

IL CITOSCHELETRO

www.fisiokinesiterapia.biz

- Le cellule devono organizzarsi nello spazio e devono interagire meccanicamente con l'ambiente

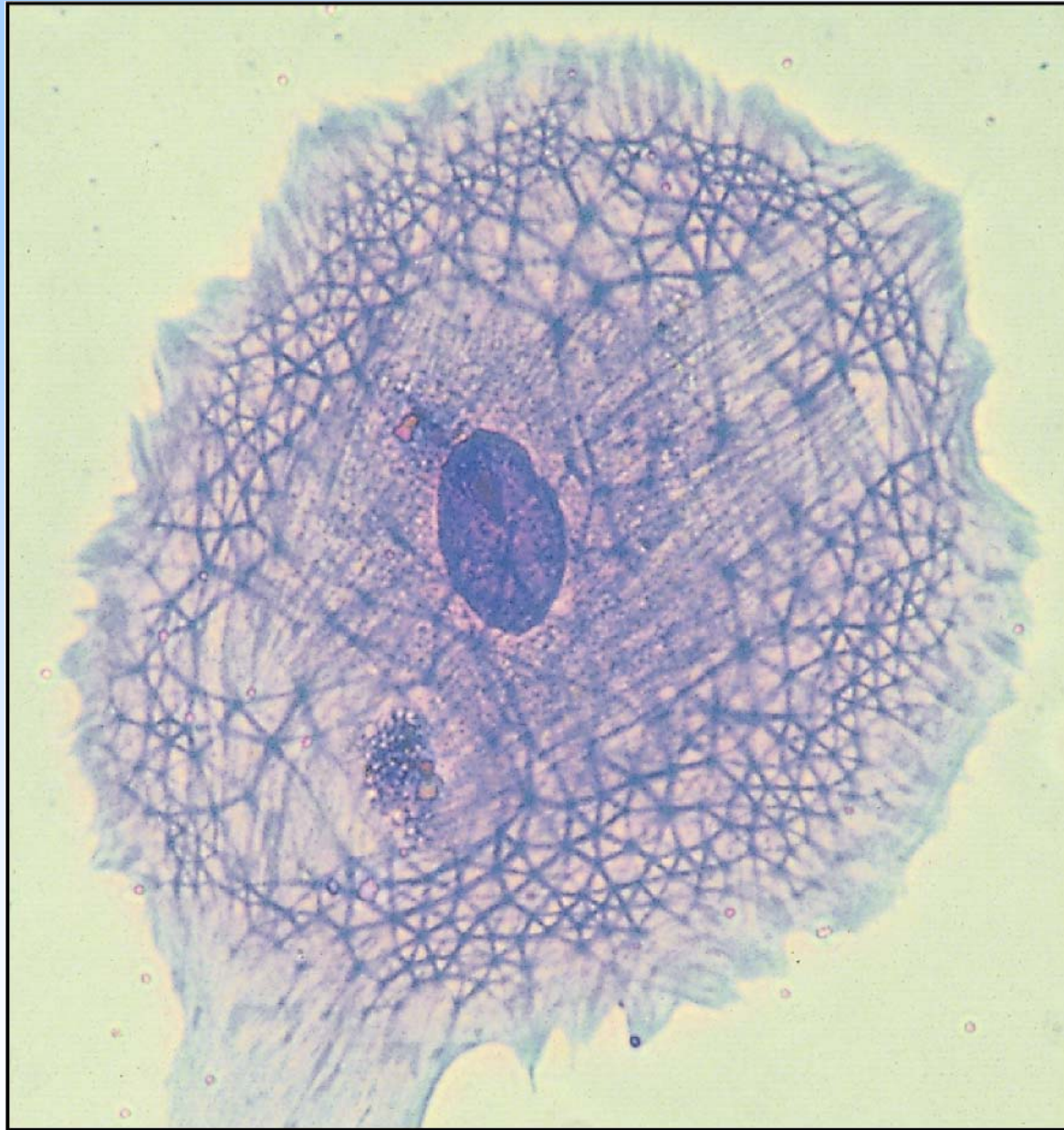
- Devono:
 - avere forma corretta
 - essere robuste
 - strutturate internamente correttamente

- Molte cellule devono anche cambiare forma e muoversi
- Tutte le cellule devono essere in grado di riarrangiare i loro componenti interni mentre crescono, si dividono e si adattano alle varie circostanze mutevoli

Il citoscheletro:

- esercita trazione sui cromosomi allontanandoli durante la mitosi e poi taglia la cellula in due nella divisione
- spinge e guida il traffico intracellulare di organelli e di vescicole
- sostiene la fragile membrana plasmatica, fornisce i collegamenti meccanici che permettono alla cellula di sopportare stress e tensioni

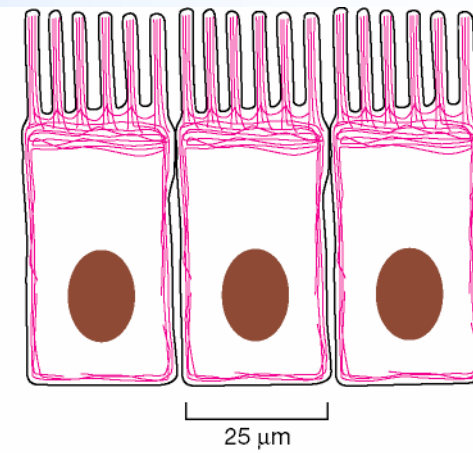
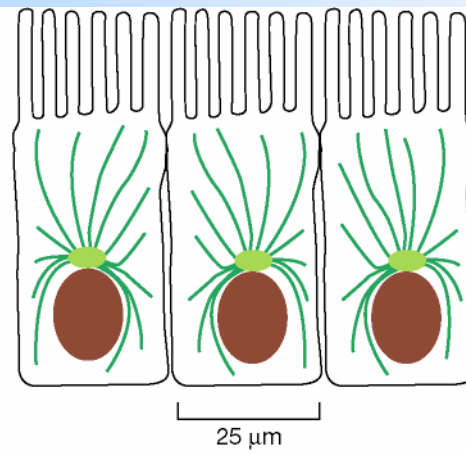
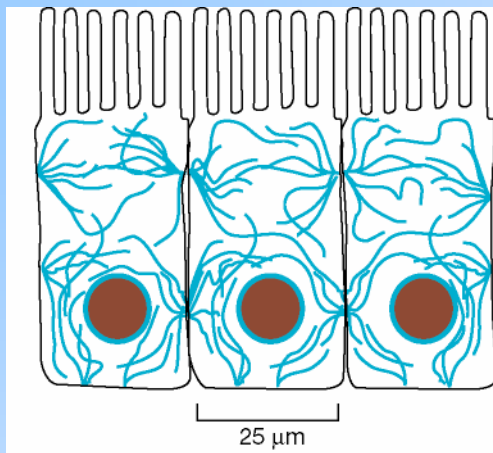
- permette a cellule di muoversi (fibroblasti e globuli bianchi)
- permette a cellule di nuotare (spermatozoi)
- fornisce il macchinario della cellula muscolare per la contrazione
- permette al neurone di estendere i dendriti e l'assone



