT

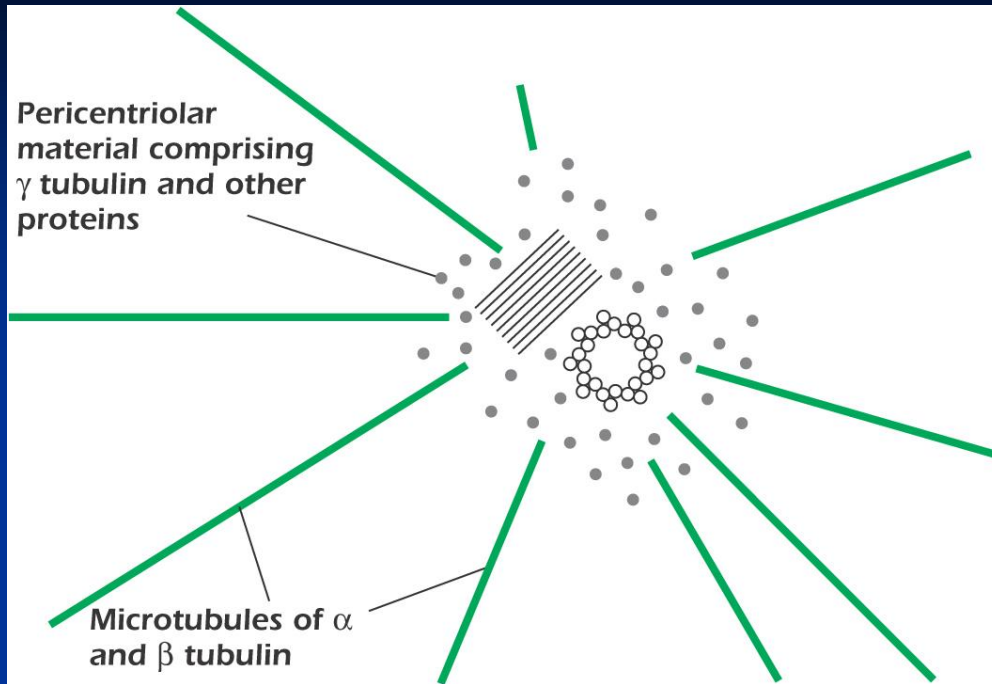


MT: lunghi cilindri cavi,
rigidi e robusti, composti da
subunità di **TUBULINA**.

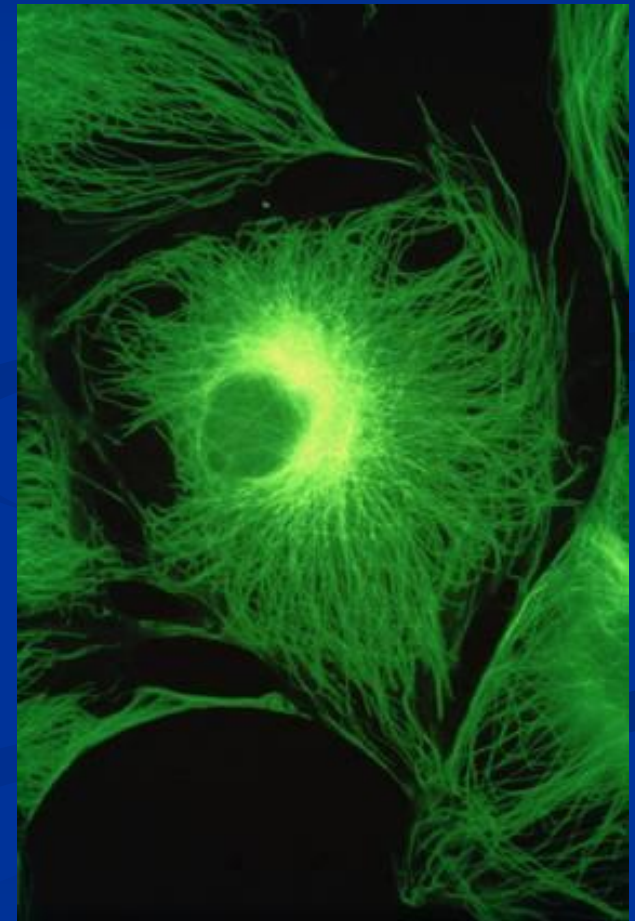
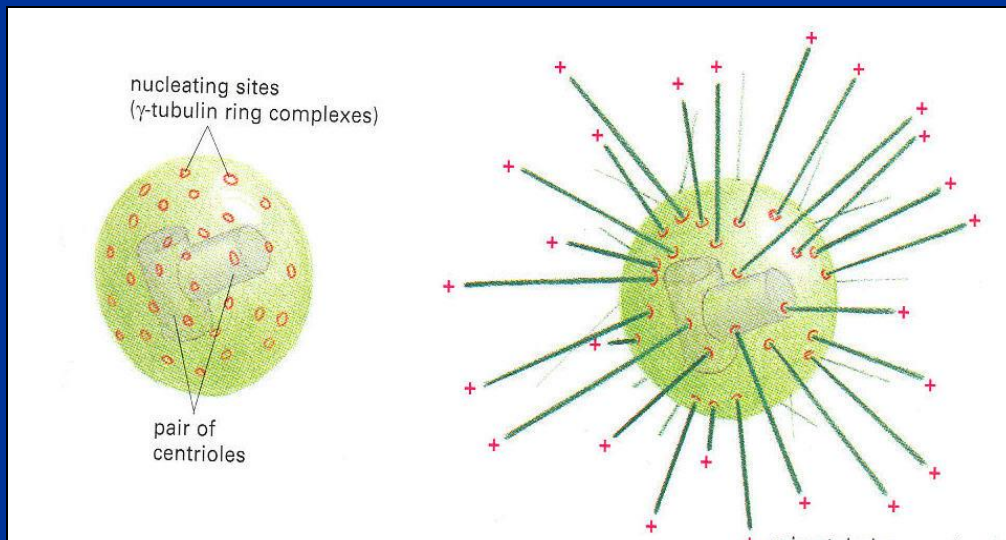
Hanno diametro esterno di 25
nm e sono **molto più rigidi**
dei filamenti di actina



CENTROSOMA (MTOC)

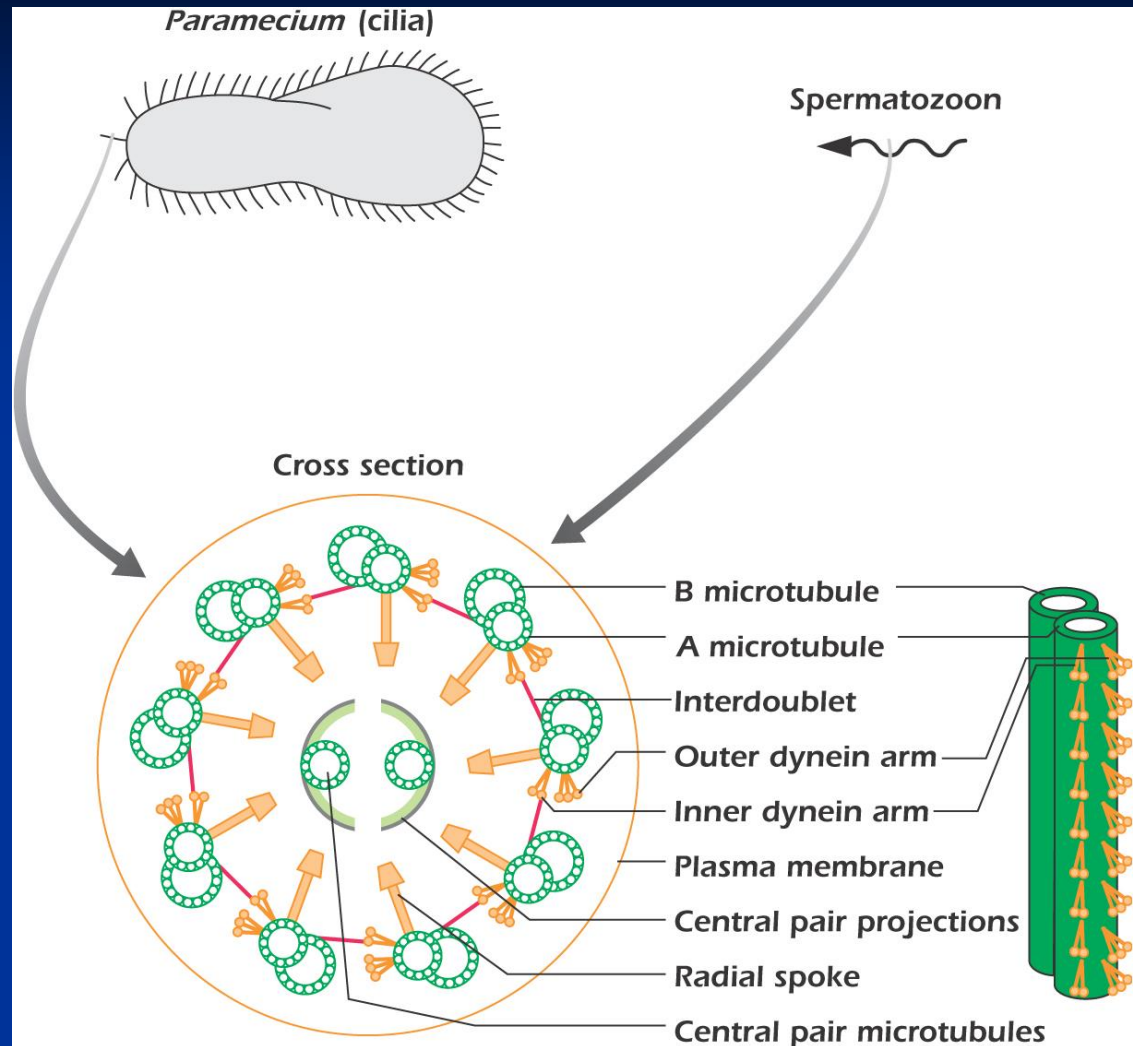


MT originano da una struttura detta **CENTROSOMA** (**MicroTubule Organizing Center**) saldamente collocata in corrispondenza del nucleo, fatta da una **coppia di centrioli** (stessa organizzazione simmetrica di ciglia e flagelli)

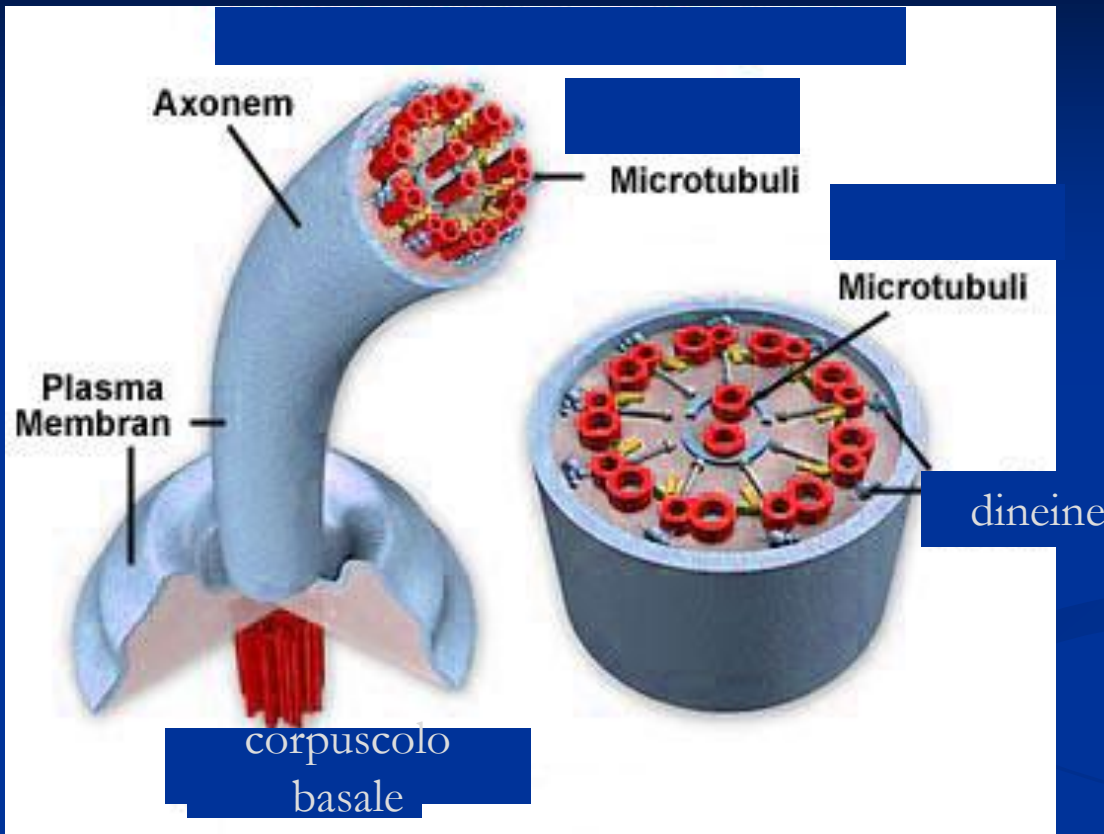


CENTRIOLI : hanno la stessa organizzazione di CIGLIA e FLAGELLI: **9 coppie di MT** poste ad anello intorno **una coppia centrale di MT**.

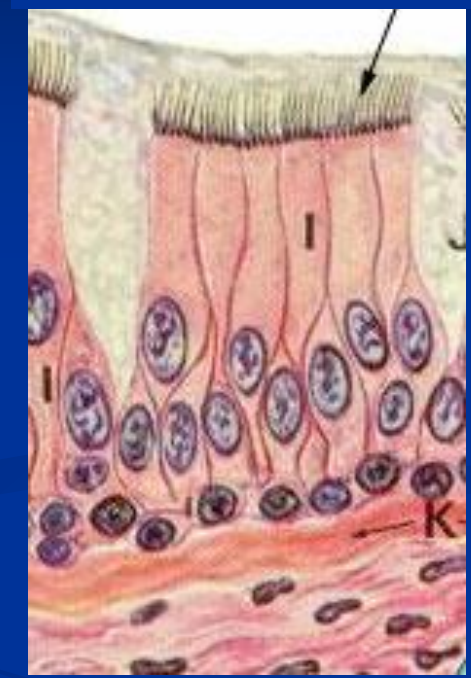
Attaccate alle coppie periferiche ci sono **proteine motrici: dineine**



CIGLIA e FLAGELLI hanno struttura comune e si differenziano solo per le dimensioni



Epitelio: cellule ciliate

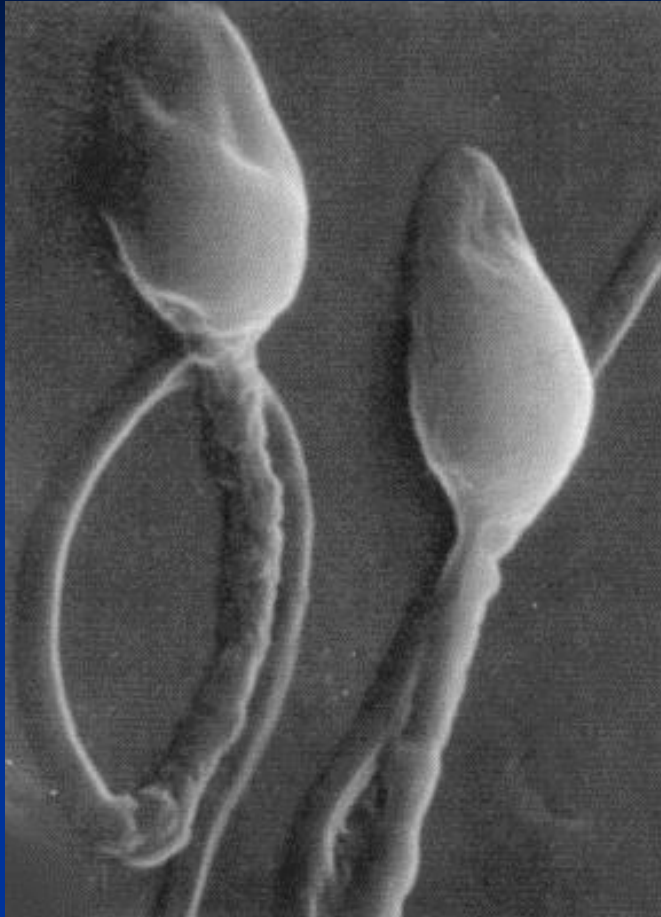


corpuscolo basale: ha organizzazione simile ai centrioli (parete fatta da 9 triplette di MT); impianto per l'organizzazione di ciglia e flagelli

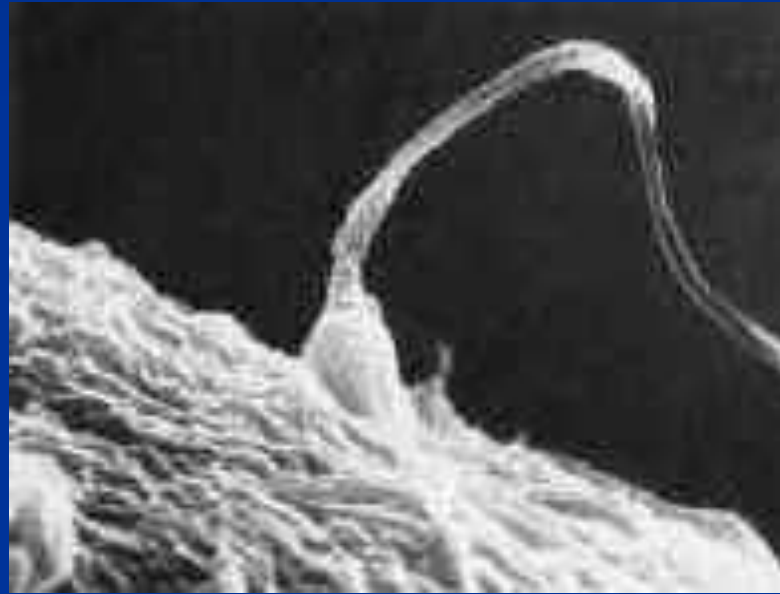
9 coppie di MT disposti radialmente e **1 coppia** di MT centrali, il tutto unito da **proteine motrici** trasversali (DINEINE)

le cellule epiteliali che tappezzano le vie respiratorie hanno il compito di "spazzare" strati di muco, assieme a particelle di polvere inalate, verso la bocca dove il tutto viene inghiottito ed eliminato