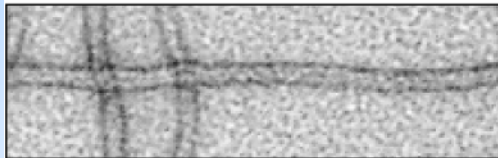
10 μm

- ✓ Le diverse funzioni del citoscheletro si basano sul comportamento di tre famiglie di proteine, che si assemblano a formare tre tipi principali di filamenti
- ✓ Ciascun tipo di filamento ha proprietà meccaniche distinte e una dinamica diversa

- I **filamenti intermedi** forniscono forza meccanica e resistenza agli stress
- I **microtubuli** determinano la posizione degli organelli racchiusi da membrana e dirigono il trasporto intracellulare
- I **filamenti di actina** determinano la forma della superficie cellulare e sono necessari per la locomozione della cellula

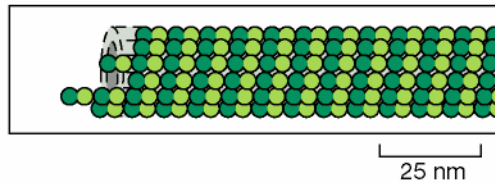
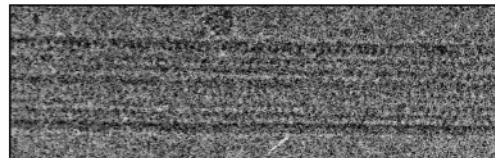


FILAMENTI INTERMEDI



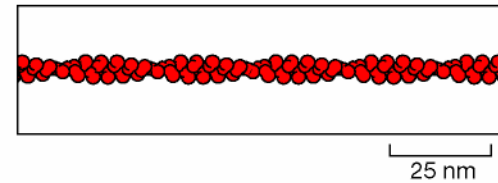
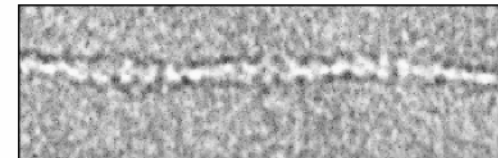
I **filamenti intermedi** sono fibre simili a corde del diametro di 10 nm circa; sono costituite dalle proteine dei filamenti intermedi, una grande famiglia di molecole piuttosto eterogenea. I filamenti intermedi di un certo tipo formano un tessuto subito sotto la membrana nucleare, che si chiama lamina nucleare. Altri tipi si estendono nel citoplasma, irrobustendo le cellule e distribuendo le sollecitazioni meccaniche cui va soggetto il tessuto epiteliale; a questo scopo attraversano tutto il citoplasma da una giunzione cellulare all'altra. (Foto al microscopio gentilmente concessa da R. Quinlan.)

MICROTUBULI



I **microtubuli** sono lunghi cilindri cavi costituiti da una proteina, la tubulina. Hanno un diametro di 25 nm e sono più rigidi dei filamenti actinici o di quelli intermedi. I microtubuli sono lunghi e dritti; generalmente presentano una estremità attaccata a un unico centro organizzatore dei microtubuli, il *centrosoma*. (Foto al microscopio gentilmente concessa da R. Wade.)

FILAMENTI ACTINICI



I **filamenti actinici** (noti anche come *microfilamenti*) sono polimeri elicoidali di una proteina, l'actina. Si presentano come strutture flessibili, del diametro di circa 7 nm, e si organizzano in tutta una serie di fasci lineari, reti bidimensionali e gel tridimensionali. Pur trovandosi sparsi per tutta la cellula, i filamenti di actina si concentrano particolarmente nel *cortex*, subito al di sotto della membrana plasmatica. (Foto al microscopio gentilmente concessa da R. Craig.)

- Le singole molecole proteiche del citoscheletro sono generalmente lunghe pochi nm, ma la cellula è in grado di costruire dei lunghi filamenti mediante assemblaggio ripetitivo di un gran numero di piccole subunità
- Poiché queste subunità sono piccole, possono diffondere rapidamente all'interno del citoplasma, mentre i filamenti assemblati non possono farlo

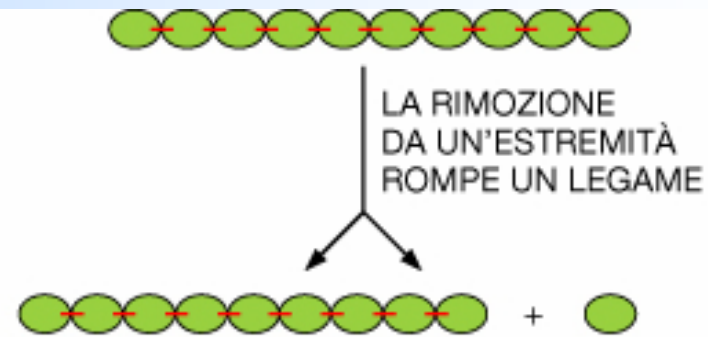
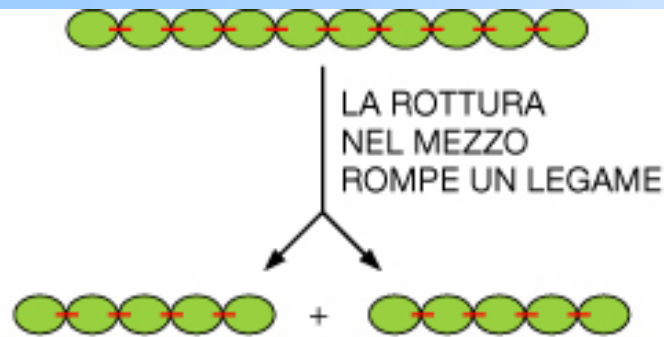
- Le cellule possono così subire rapide riorganizzazioni strutturali, disassemblando filamenti in un sito e riassemblandoli in un altro
- I filamenti intermedi sono composti da subunità più piccole, che sono esse stesse *allungate e fibrose*
- Mentre i filamenti di actina e i microtubuli sono composti da subunità che sono *globulari*