MT: formano il FLAGELLO del gamete maschile



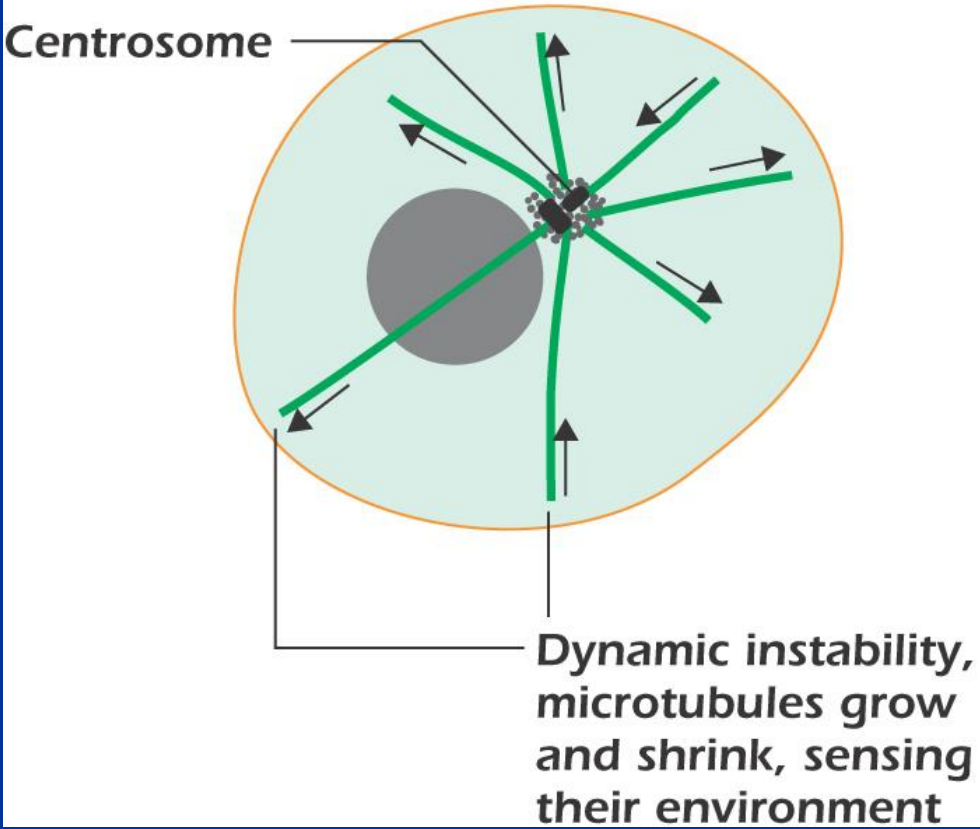
spermatozoi



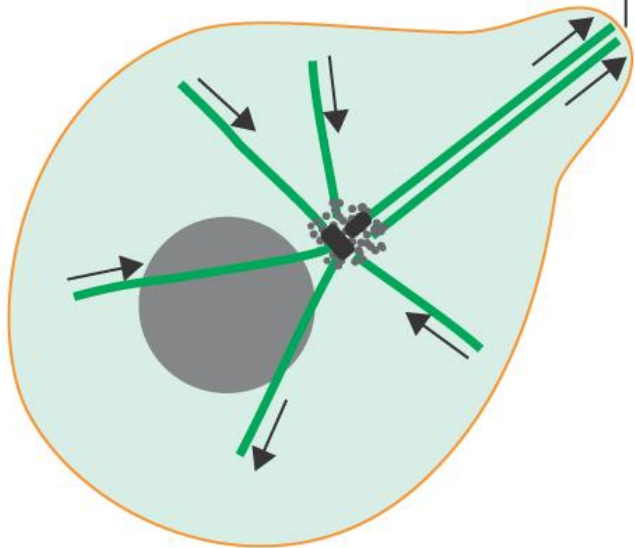
La nucleazione dei filamenti in siti specifici è catalizzata da proteine speciali che determinano la posizione in cui si assemblano nuovi filamenti del citoscheletro

MT

Processo dinamico crescita/disassemblaggio



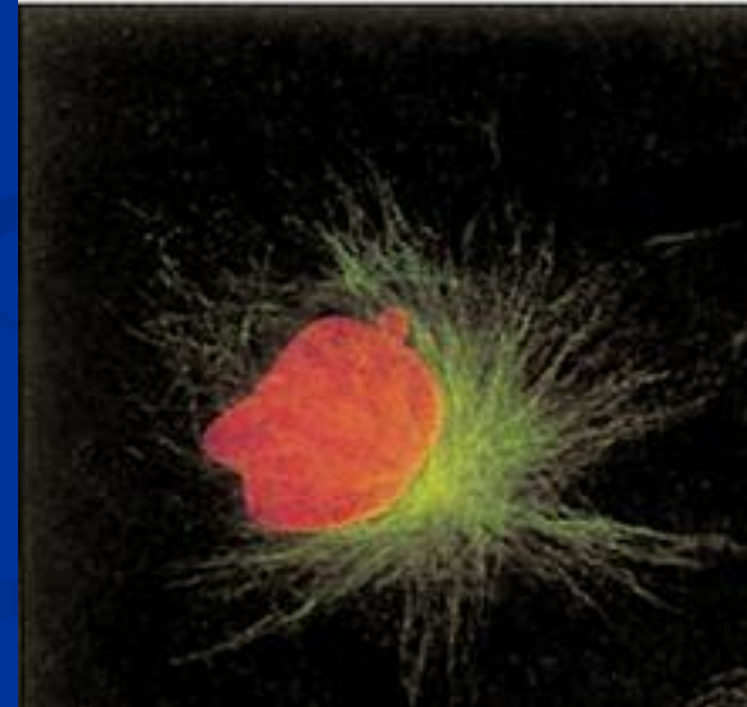
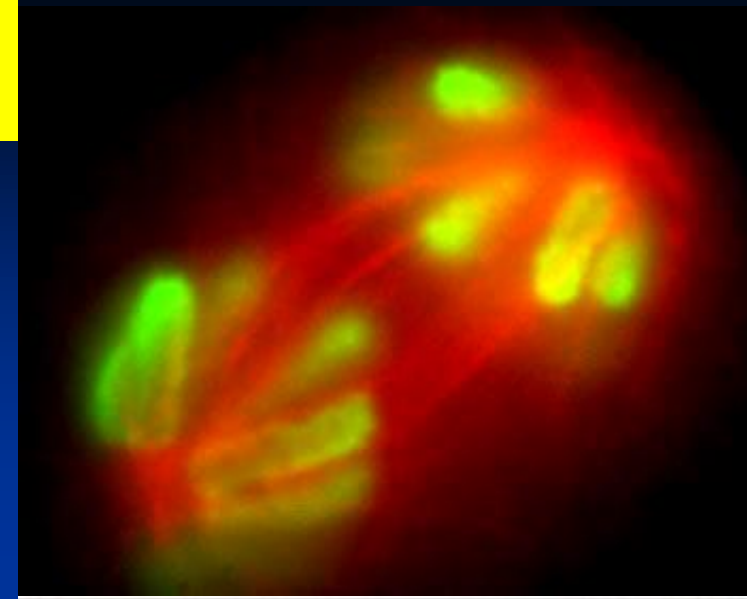
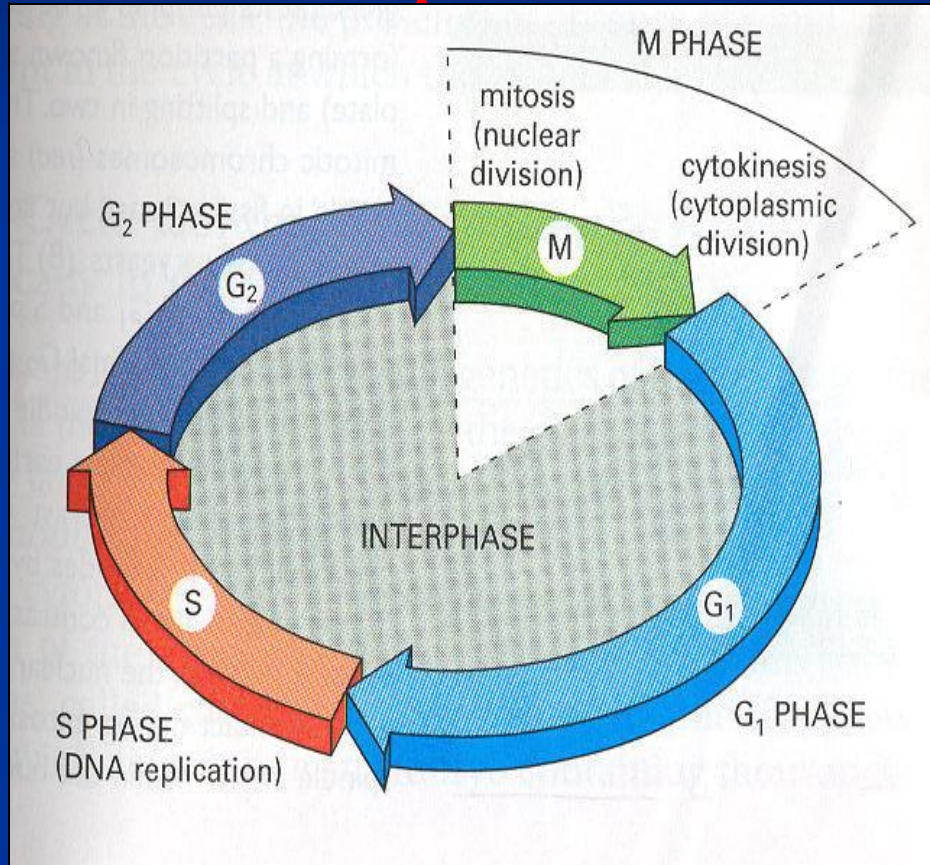
The ends of these two microtubules have been captured and stabilized. Now, they do not shrink but only grow, altering the cell shape



From: *Cell Biology: a short course*. III Ed. SR Bolsover et al.

Ruolo fondamentale dei **MT** durante la divisione cellulare:

FASE M: assemblaggio dei MT in un fuso mitotico bipolare

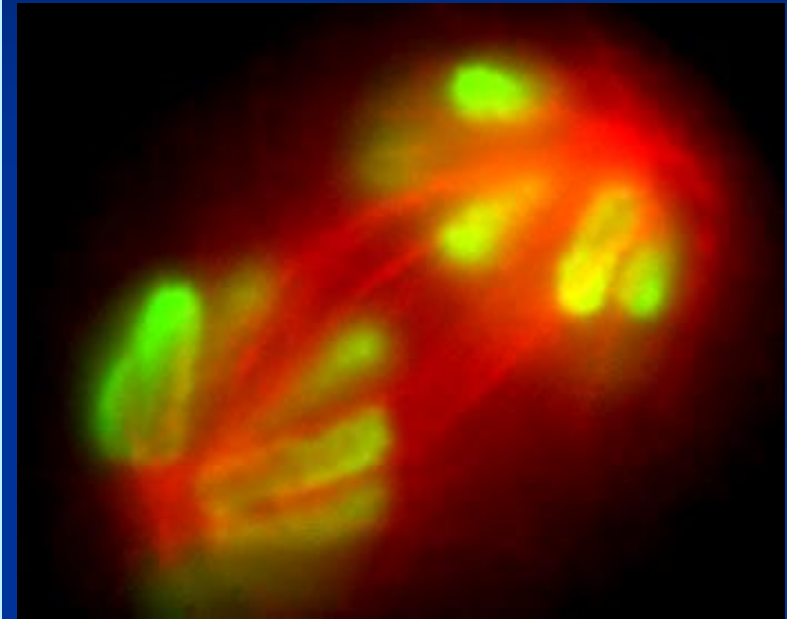
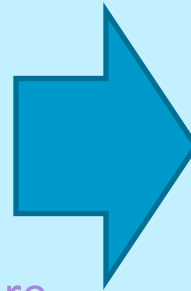


Cellula interfasica: disposizione citoplasmatica a stella dei MT

Importanza del citoscheletro durante la **fase M** del ciclo cellulare

DIVISIONE NUCLEARE/CITOPLASMATICA

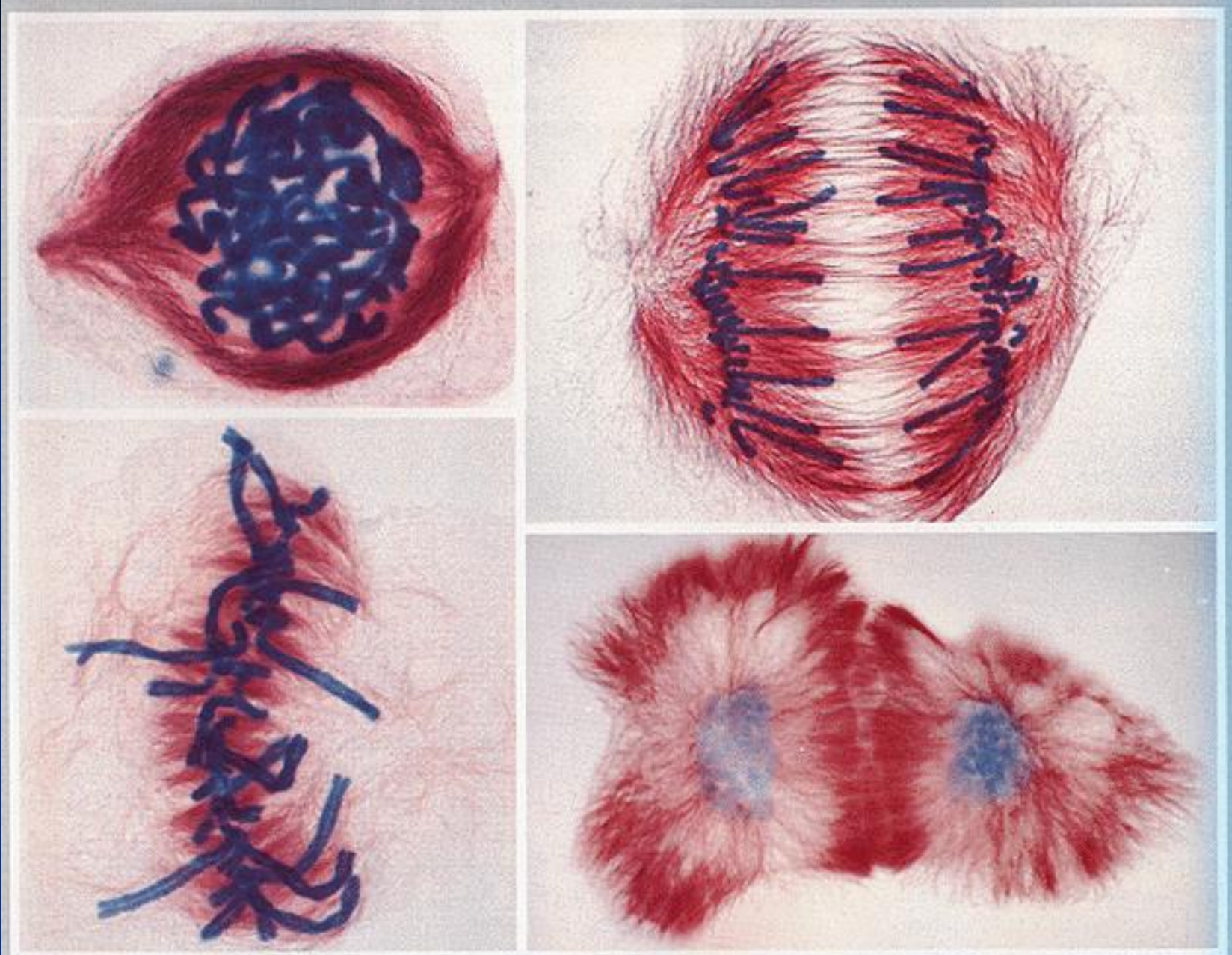
- Condensazione cromosomi
- Rottura membrana nucleare
- **Assemblaggio fuso mitotico**
- Ancoraggio cromosomi su fuso
- Segregazione dei cromosomi
- Riassemblaggio membrana nucleare
- **Anello contrattile**
- **Citodieresi**



Per l'**assemblaggio del fuso**
sono fondamentali:

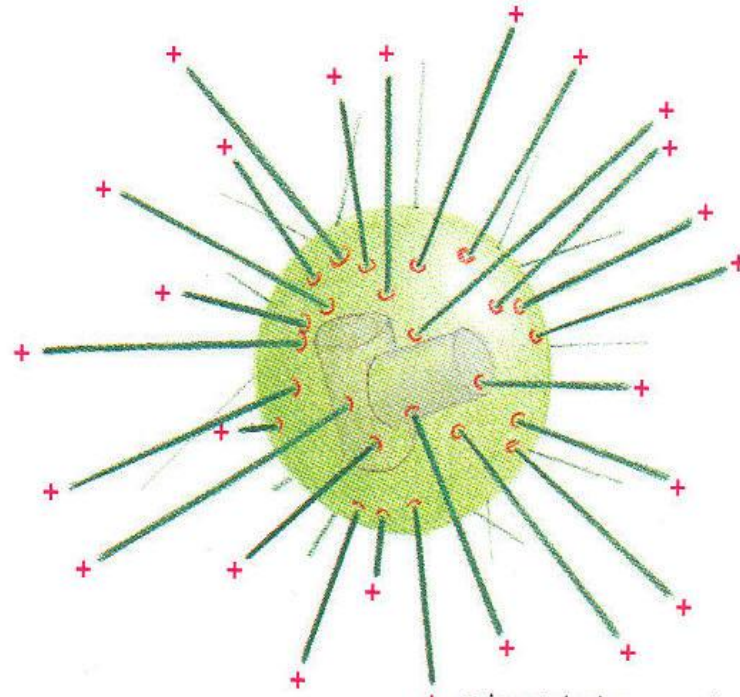
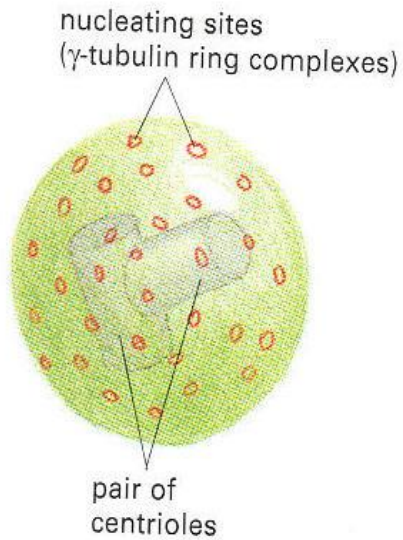
- **Centrosomi**
- **Microtubuli**

Stadi della mitosi in una cellula vegetale

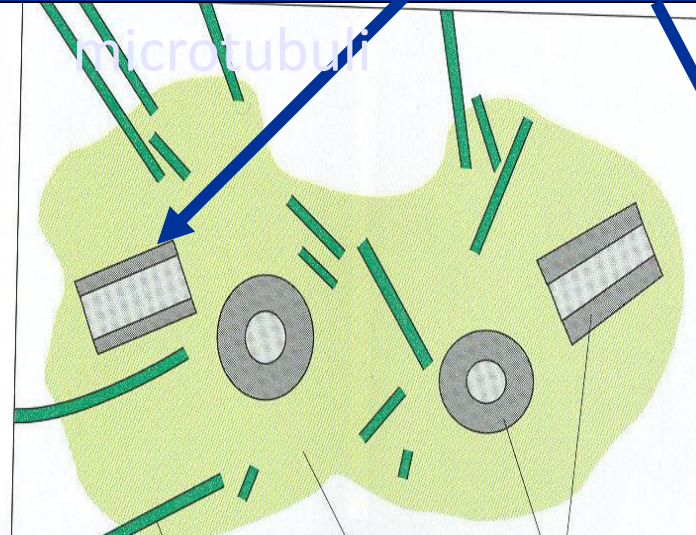
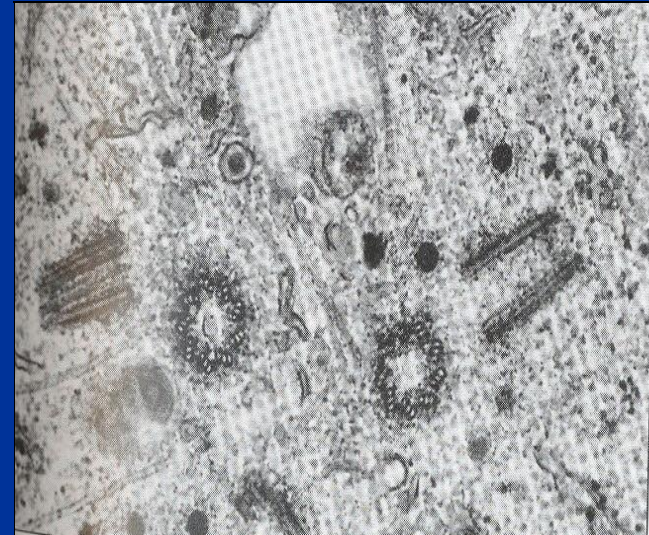


Plant cells in various stages of mitosis: (a) prophase; (b) metaphase; (c) anaphase; (d) telophase (all magnified about 2,700 times).