- ✓ Tutti i tre i tipi di filamenti del citoscheletro si formano come complessi elicoidali di subunità, che si autoassociano, usando una combinazione di contatti testa-coda e fianco-fianco
- ✓ Differenze nella struttura delle subunità e nell'intensità delle forze attrattive fra di loro producono differenze cruciali nella stabilità e nelle proprietà meccaniche

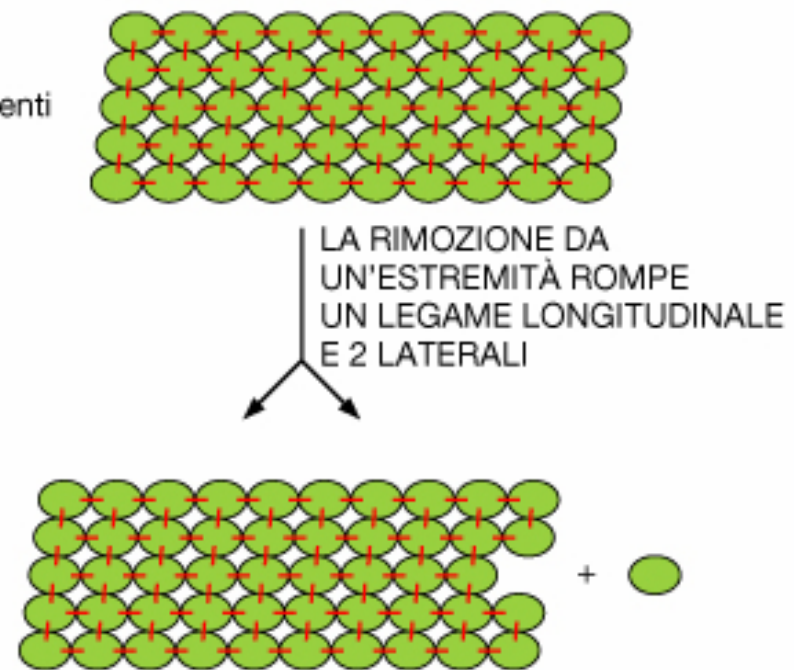
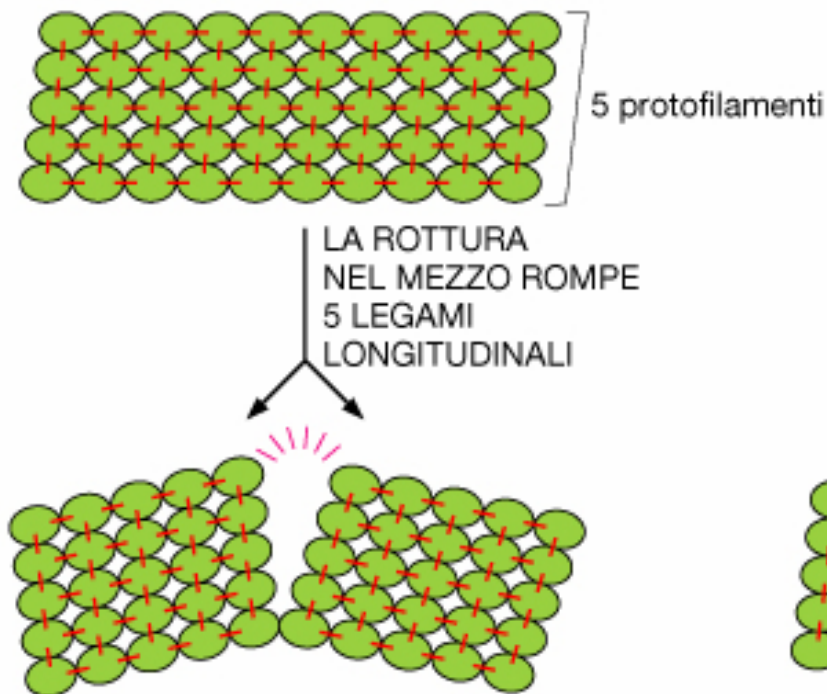
- ✓ I tre polimeri del citoscheletro sono tenuti insieme da deboli interazioni non covalenti, ciò permette che l'assemblaggio e il disassemblaggio può avvenire rapidamente
- ✓ All'interno della cellula centinaia di **proteine accessorie associate al citoscheletro** regolano la distribuzione spaziale e il comportamento dinamico dei filamenti

- ✓ I filamenti non si formano però come una semplice reazione di associazione, dove una subunità libera si attacca all'estremità di un filamento che contiene n subunità per generare un filamento di lunghezza $n+1$
- ✓ Perché un filamento così formato non avrebbe abbastanza forza da evitare rotture, in quanto i legami molecolari sono delle interazioni deboli

- ✓ Se i legami fossero covalenti limiterebbero il ritmo con cui i filamenti possono disassemblarsi, rendendo il citoscheletro una struttura statica e poco utile alla cellula
- ✓ I polimeri del citoscheletro combinano forza con adattabilità, perché sono costituiti da protofilamenti multipli - lunghe file lineari di subunità unite per le estremità - che si associano fra loro lateralmente



PROTOFILAMENTO SINGOLO: TERMICAMENTE INSTABILE



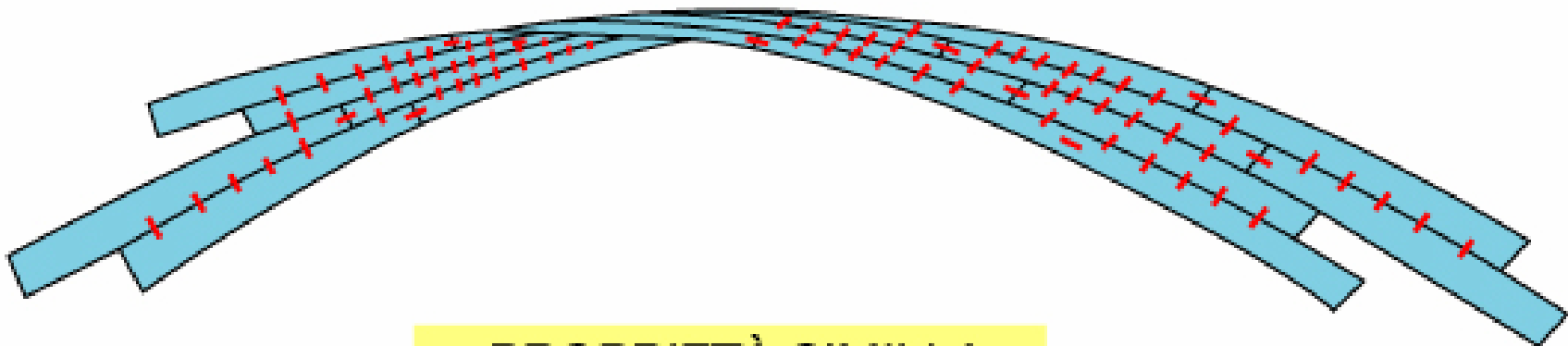
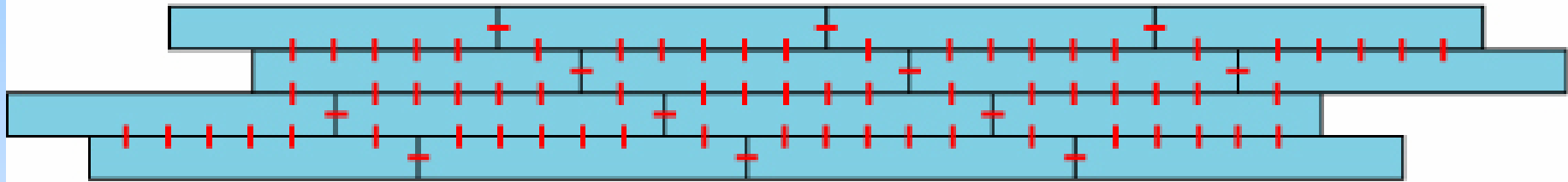
PROTOFILAMENTI MULTIPLI: TERMICAMENTE STABILI

- Le posizioni e i tipi di contatti subunità-subunità sono diversi per i tre tipi di filamenti del citoscheletro

- I **filamenti intermedi** si associano formando forti contatti laterali per la maggior parte della lunghezza di ciascuna subunità fibrosa allungata
- ✓ Poiché nel filamento le singole subunità sono **sfalsate**, i filamenti intermedi tollerano stiramento e piegatura

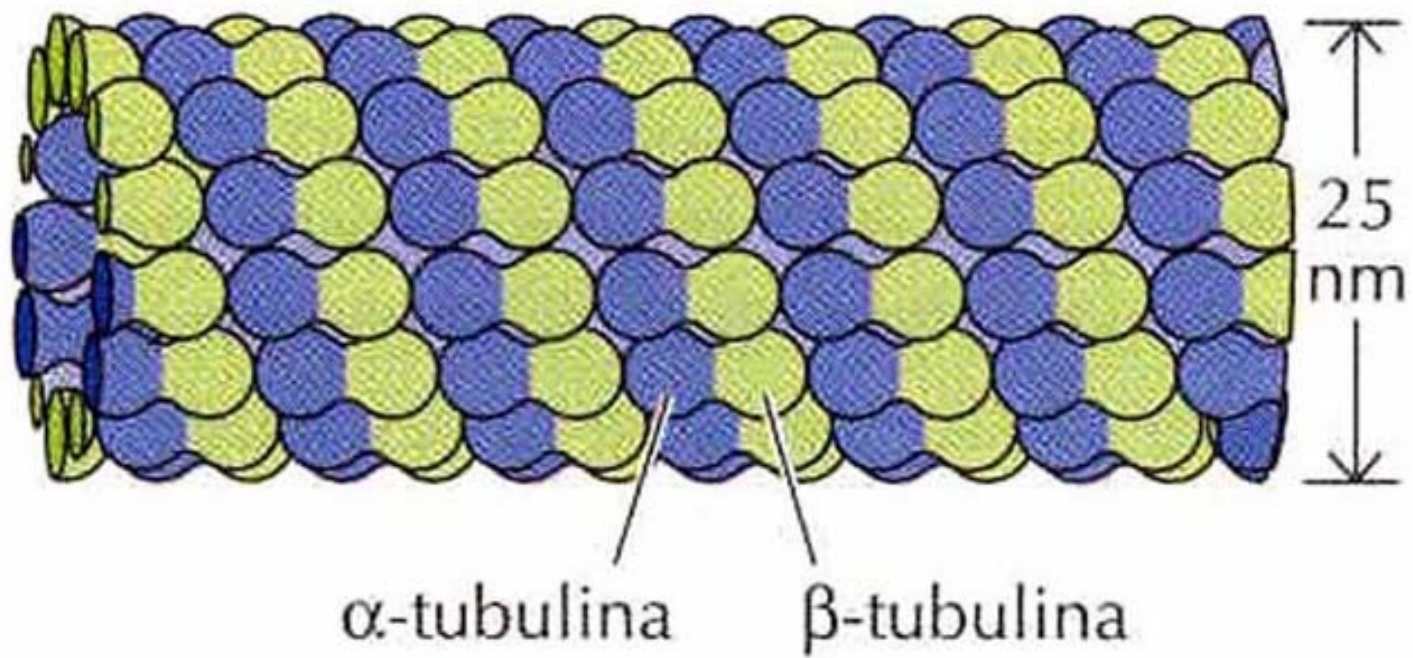
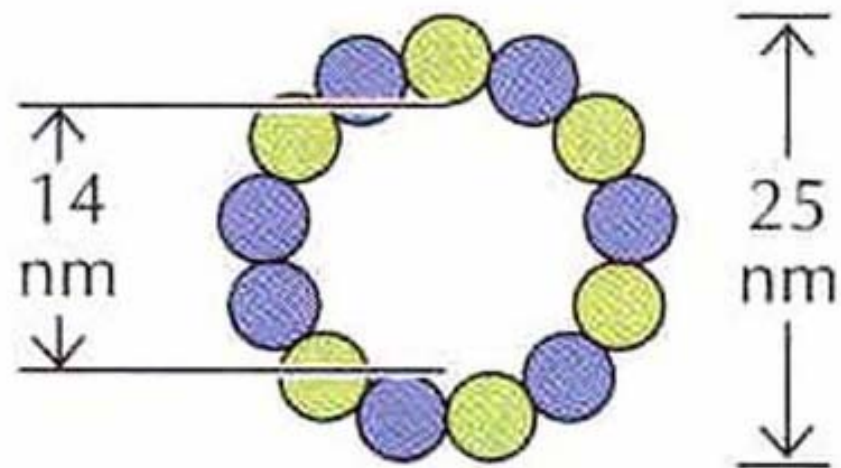
Filamenti intermedi