CENTROSOMA o centro organizzatore dei microtubuli (MTOC)

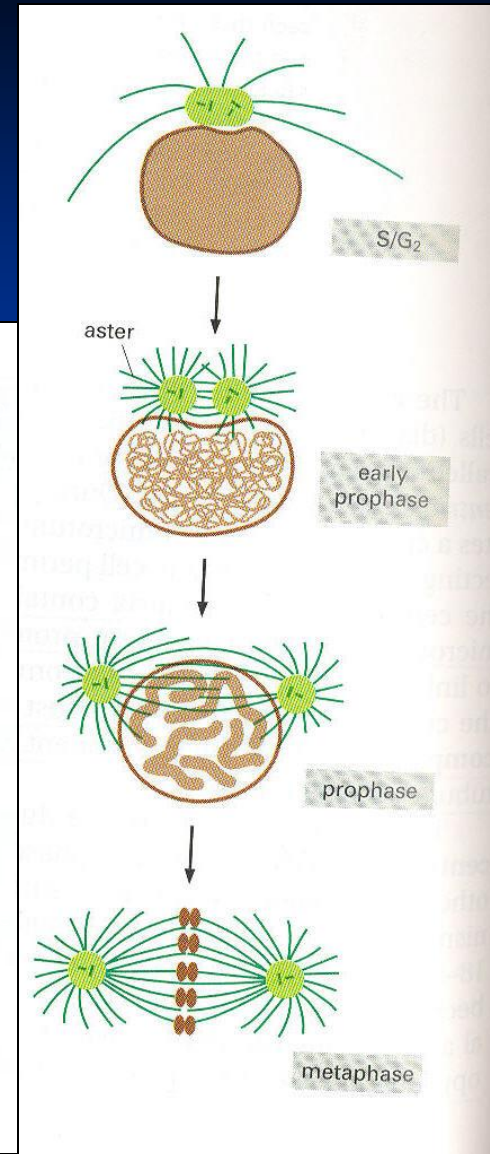
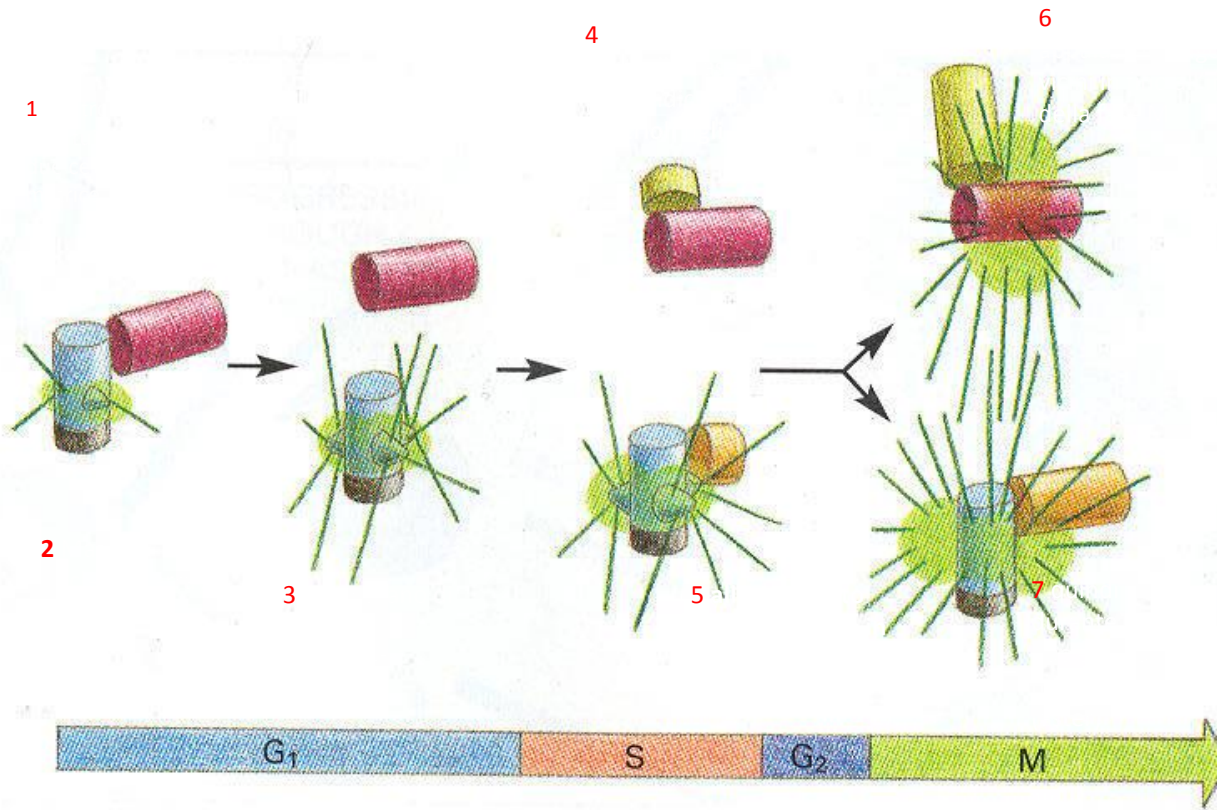


fatto da una **matrice**, una **coppia di centrioli**, dei **complessi anulati della gamma-tubulina** da cui parte la nucleazione dei microtubuli di tubulina



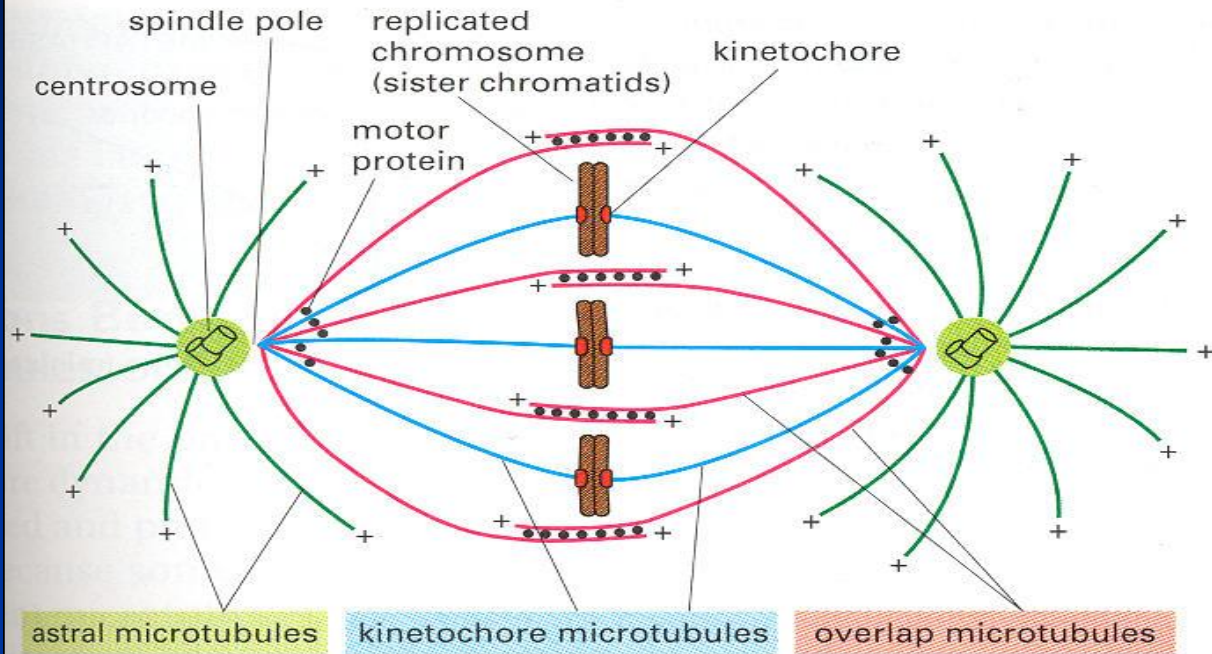
Il centrosoma viene duplicato dalla cellula durante la fase S

CICLO DEL CENTROSOMA

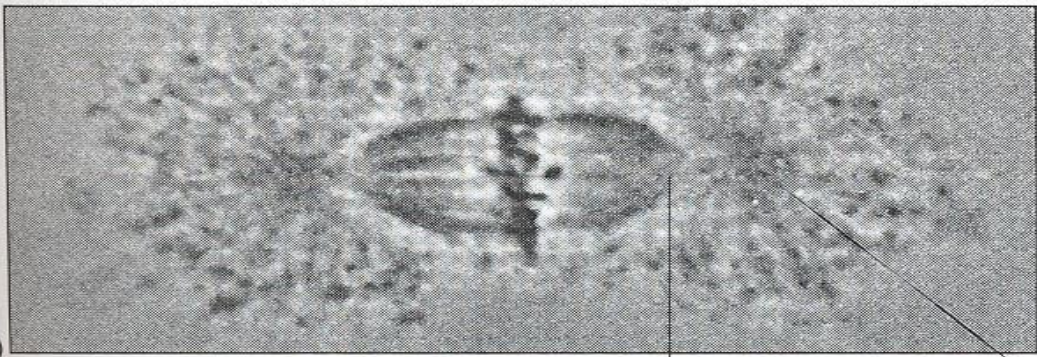


Dopo la replicazione il centrosoma resta su un lato del nucleo. Una volta iniziata la mitosi da ciascuna coppia di centrioli parte la nucleazione dei microtubuli dell'aster; ciascun centrosoma/aster migra ai lati opposti del nucleo ed inizia a formare un polo del fuso

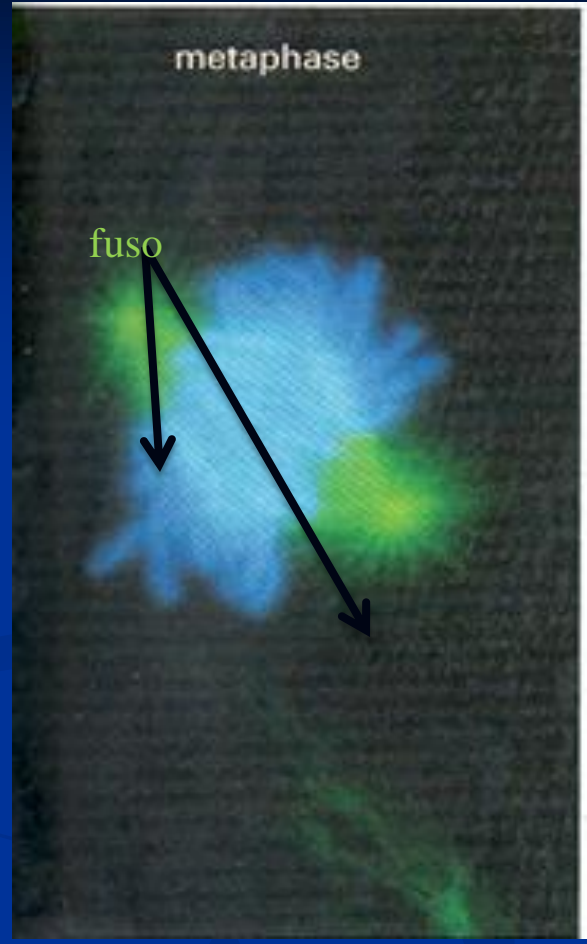
FUSO CELLULARE



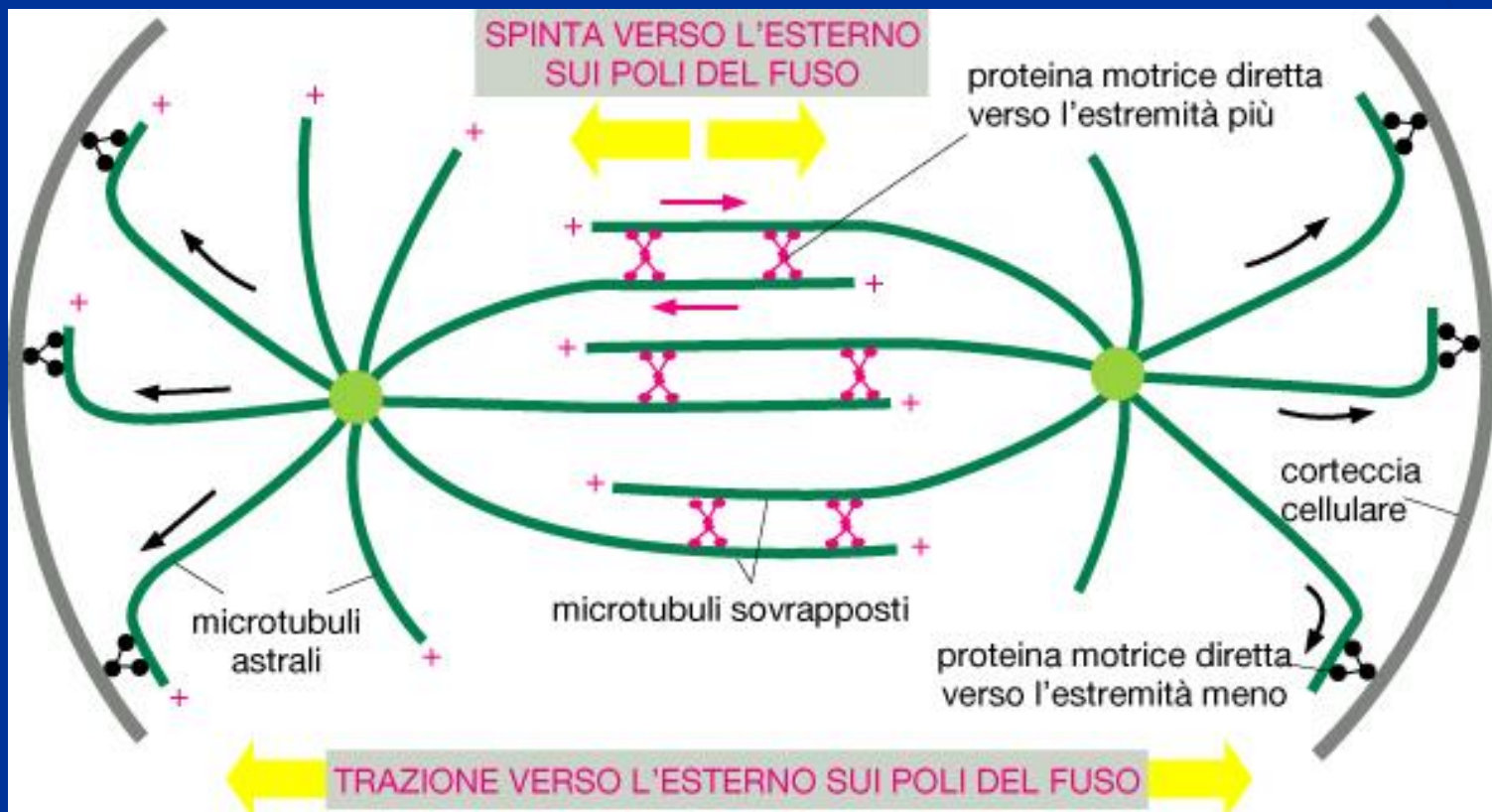
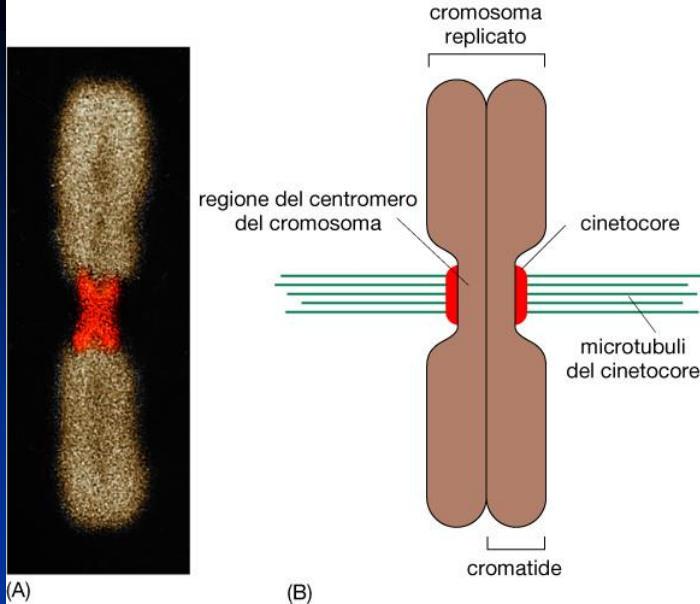
A)



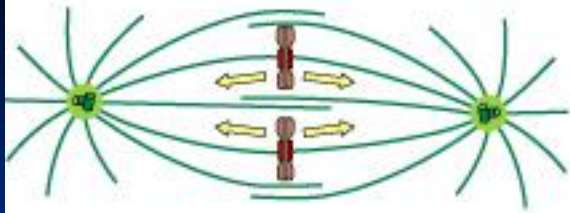
(B)



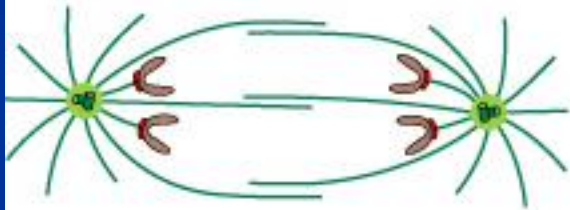
Cosa rende possibile la segregazione dei cromatidi?