lunghe subunità sfalsate: dominano i contatti laterali

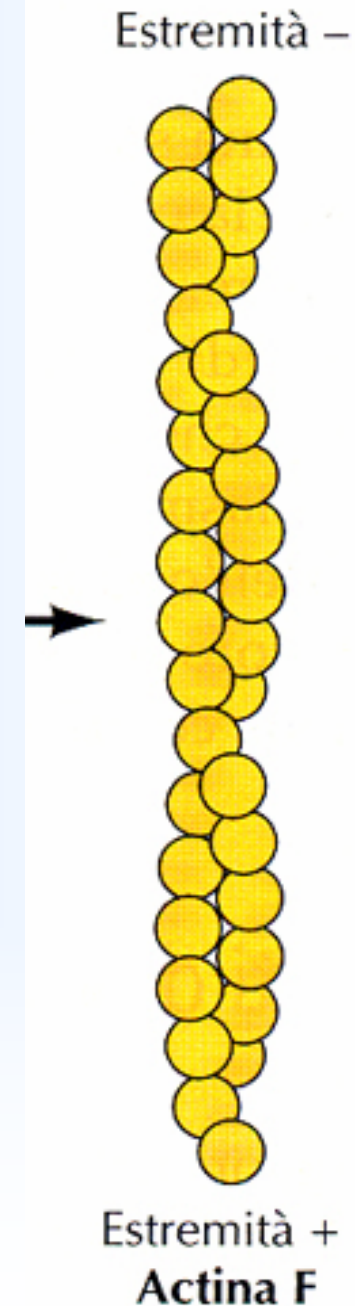


PROPRIETÀ SIMILI A
QUELLE DI UNA CORDA

- I **microtubuli** sono costituiti da subunità globulari tenute insieme da legami longitudinali e i legami laterali tengono insieme 13 protofilamenti
- ✓ Nel complesso le interazioni sono comparativamente deboli e i microtubuli si spezzano con più facilità dei filamenti intermedi



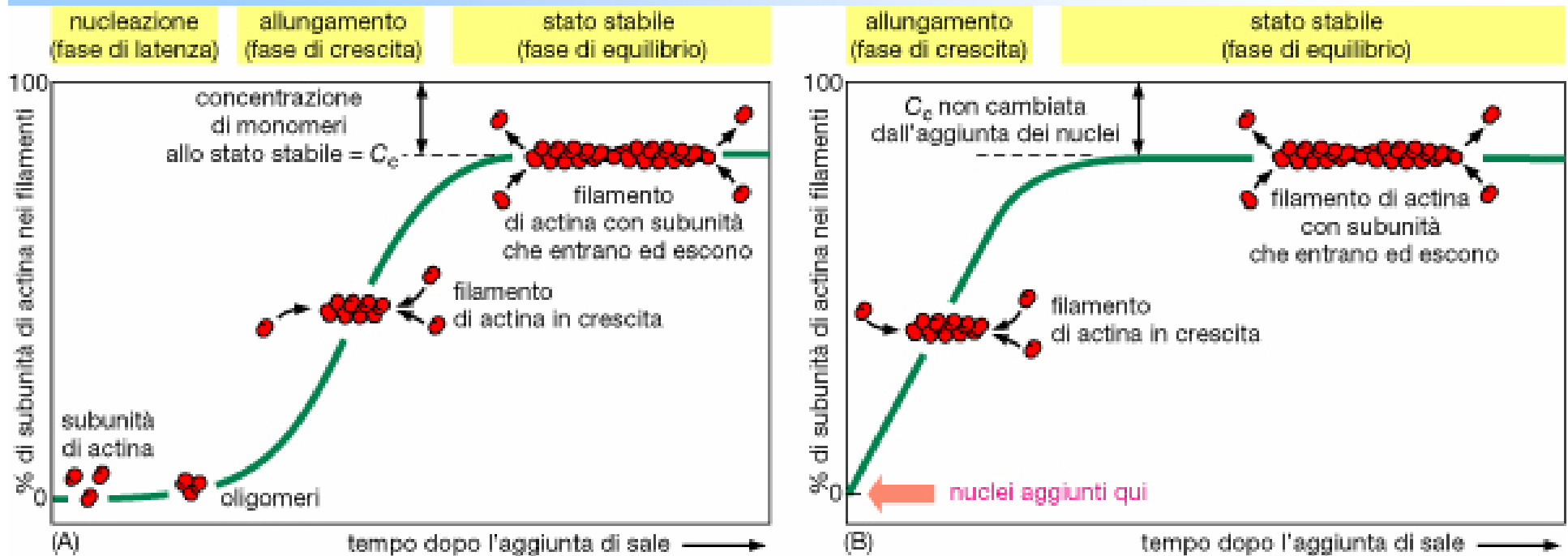
- I filamenti di actina sono formati da subunità glubulari arrangiate a "filo di perle", formando strutture +/- rigide



- Quando inizia la polimerizzazione c'è una fase di latenza iniziale durante la quale non si osservano filamenti (nucleazione). L'instabilità degli aggregati più piccoli crea una barriera cinetica alla nucleazione
- Successivamente alla fase di latenza segue una fase di rapido allungamento

- Il sistema si avvicina ad uno stato stabile in cui la velocità di aggiunta di subunità è uguale alla dissociazione
- La concentrazione di subunità libere lasciate in soluzione a questo punto è chiamata **concentrazione critica (C_c)**

$$C_c = K_{\text{off}}/K_{\text{on}}$$



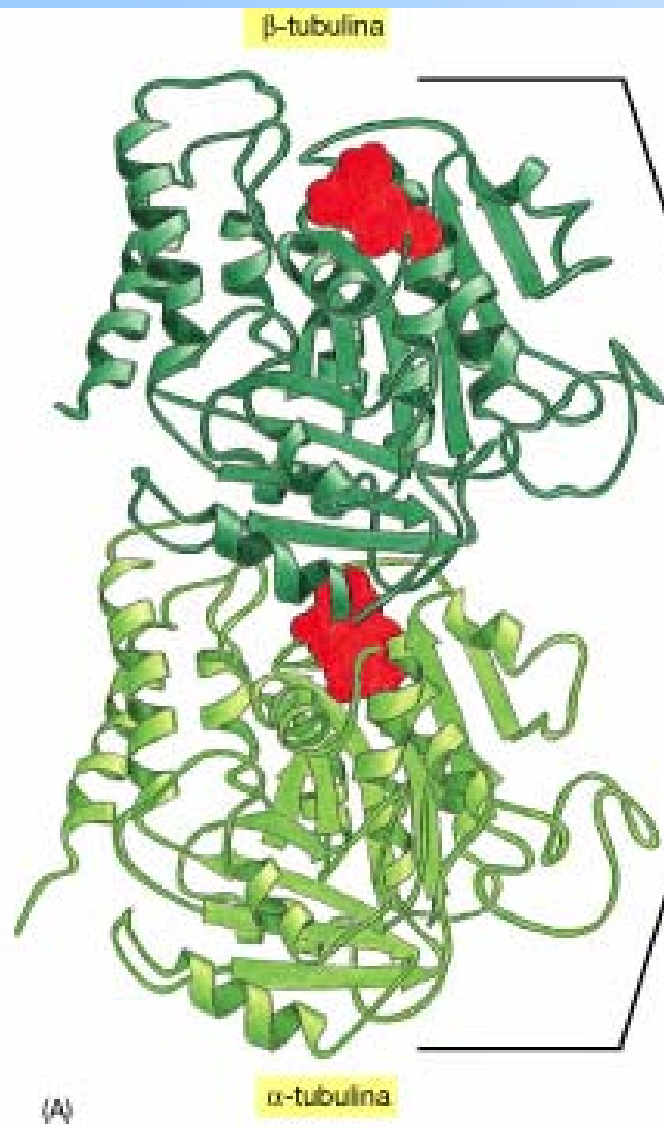
La cellula stabilisce dove catalizzare la nucleazione dei filamenti, controllando così forma e movimento cellulare

Microtubuli

- Sono formati da subunità di **tubulina** che si assemblano testa-coda, creando filamenti polari
- La subunità di tubulina è un **eterodimero** formato da due proteine, α -tubulina e β -tubulina unite strettamente da legami non covalenti
- Ciascun monomero ha un sito di legame per una molecola di GTP

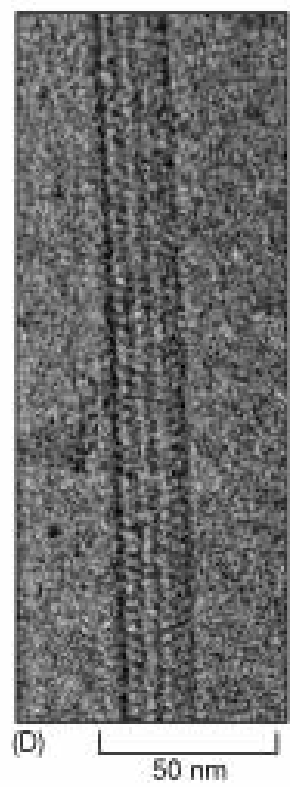
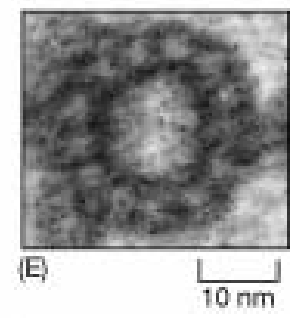
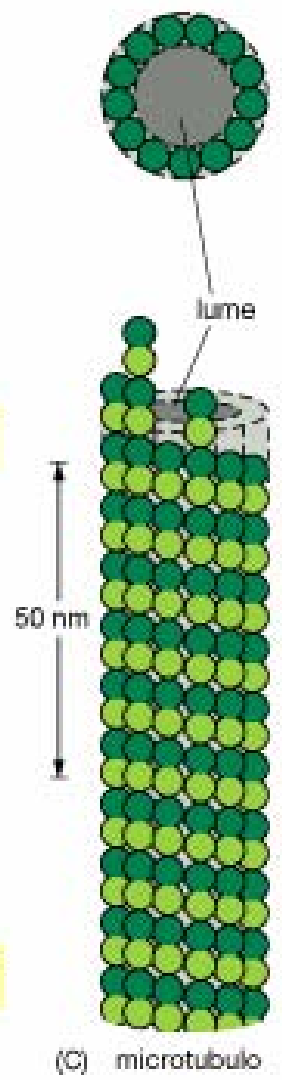
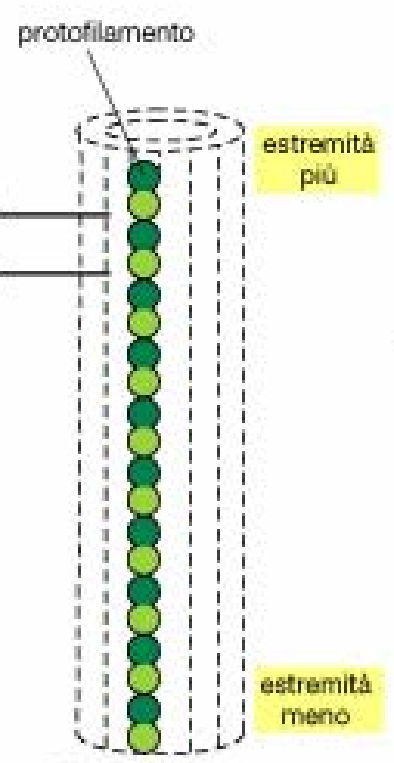
- Il GTP che è legato all' α -tubulina è fisicamente intrappolato e non viene mai idrolizzato o scambiato, si può considerare parte integrale della molecola
- Il nucleotide sulla β -tubulina, invece, può essere idrolizzato o scambiato con un effetto notevole sulla dinamica dei microtubuli

- Un microtubulo è una struttura cilindrica rigida costituita da **13 protofilamenti** paralleli, ciascuno composto da molecole alternate di α - e β -tubulina
- Il diametro esterno è di 25 nm, quello interno di circa 15 nm
- Ogni protofilamento è **leggermente sfalsato** rispetto al protofilamento di fianco, descrivendo così un'elica destrorsa