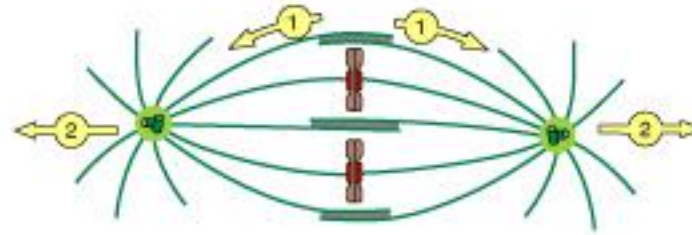
ANAFASE A



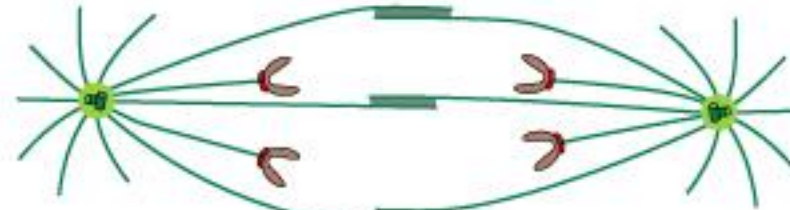
accorciamento dei microtubuli del cinetocore; movimento dei cromosomi figli verso i poli; forze generate soprattutto ai cinetocori



ANAFASE B

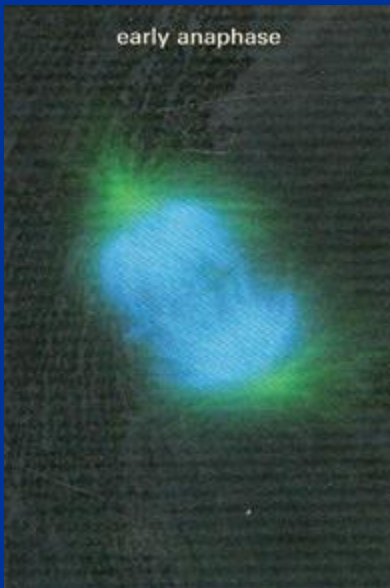


(1) una forza di scivolamento è generata fra microtubuli sovrapposti di poli opposti per spingere lontano i poli; (2) una forza di trazione agisce direttamente sui poli per separarli

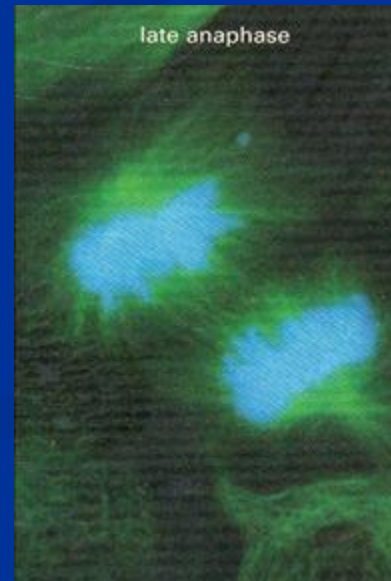


crescita dei microtubuli alle estremità più dei microtubuli polari

early anaphase

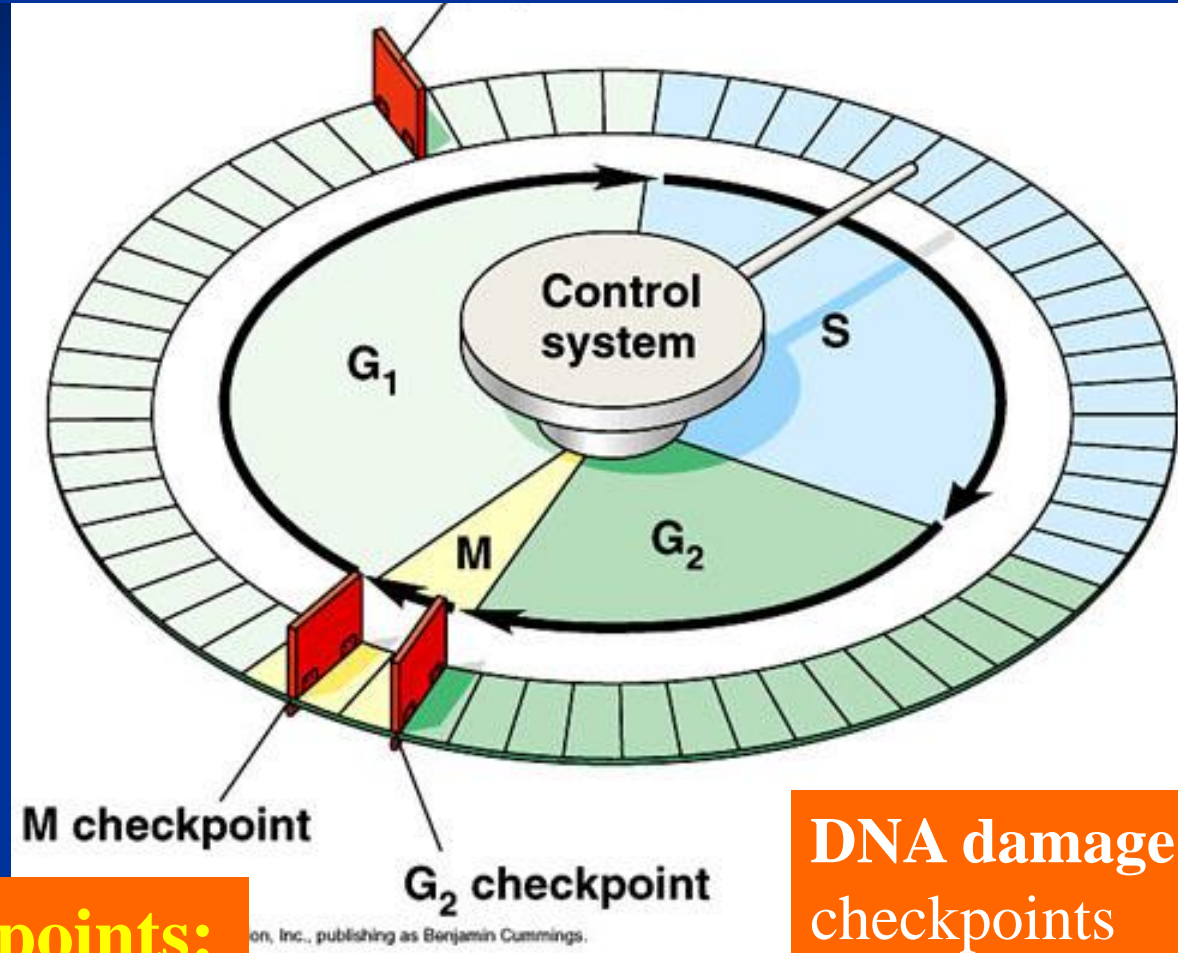


late anaphase



CHECKPOINTS: QUALITY CONTROL OF THE CELL CYCLE

The *cell* has several systems for interrupting the *cell cycle* if something goes wrong



DNA damage
checkpoints


spindle checkpoints:
blocks entry into
anaphase

Defects in the SPINDLE organization during meiosis can first lead to **chromosome segregation errors** with dramatic consequences

- In humans, it is estimated that **15–20% of oocytes display chromosome abnormalities linked to segregation errors**
- **such errors in oocytes** strongly correlate with increased maternal age

La fibre del citoscheletro non funzionano da sole, ma lavorano associate a
PROTEINE ACCESSORIE

Miosina
Chinesina
Dineina

- 
- essenziali sia per l'assemblaggio controllato che per il funzionamento dei filamenti citoscheletrici
 - comprendono i *motori proteici* che muovono gli organelli o i filamenti stessi.

PROTEINE MOTRICI → motori molecolari

Si attaccano ad un filamento polarizzato del citoscheletro e usano l'energia derivata da cicli ripetuti di idrolisi dell'ATP per muoversi in modo costante lungo il filamento

Si differenziano per il filamento a cui si attaccano, per la direzione in cui si muovono e per il cargo che portano

Dopo aver svolto l'azione motoria possono staccarsi dal filamento.

Funzioni in cui sono coinvolte p. motrici:

- **Trasporto organelli** racchiusi da membrana
- Segregazione dei **cromosomi**
- Scivolamento filamenti del citoscheletro per **battito delle ciglia**
- Scivolamento filamenti del citoscheletro per **contrazione** muscolare

MIOSINE

- Sono le uniche **proteine motrici** che si muovono su binari di actina
- Nelle cellule esistono diversi tipi di miosina con diversa struttura e localizzazione

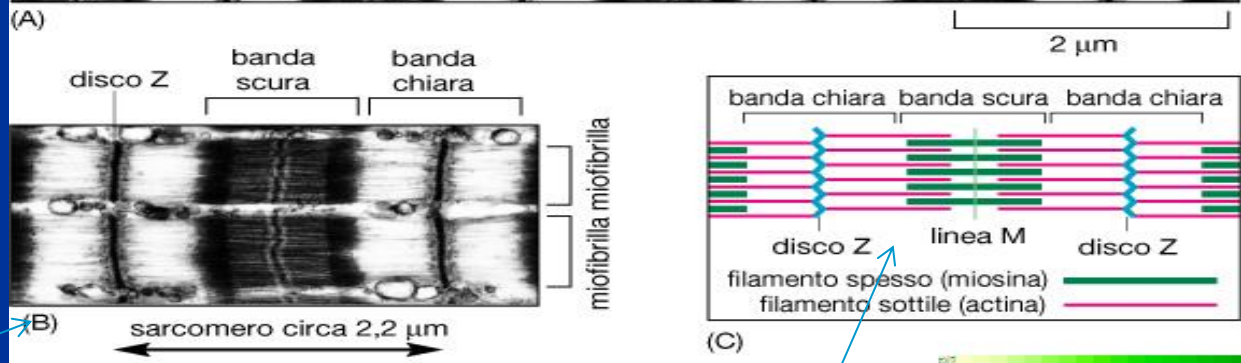
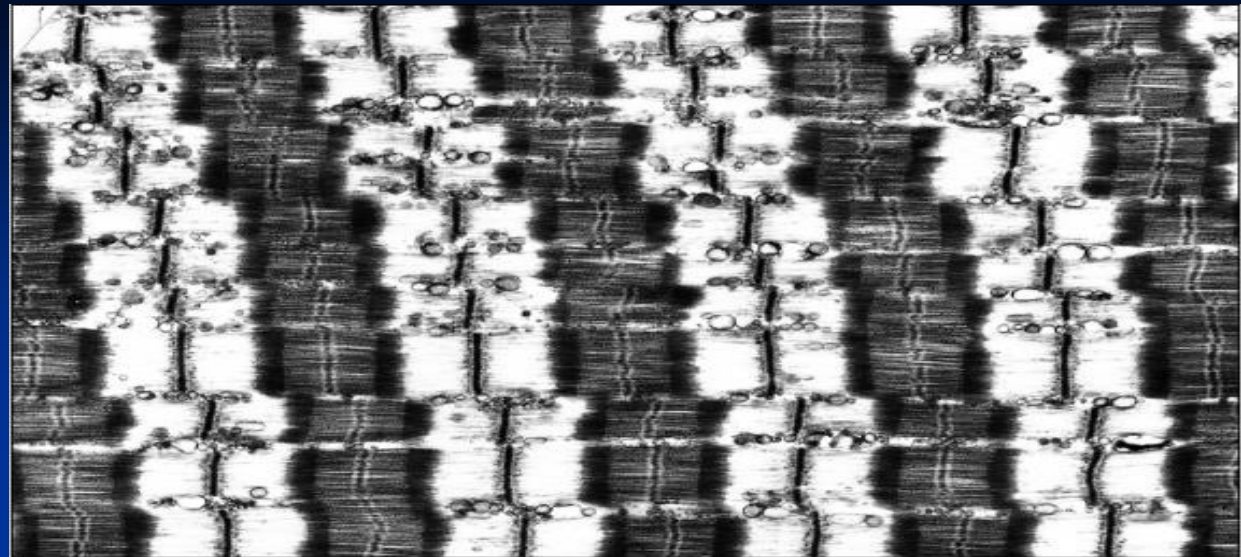
La **MIOSINA II** è sempre associata ad **attività contrattile** sia in cellule muscolari che in altri tipi cellulari, dove è coinvolta in diversi processi cellulari:

- citodieresi
- divisione cellulare
- migrazione cellulare

FIBRE MUSCOLARI

Banda chiara: filamenti sottili (actina)

MIOFIBRILLA/ SARCOMERO



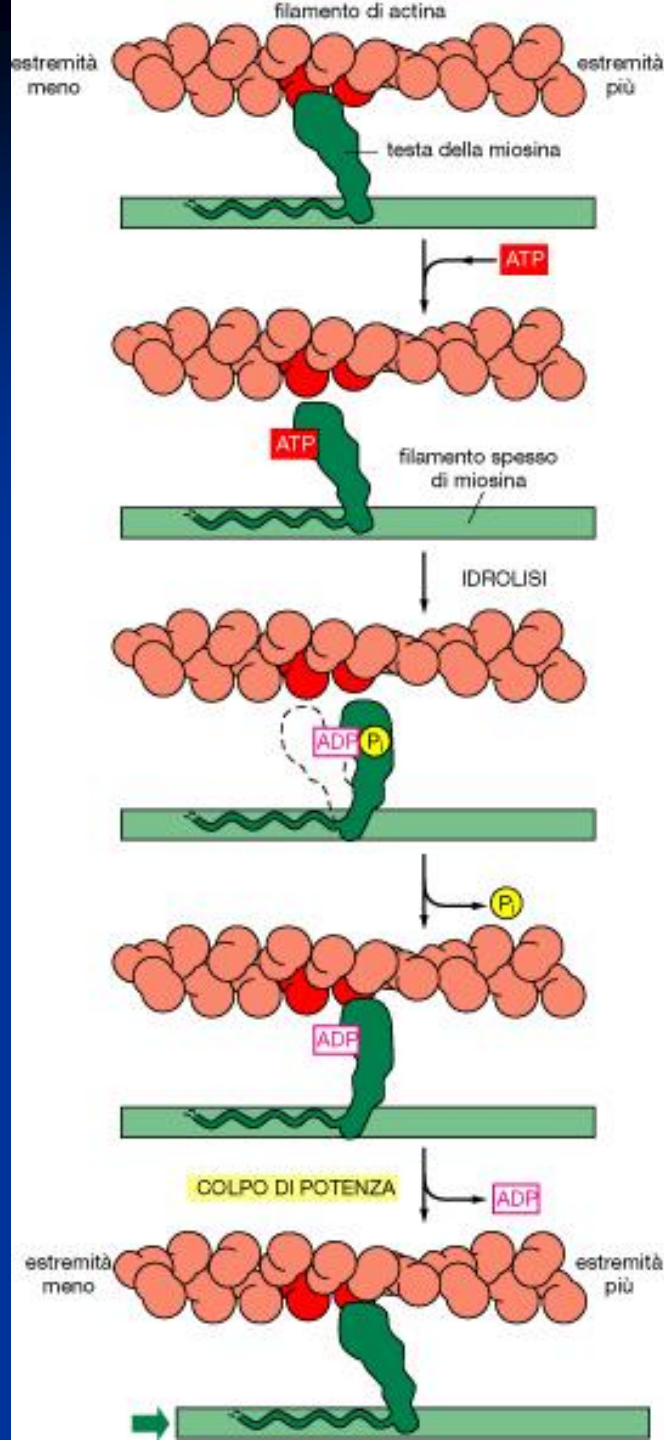
Disco Z: sito di attacco per le estremità dei filamenti sottili (actina), situato all'estremità del sarcomero

Linea M: è la posizione di proteine che collegano filamenti adiacenti di miosina fra loro

La **contrazione del muscolo** è conseguenza dell'accorciamento del sarcomero: scivolamento delle fibre (*non accorciamento delle fibre!*)

Ciclo di cambiamenti strutturali che subisce la **MIOSINA II** per camminare lungo l'actina

Alcune **proteine motrici** fanno scivolare i filamenti del citoscheletro l'uno sull'altro (**sistema miosina-actina**), generando la forza di **contrazione muscolare**



Configurazione *rigor*

No ATP

La testa di Miosina lega saldamente il filamento di actina

Durata breve (nel muscolo)

Termina con l'attacco di un ATP

Legame ATP

Lieve cambio conformazionale nel sito di attacco con l'actina e riduzione affinità actina-miosina

Distacco e conseguente possibilità di movimento

Idrolisi ATP

evidente cambio conformazionale

Spostamento della testa sul filamento di 5nM

ATP e Pi legano sempre la miosina

Nuovo legame actina- miosina
Rilascio del Pi

Colpo di potenza

La testa di miosina torna alla conformazione iniziale sul filamento di actina

No nucleotide

La miosina lega l'actina in una nuova posizione

Inizio di un nuovo ciclo

CHINESINE (MT)