β
 α

eterodimero di tubulina
(-subunità dei microtubuli)



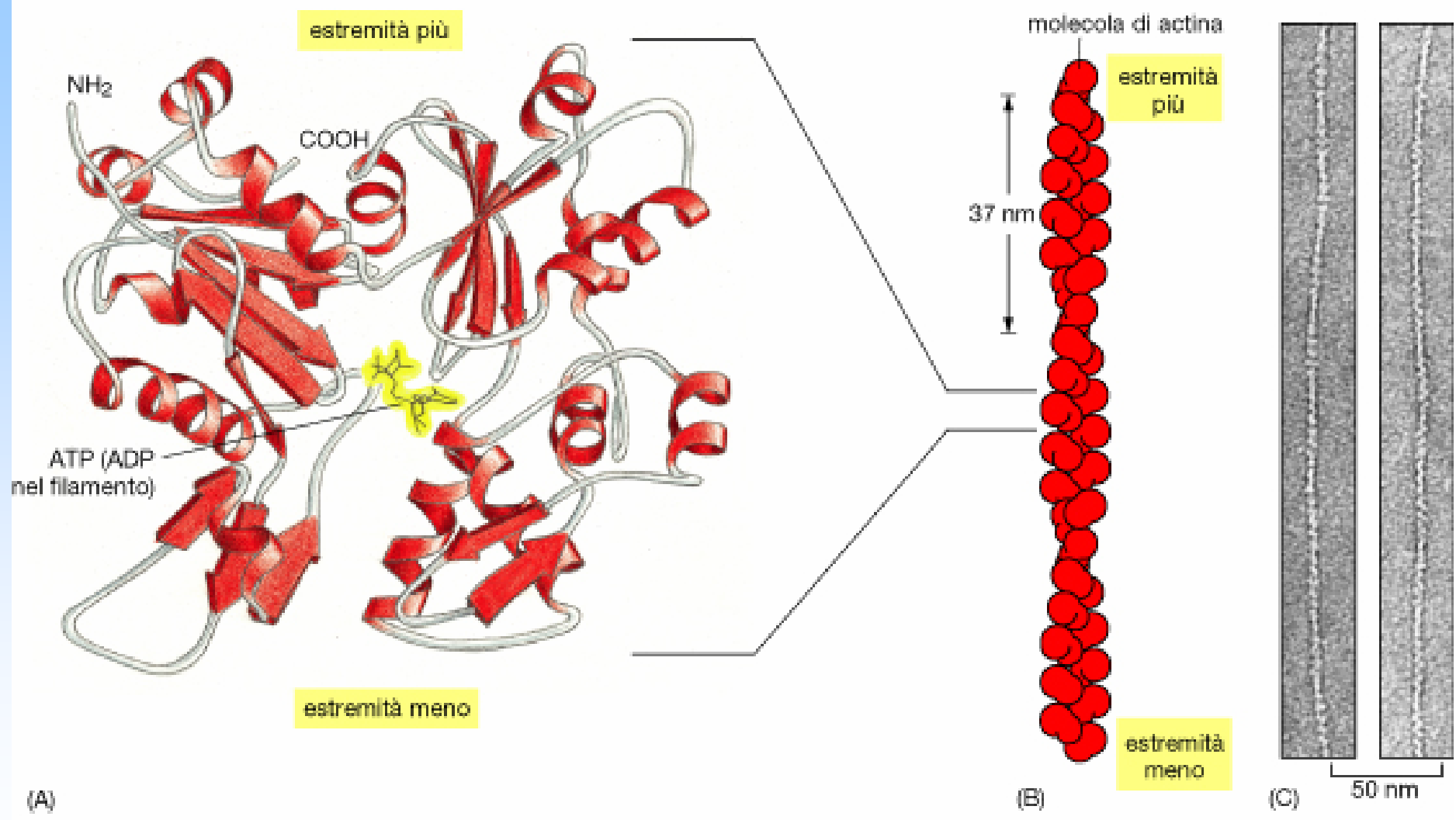
- ✓ Lungo l'asse longitudinale del microtubulo la "testa" di una molecola di β -tubulina forma un'interfaccia con la "coda" della molecola di α -tubulina della subunità adiacente
- ✓ Perpendicolarmente a queste interazioni, si formano contatti laterali principalmente tra i monomeri dello stesso tipo (alfa-alfa e beta-beta).

- ✓ L'aggiunta e la perdita di subunità avviene sempre alle estremità del microtubulo
- ✓ Il microtubulo ha una polarità strutturale, con le α -tubuline esposte da una parte (-) e le β -tubuline esposte dall'altra (+)

Filamenti di actina

- La subunità di actina è una singola proteina globulare ed è quindi un **monomero**
- Ciascuna subunità di actina ha un sito di legame per l'**ATP**
- Le subunità si assemblano testa-coda per generare filamenti con una polarità strutturale distinta

- ✓ Le subunità di actina si avvolgono l'una sull'altra in un'elica destrorsa (come un filo di perle) con diametro di 6 nm
- ✓ I filamenti di actina sono relativamente flessibili in confronto ai microtubuli
- ✓ I filamenti di actina sono uniti in senso trasversale da una varietà di proteine accessorie, che rendono queste strutture molto forti



(A)

(B)

(C)