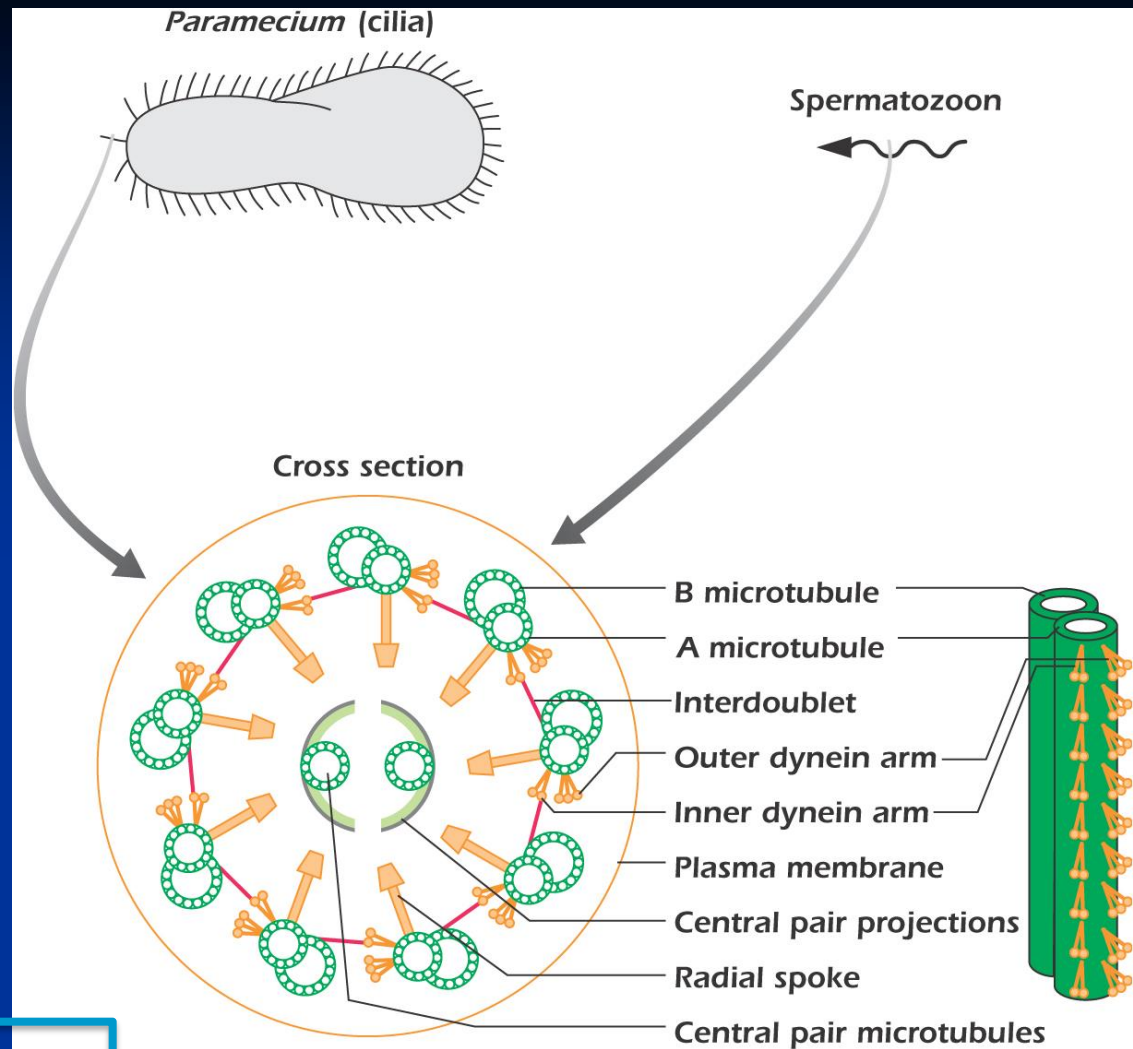
Sono proteine motrici coinvolte nel *trasporto anterogrado* (*trasporto assonale veloce*) di molecole dal ER (corpo cellulare) verso la terminazione dell'assone

PROTEINE MOTRICI: DINEINE (MT)

CENTRIOLI: hanno la stessa organizzazione in ciglia e flagelli:

9 coppie di MT poste ad anello intorno una coppia centrale di MT.

Attaccate alle coppie periferiche di MT ci sono **proteine motrici: dineine**



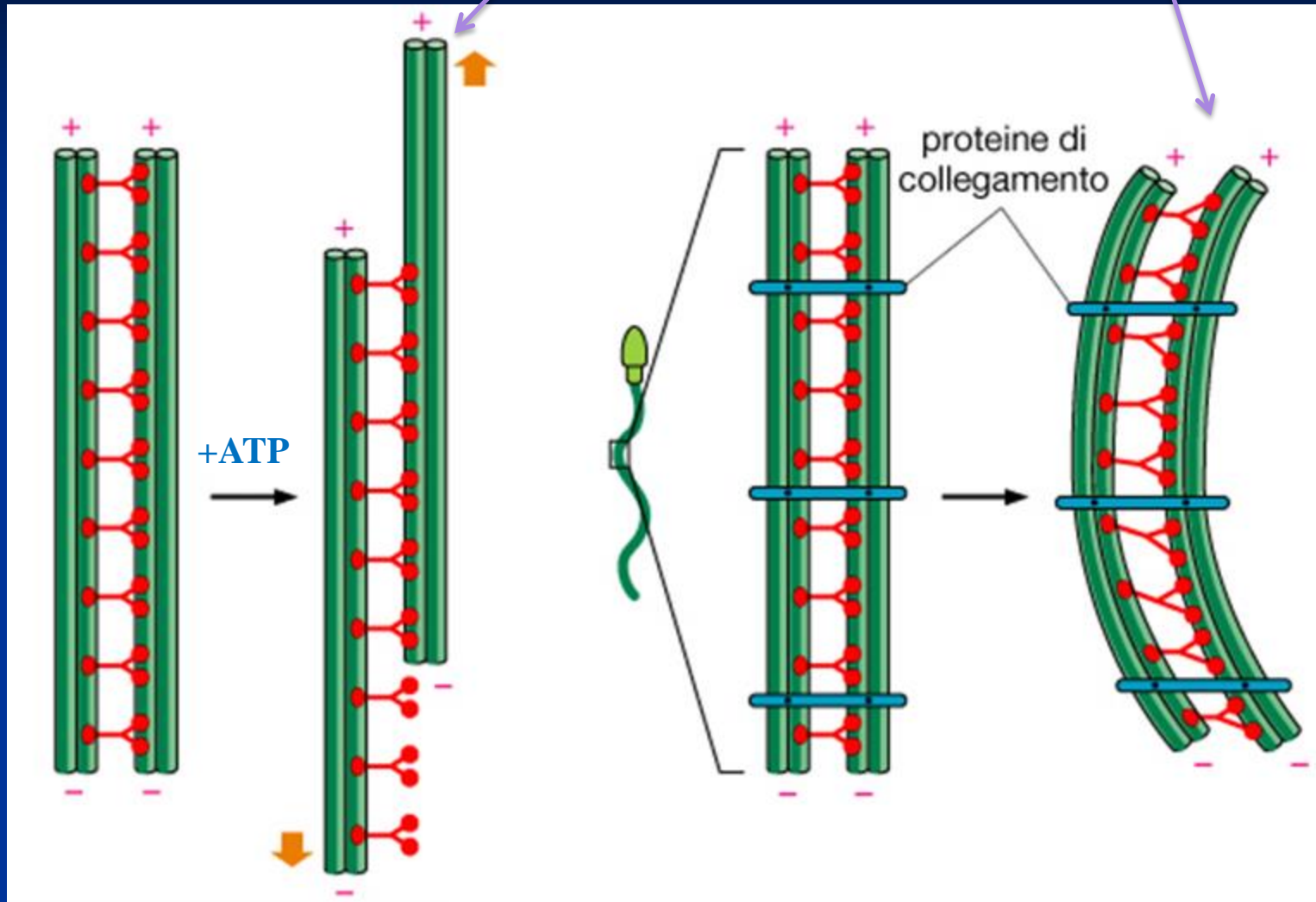
DINEINE ASSONEMALI:

coinvolte nello spostamento veloce di microtubuli nelle ciglia

DINEINE CITOPLASMATICHE:

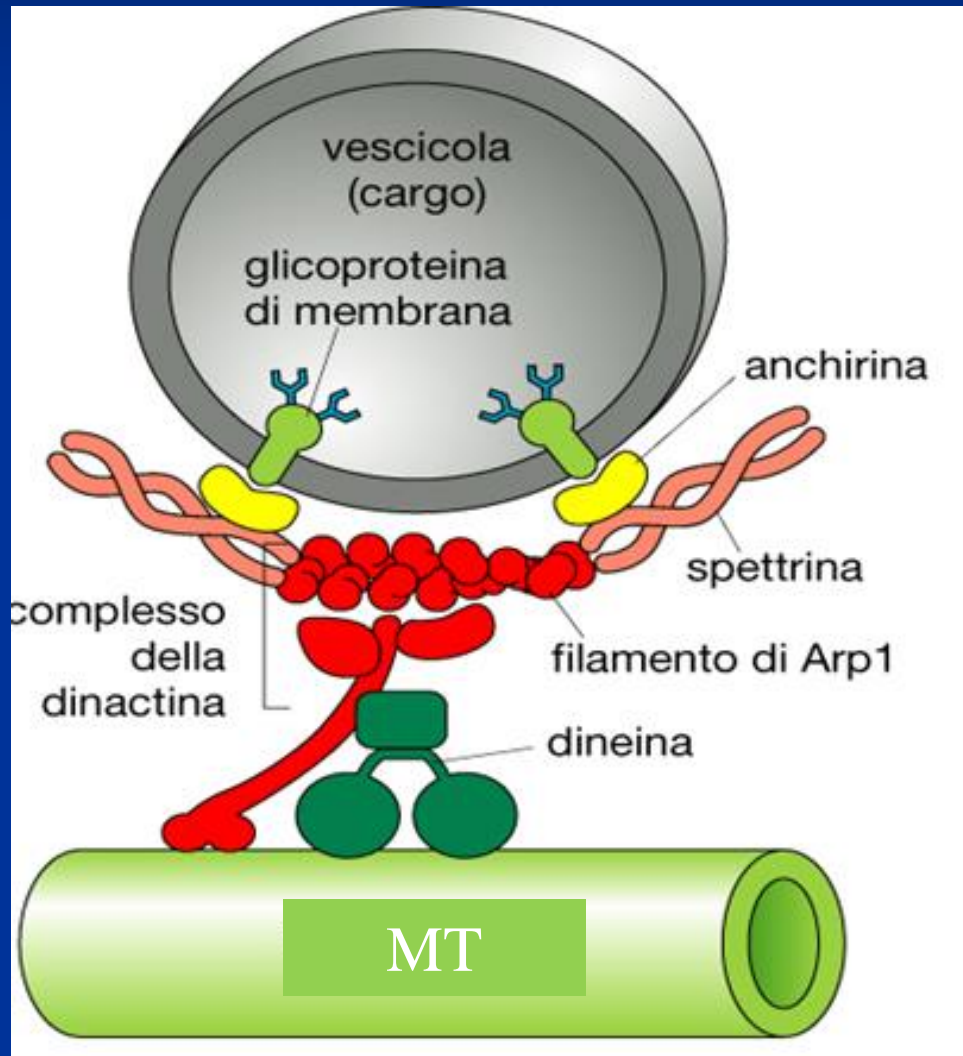
coinvolte nel *trasporto assonale retrogrado* (verso il soma dell'assone)

La **DINEINA** produce scioglimento dei MT o la loro curvatura




La **DINEINA** richiede l'associazione con la ***dinactina*** per svolgere la sua funzione

formano un complesso proteico che interagisce con altri complessi proteici presenti sulle m. degli organelli (*es. vescicole*)



Citoscheletro



Filamenti di ACTINA: determinano la **forma** della superficie della cellula e sono necessari per la **locomozione** dell'intera cellula

Microfilamenti o filamenti di ACTINA

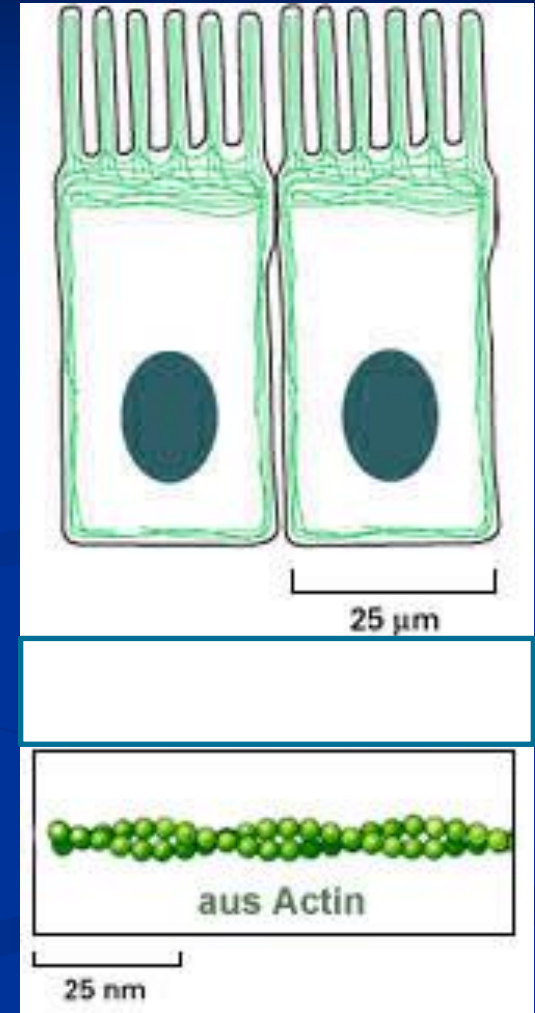
I **filamenti di actina** (noti anche come *microfilamenti*) sono polimeri elicoidali a due filamenti della proteina **actina**; servono alla struttura della cellula ed al movimento

Essi appaiono come strutture **flessibili**, con un diametro di 5-9 nm e sono organizzati in una varietà di fasci lineari, reti bidimensionali e gel tridimensionali.

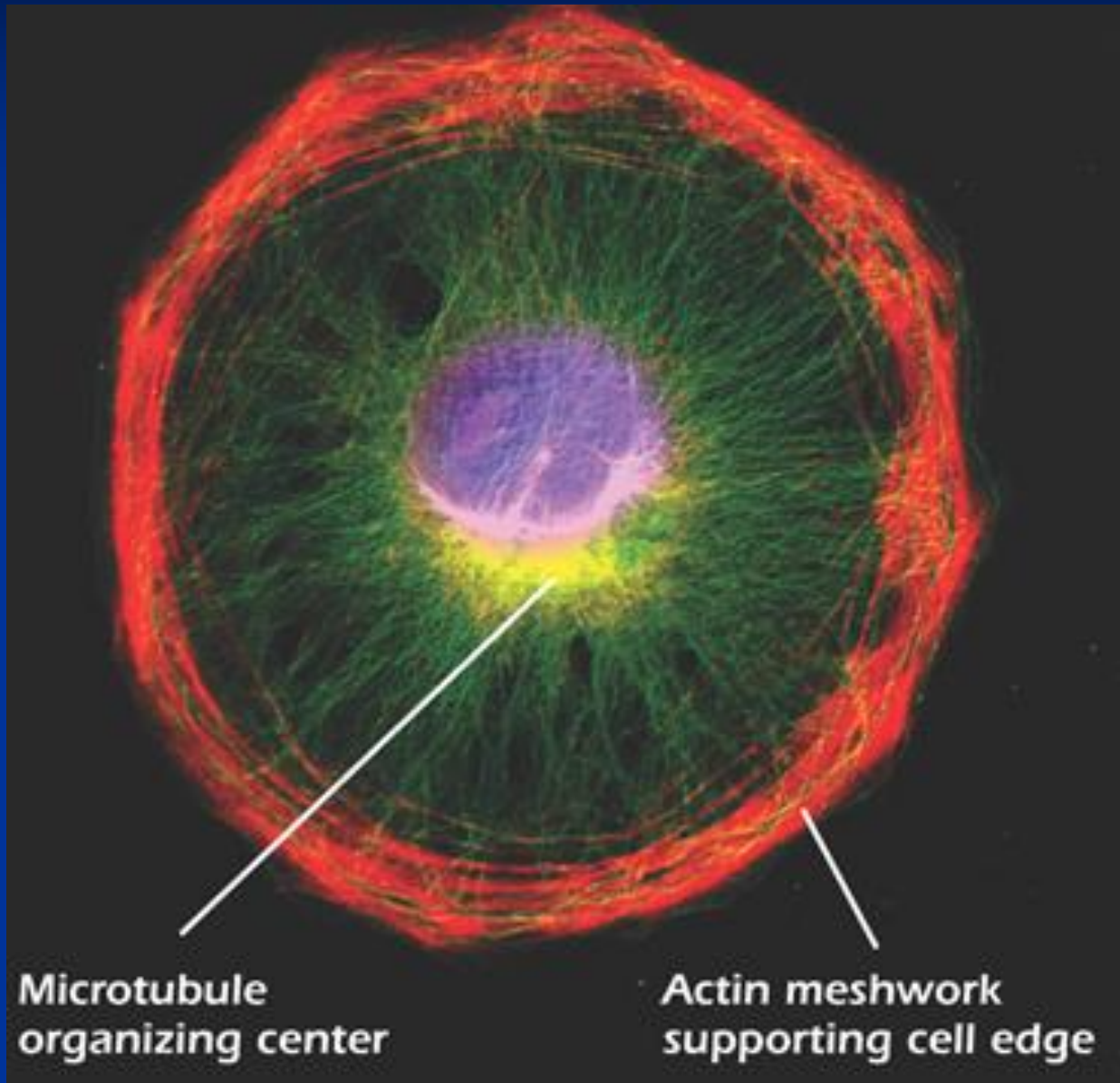
Formano molti tipi di proiezioni della superficie cellulare (lamellopodi, filipodi)

Sono i più **sottili**: resistono allo stiramento ma si spezzano facilmente

dove sono localizzati?

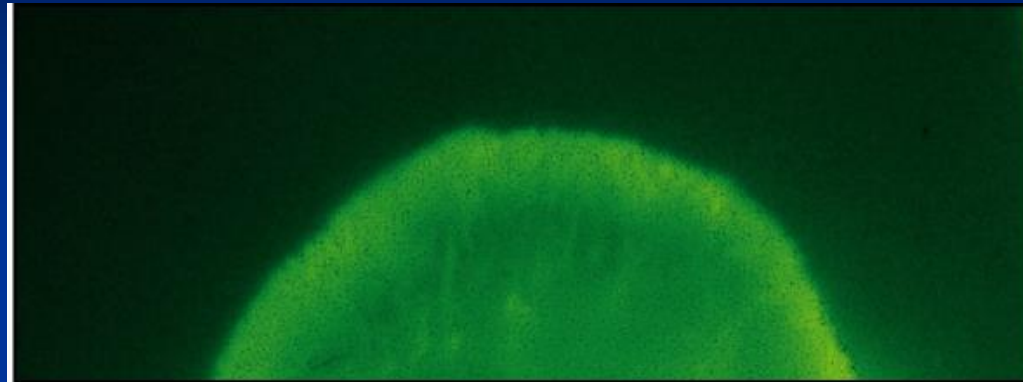


SEBBENE I FILAMENTI DI ACTINA SIANO DISPERSI IN TUTTA LA CELLULA, SONO **CONCENTRATI SOPRATTUTTO NELLA CORTECCIA**, APPENA SOTTO LA MEMBRANA PLASMATICA.



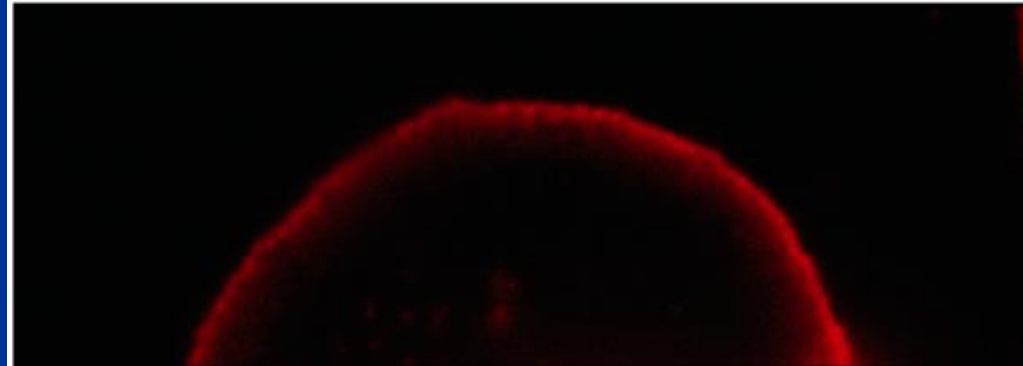
Mentre la nucleazione dei MT avviene in profondità nel citosol, vicino al nucleo, la nucleazione dei filamenti di actina avviene in superficie alla M plasmatica

In verde (falloidina)
tutti i filamenti di
actina già presenti
nella cellula



(A)

In rosso (rodamina)
filamenti di actina
di nuova
formazione



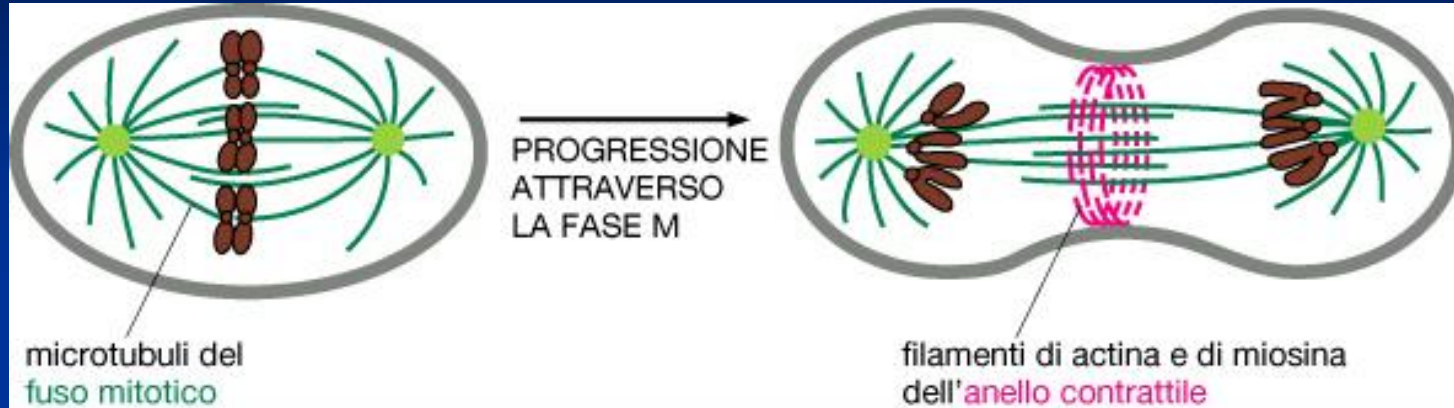
(B)

5 μ m

Permeabiliz./incubaz. con actina marcata con rodamina/ fix/incubaz. falloidina-FITC

FASE M: Citodieresi

Anello contrattile



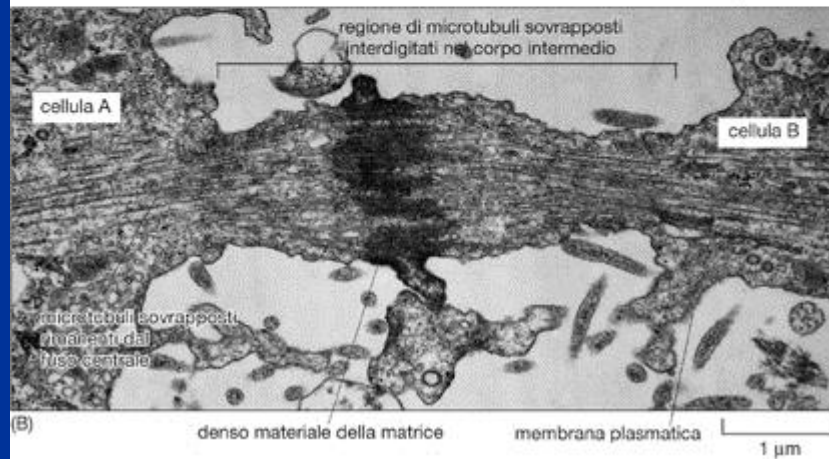
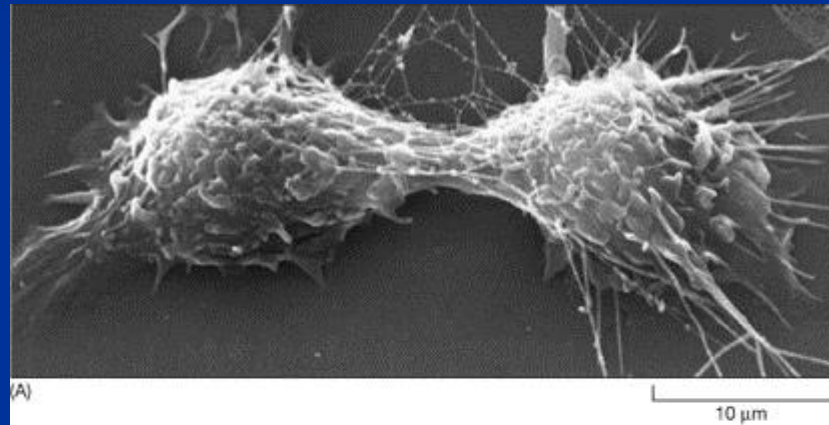
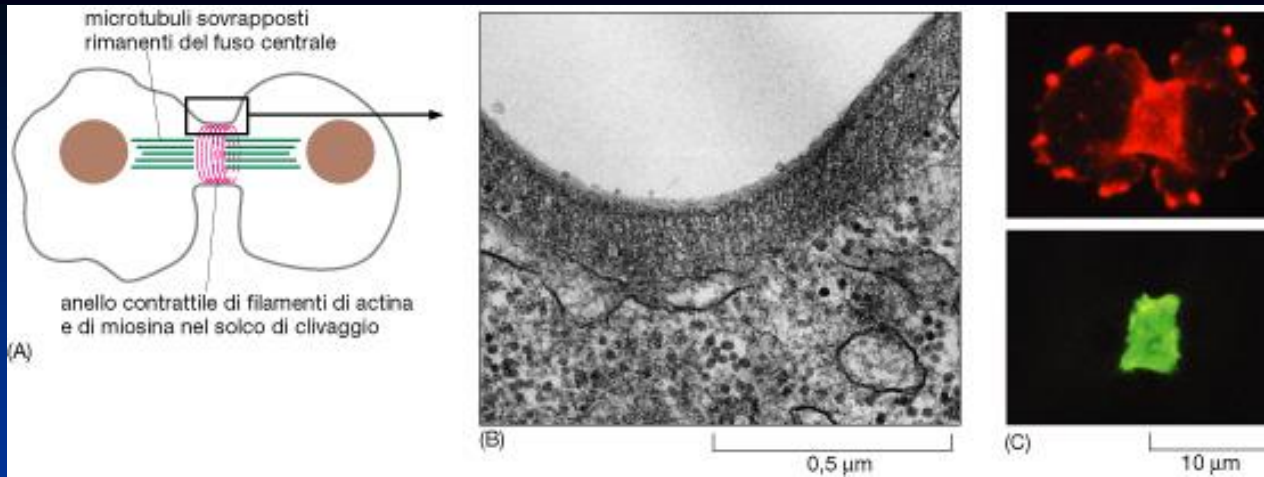
■ CITODIERESI

Questo processo è dovuto a un fascio di **MICROFILAMENTI DI ACTINA** che si forma sotto la membrana plasmatica detto **anello contrattile**.

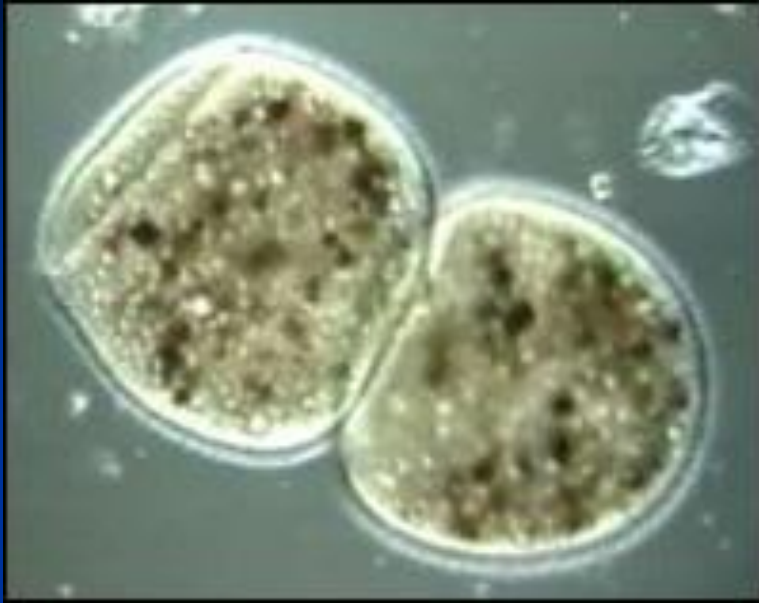
(l'actina necessaria alla formazione di questa struttura deriva dal disassemblaggio dei filamenti di actina del citoscheletro).

La strozzatura dell'anello avviene mediante **L'INTERAZIONE CON LE MOLECOLE DI MIOSINA** che inducono lo scorrimento dei filamenti di actina (come accade nelle fibre muscolari) e che costringe a sua volta il citoplasma a dividersi.

- Il solco si viene a formare generalmente nella parte mediana della cellula in corrispondenza della regione centrale del fuso. In particolari tipi di cellule (gli ociti ad esempio) in cui il fuso non si trova in posizione centrale anche il solco segue il suo orientamento dividendo la cellula in due cellule figlie di dimensioni diverse.



Citodieresi



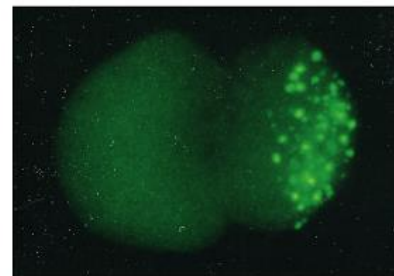
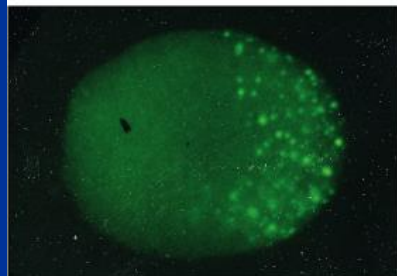
(A)

200 μ m



(B)

25 μ m

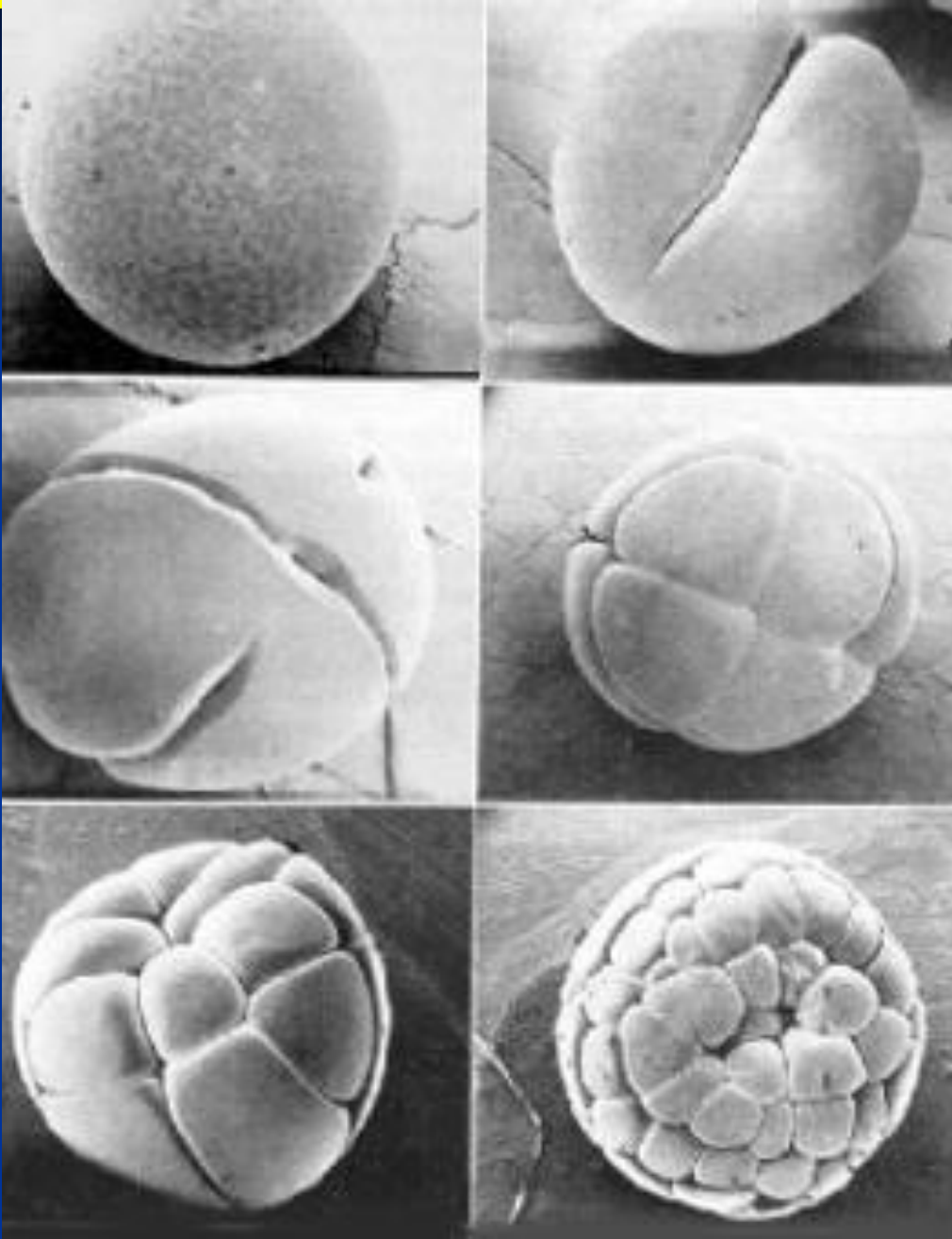


anteriore

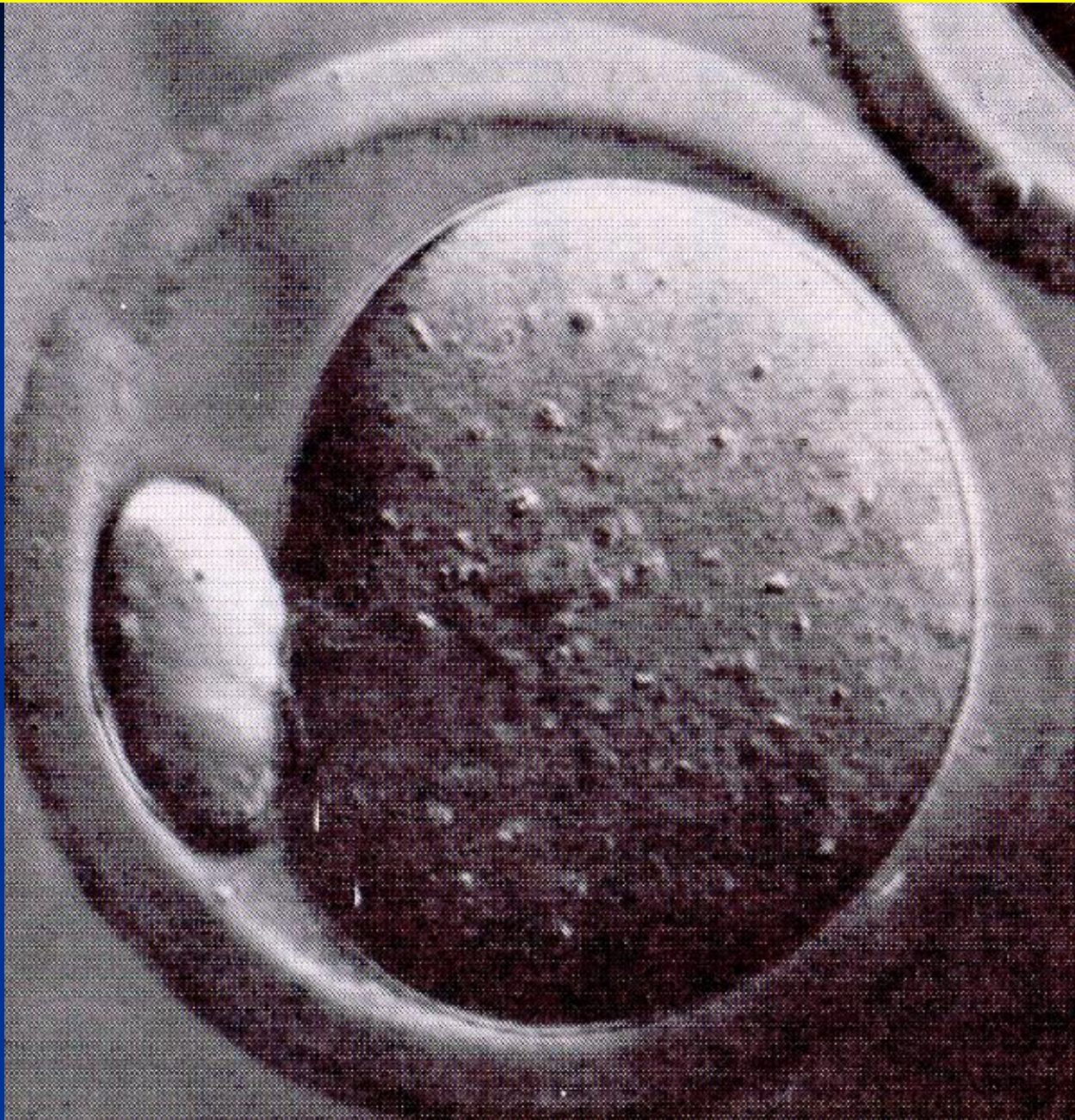
posteriore

20 μ m

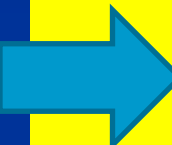
Segmentazione dell'embrione durante le prime fasi di sviluppo



Fase M oocita: citodieresi asimmetrica



Citoscheletro

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

STRUTTURA
INTERNA
ALTAMENTE
ORGANIZZATA
MA
FLESSIBILE

PROTEINE ACCESSORIE

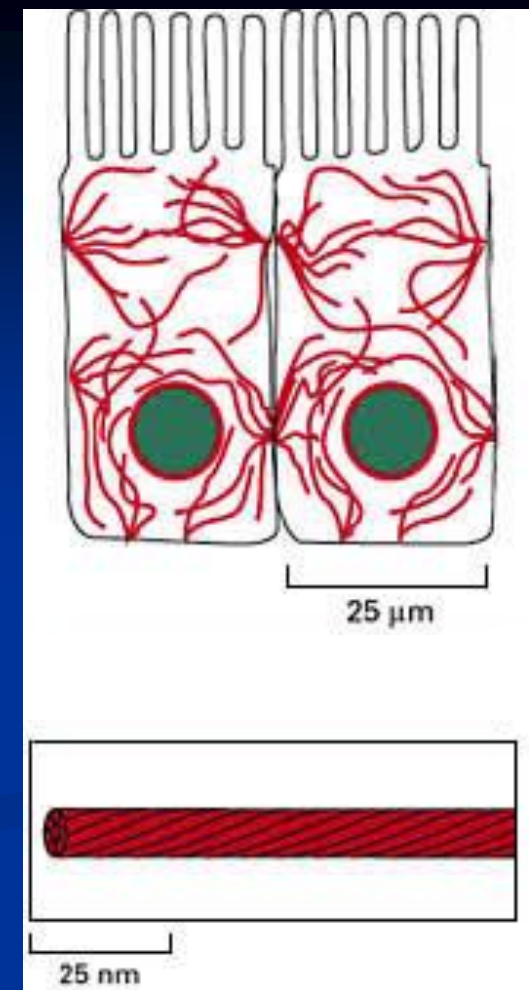
I **FILAMENTI INTERMEDI** sono fibre simili a corde con un diametro di circa 10 nm; sono composti da proteine dei filamenti intermedi che costituiscono una famiglia grande ed eterogenea.

Hanno un ruolo fondamentale strutturale, di sostegno della tensione cellulare. I filamenti intermedi sono le strutture più **stabili** e meno solubili del citoscheletro (si mantengono intatte anche in soluzioni saline concentrate e detergenti non ionici).

Alcuni tipi si estendono attraverso il citoplasma, dando alle cellule **forza meccanica**.

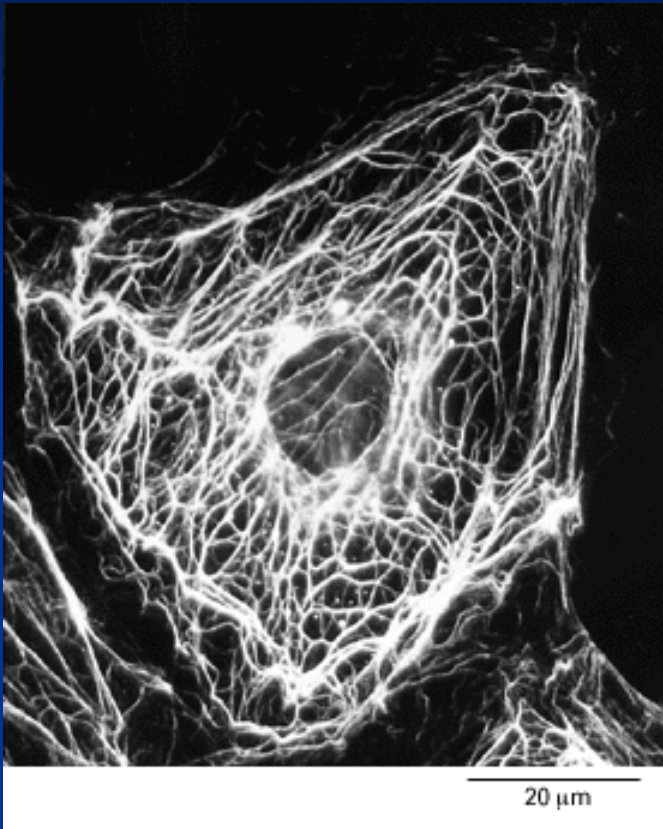
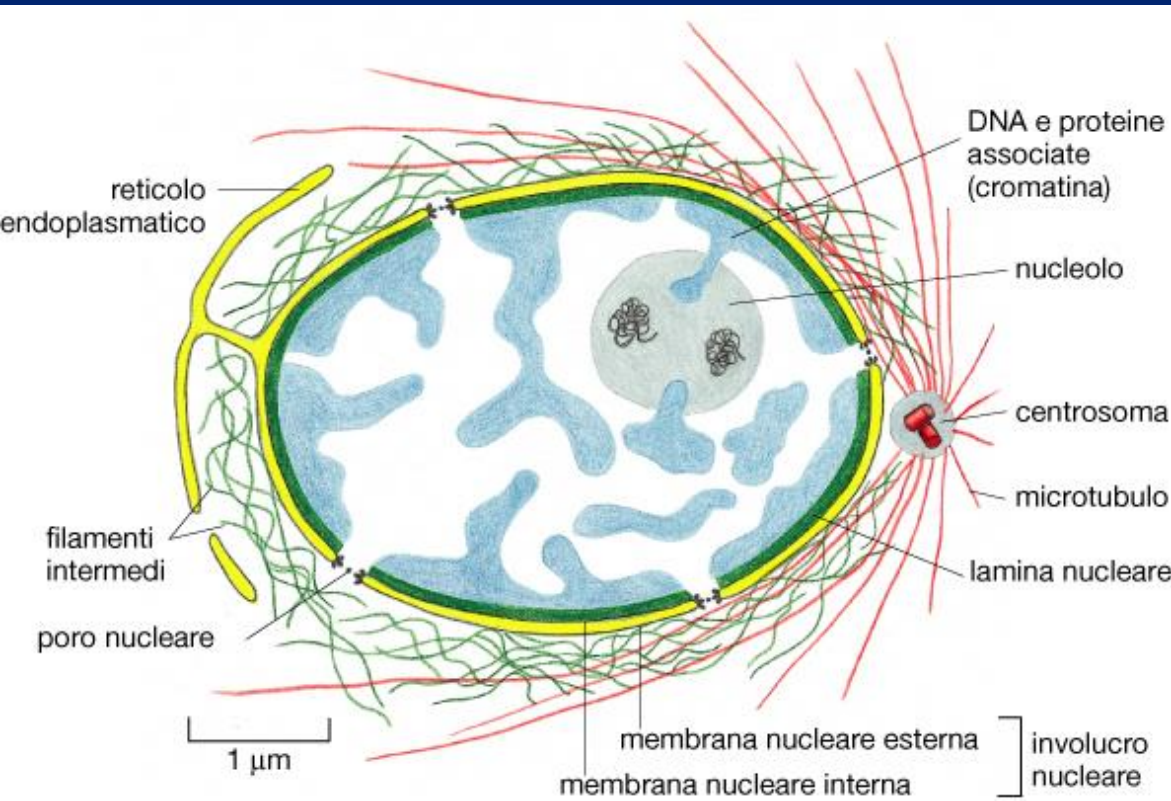
In un tessuto epiteliale, attraversano il citoplasma da una giunzione cellulare all'altra (desmosomi), rinforzando così l'intero epitelio.

Formazione **appendici resistenti** (capelli e unghie)



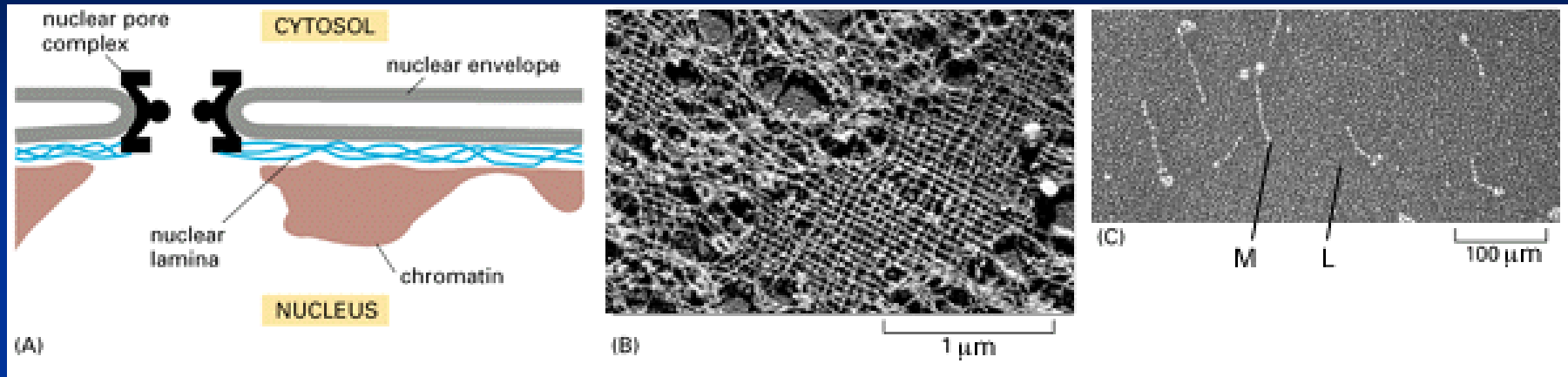
lamina nucleare
assoni
tessuti epiteliali

■ Un tipo di filamento intermedio forma un reticolo chiamato **LAMINA NUCLEARE** appena sotto la membrana nucleare interna.



Formano un reticolo in tutto il citoplasma ed un intreccio a canestro intorno al nucleo

lamina nucleare



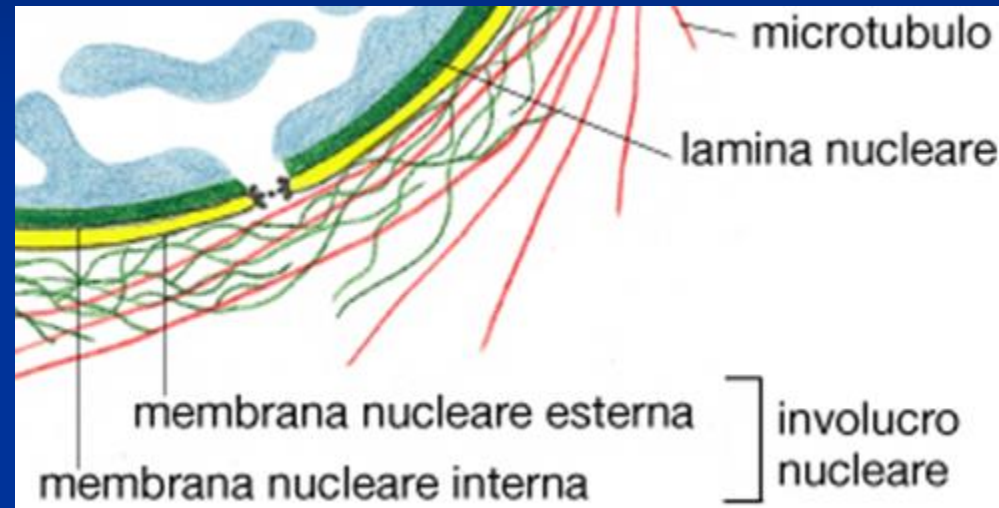
Una classe di F.I. è costituita dalle *lamine nucleari A, B e C*, che formano una rete filamentosa lungo la faccia interna della membrana nucleare di tutte le cellule eucariote. Hanno un **segnale di localizzazione nucleare**.

La formazione del reticolo è dinamica durante la divisione cellulare (fosforilazione in serina)

NUCLEAR LAMINA

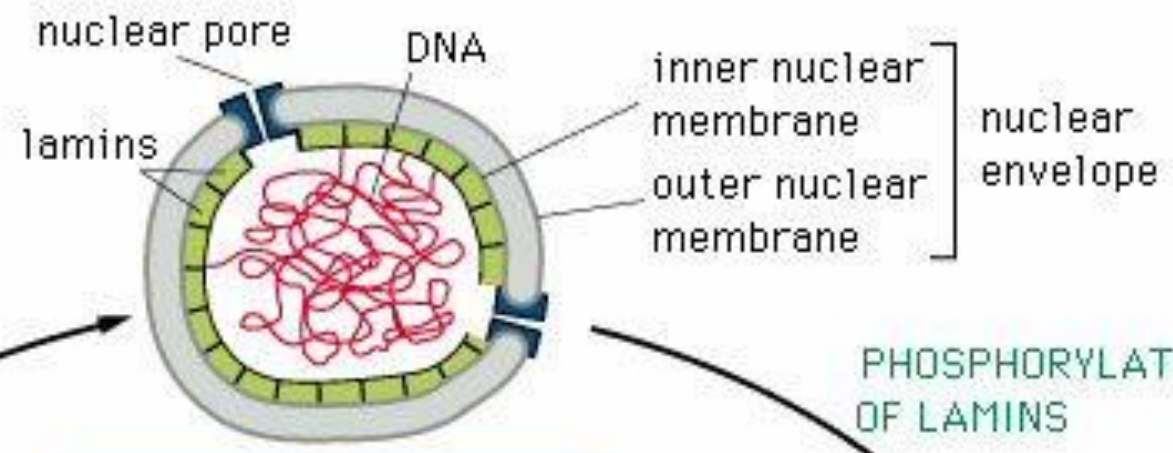
- Consists of **intermediate filaments**, (30-100 nm thick) that are polymers of lamin ranging from 60-75 kD

- **A-type lamins** are inside, next to nucleoplasm
- **B-type lamins** are near the nuclear membrane (inner).



- Lamin may bind to integral proteins inside the inner membrane.
- **The lamins may be involved in the functional organization of the nucleus.**

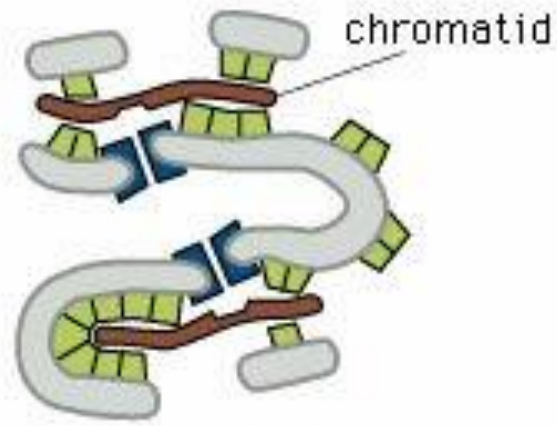
**Nuclear envelope
breaks down during M
phase of cell cycle**



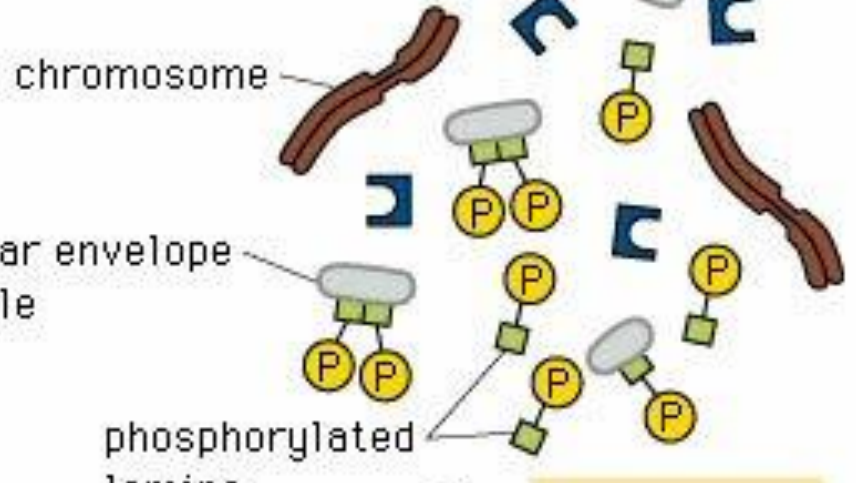
INTERPHASE NUCLEUS

FUSION OF NUCLEAR ENVELOPE VESICLES

PHOSPHORYLATION OF LAMINS



TELOPHASE



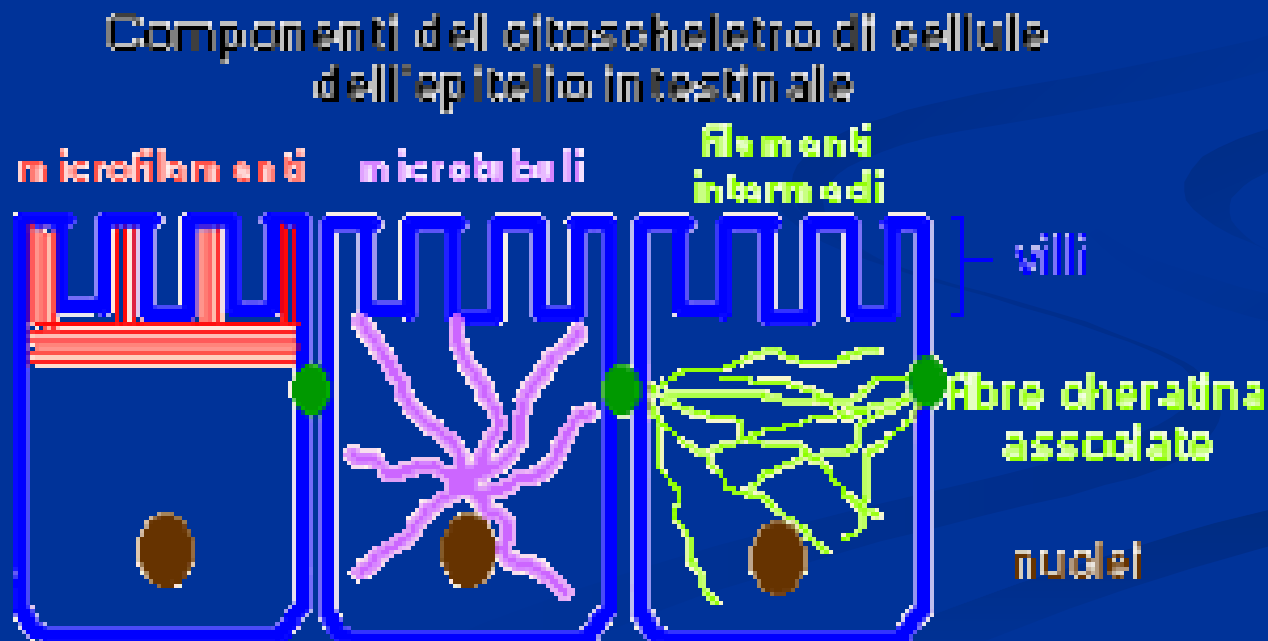
PROPHASE

DEPHOSPHORYLATION OF LAMINS

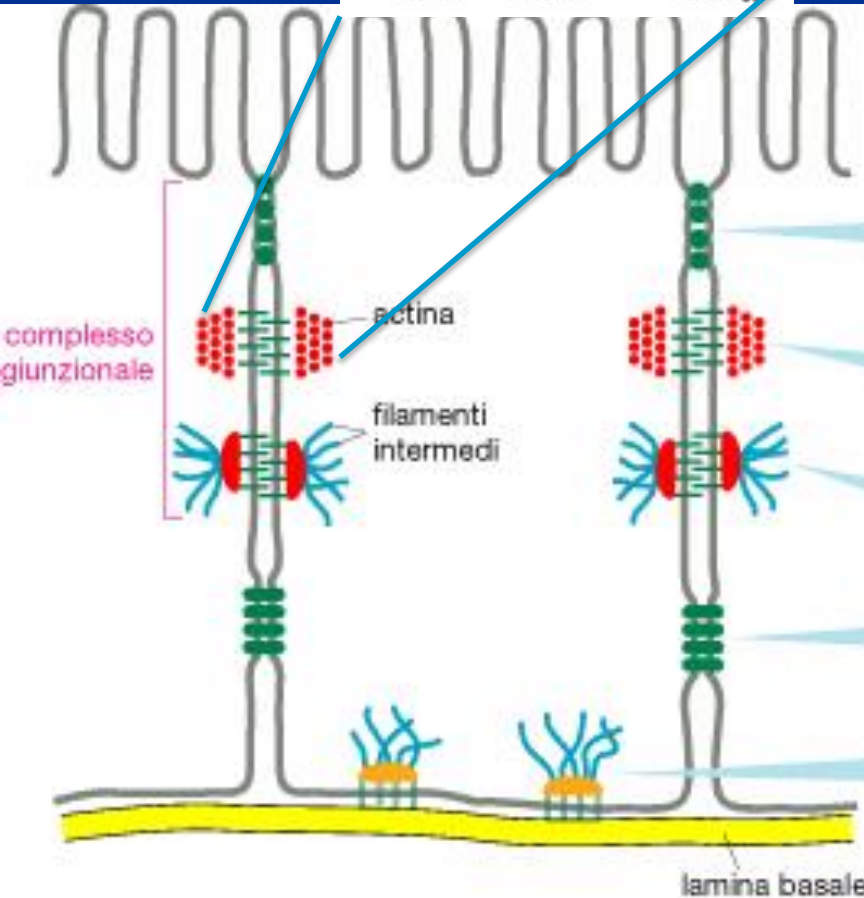
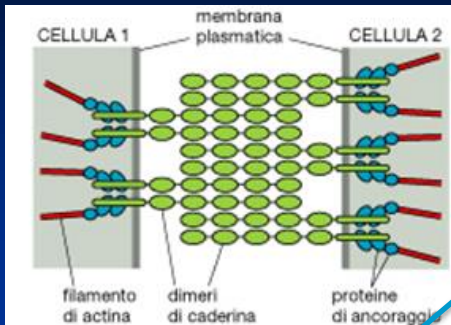
Esempi di citoscheletro in cellule epiteliali

Nelle cellule epiteliali dell'intestino sono presenti tutti e tre i tipi di filamenti citoscheletrici:

- I **microfilamenti** si protendono nei villi determinando la forma della superficie cellulare.
- I **microtubuli** fuoriescono dal centrosoma orientandosi verso la periferia della cellula.
- I **filamenti intermedi** connettono le cellule adiacenti per mezzo dei desmosomi.

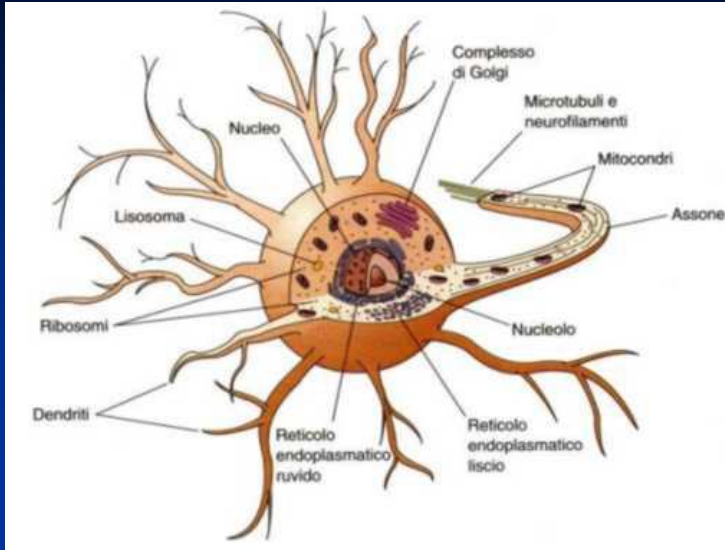


Proteine del CITOSCHELETRO nelle giunzioni cellula-cellula



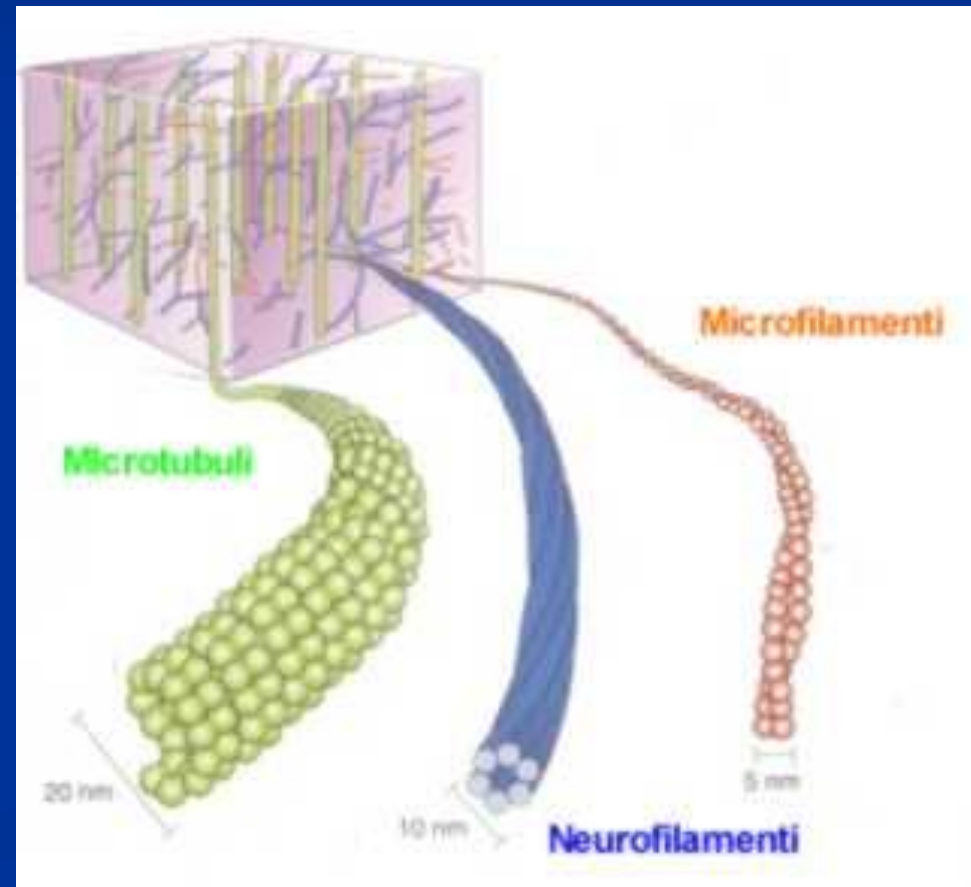
nome	funzione
giunzione stretta	sigilla cellule adiacenti in un foglietto epiteliale per impedire il passaggio di molecole fra di esse
giunzione aderente	unisce un fascio di actina in una cellula a un fascio simile in una cellula vicina
desmosoma	unisce i filamenti intermedi in una cellula a quelli in una cellula vicina
giunzione gap	permette il passaggio di piccoli ioni e molecole solubili in acqua
emidesmosoma	àncora i filamenti intermedi in una cellula alla lamina basale

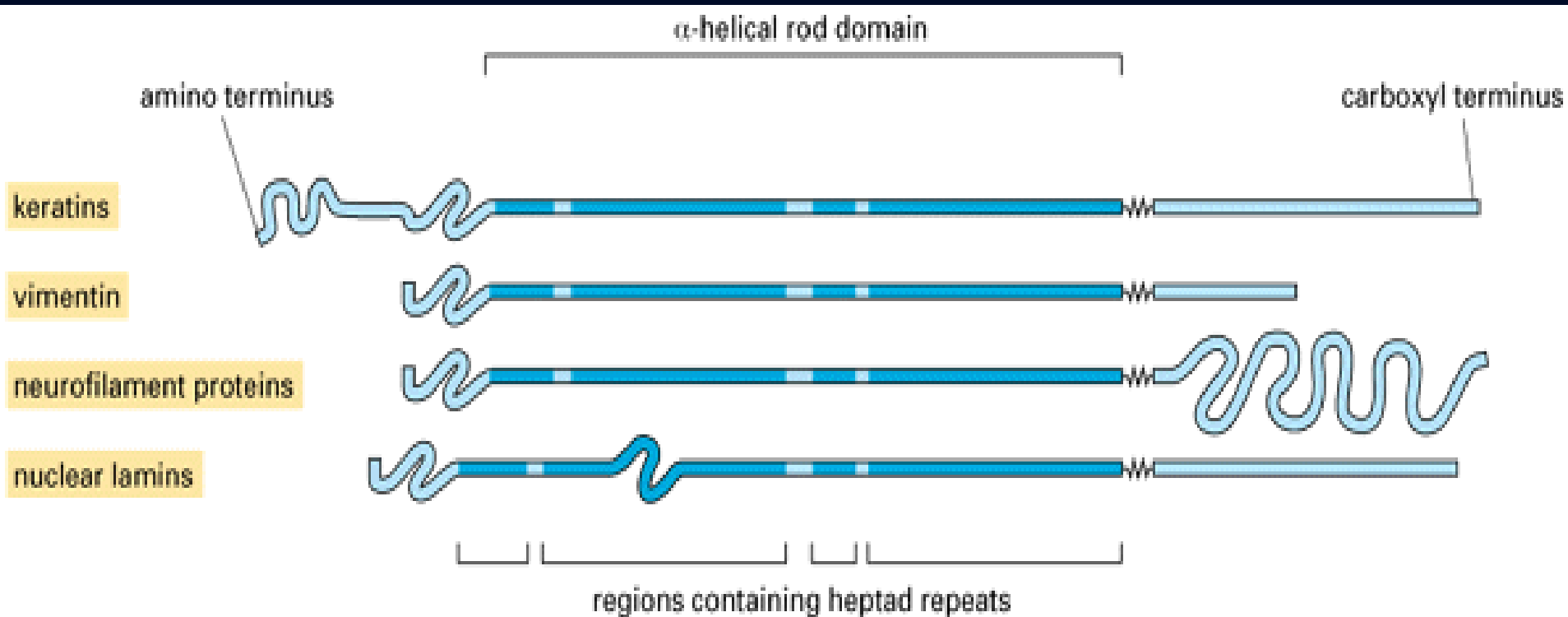
Cellula nervosa



*Le alterazioni del citoscheletro sono responsabili della gravità relativa alla demenza nella **malattia di Alzheimer**.*

Il contenuto dei **dendriti** prossimali è simile a quello del citoplasma cellulare. Tuttavia, con l'aumento della lunghezza dei dendriti la densità degli organuli tende a diminuire e diviene predominante la presenza del **citoscheletro** composto dai tre tipi di proteine: **mictotubuli**, **neurofilamenti** e **microfilamenti**



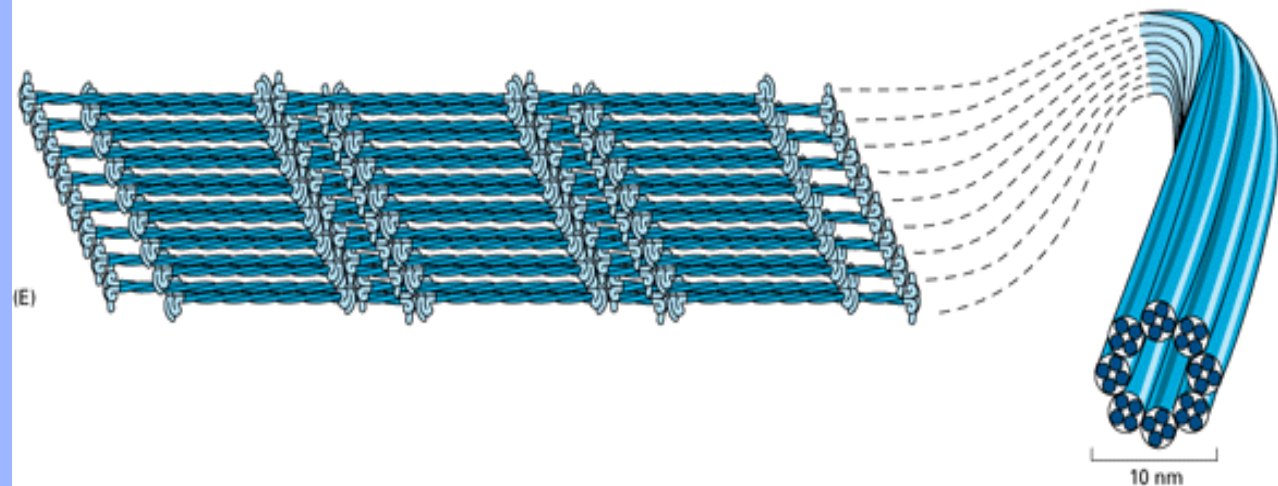
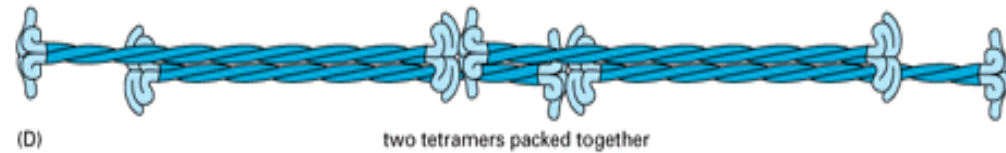
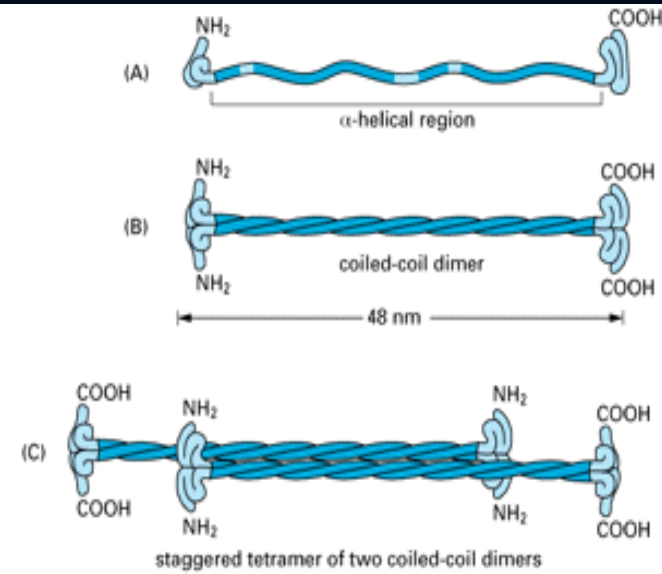
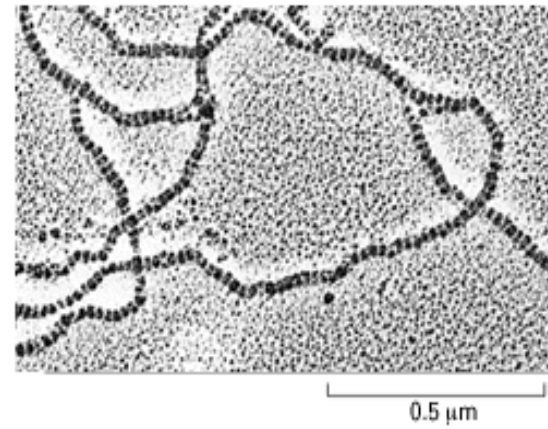


Le proteine dei IF sono **fibrose** e sono caratterizzate da un **dominio centrale ad alfa elica**, a bastoncino formato da circa 310-318 aminoacidi, che è conservato in dimensioni, struttura secondaria e in alcuni casi anche in sequenza.

Due dimeri si assemblano in modo antiparallelo e sfalsato a formare un tetramero.

I tetrameri non sono polarizzati. I tetrameri si associano tra di loro e poi si compattano insieme.

La fosforilazione di residui di serina nel dominio aminoterminale controlla l'assemblaggio.



F.I. vengono raggruppati in classi

classi I e II: comprendono le **cheratine**, proteine che organizzano i “tonofilamenti” delle cellule epiteliali che ricoprono la superficie del corpo e le sue cavità; le cheratine dure sono specifiche di capelli ed unghie.

classe III: include la **vimentina** (localizzata nei tessuti connettivi), la **desmina** (nelle cellule muscolari) e la **proteina gliale fibrillare acidica** (GFA) caratteristica delle cellule della glia

classe IV: sono le proteine dei **neurofilamenti** (NF) che strutturano gli assoni ed i prolungamenti delle cellule nervose

classe V: è costituita dalle **lamine nucleari A, B e C**, che formano una rete filamentosa lungo la faccia interna della membrana nucleare di tutte le cellule eucariote.