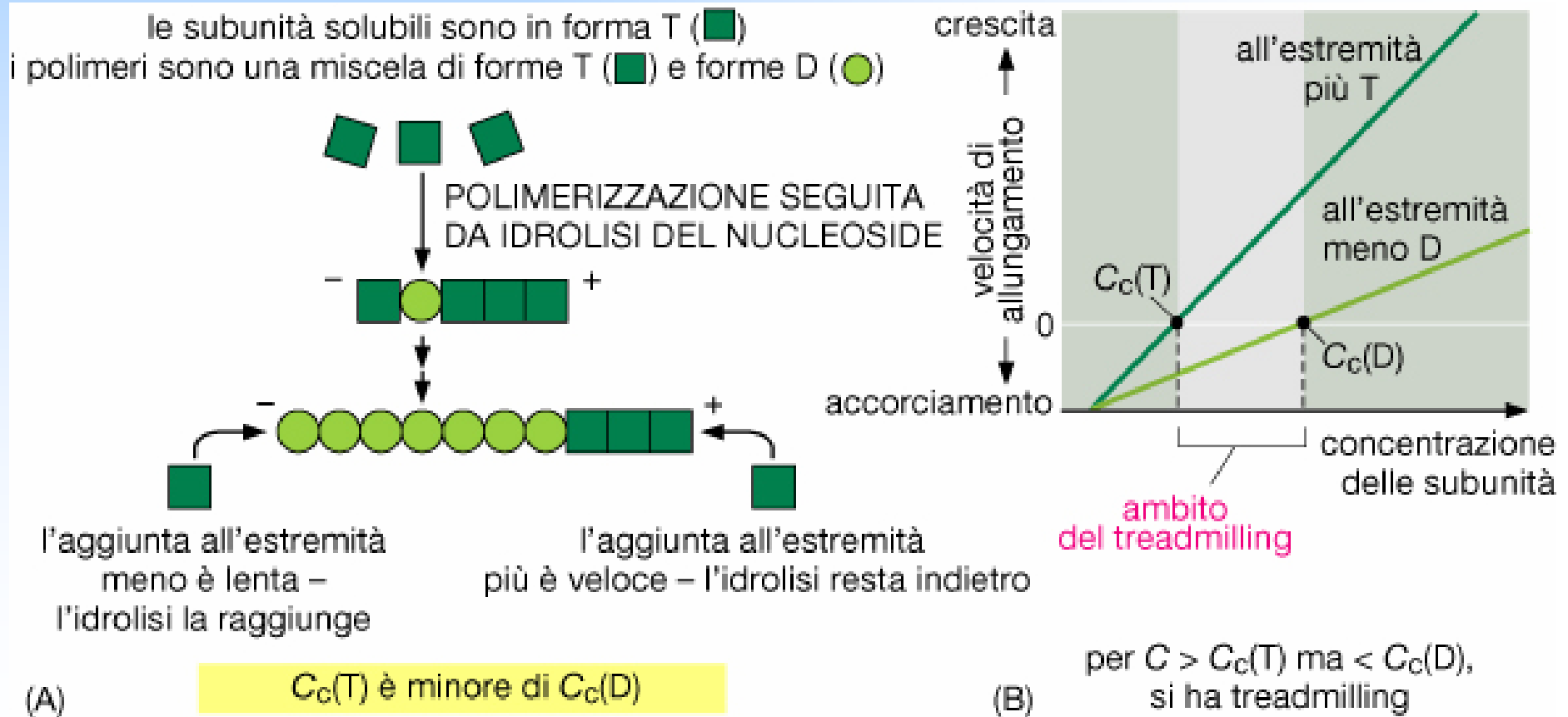
- In un filamento polare le costanti cinetiche per l'associazione e la dissociazioni k_{on} e k_{off} sono spesso molto maggiori ad un'estremità
- L'estremità più dinamica è detta + (più) mentre quella che è più lenta nell'allungamento e nell'accorciamento è detta - (meno)

- ❖ Nei microtubuli, le estremità alfa sono esposte alle estremità meno e le subunità beta sono esposte all'estremità più
- ❖ Nei filamenti di actina, la fessura che lega ATP sul monomero punta verso l'estremità meno

- ✓ Actina e tubulina sono entrambe enzimi che possono idrolizzare un nucleoside trifosfato
- ✓ L'idrolisi è molto lenta per le subunità libere, ma accelera quando vengono incorporate nei filamenti
- ✓ Dopo l'incorporazione nel filamento si ha idrolisi del nucleotide, ma il nucleoside difosfato rimane intrappolato nella struttura del filamento

- ✓ Due tipi diversi di strutture di filamenti, una con la "forma T" del nucleotide attaccato e una con la "forma D"
- ✓ L'energia di idrolisi è immagazzinata nel filamento, rendendo favorevole la dissociazione della forma D rispetto la T
- ✓ La costante di equilibrio per la dissociazione della forma D ($K_D = K_{off}/K_{on}$) che è uguale alla $Cc(D)$ è maggiore della $K_T (= Cc(T))$

Per certe concentrazioni di subunità libere, le forme D del polimero si accorceranno, mentre le forme T cresceranno (**treadmilling**)



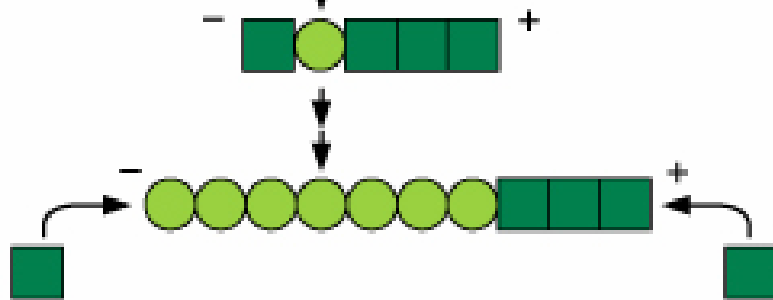
- ✓ Nella cellula la maggior parte delle subunità libere è nella forma T, poiché le concentrazioni di ATP e GTP sono maggiori di ADP e GDP
- ✓ Più lungo è il tempo che le subunità hanno passato nel filamento più è probabile che abbiano idrolizzato il nucleotide

- ✓ Una estremità si troverà nella forma T o D in relazione alla **velocità relativa di aggiunta di subunità e di idrolisi**
- ✓ Ad un'alta velocità di aggiunta di subunità il filamento crescerà rapidamente per cui è probabile che una nuova subunità si aggiunga prima che il nucleotide precedente sia idrolizzato. Formandosi così un **cappuccio T**

- Se la velocità di aggiunta è lenta l'idrolisi si può verificare prima dell'aggiunta della successiva subunità e la punta del filamento sarà allora nella forma D
- Ad una concentrazione intermedia di subunità libere è perciò possibile che la velocità di aggiunta di subunità è maggiore della velocità di idrolisi all'estremità più, mentre per l'estremità meno è il contrario

- In questo caso l'estremità più rimane in conformazione T e l'estremità meno in conformazione D
- Avendo la forma D una Cc più alta della forma T, la forma D ha una maggior tendenza al *disassemblaggio*, mentre la T ha una maggior tendenza all'*assemblaggio* (**treadmilling**)

le subunità solubili sono in forma T (■)
 i polimeri sono una miscela di forme T (■) e forme D (●)

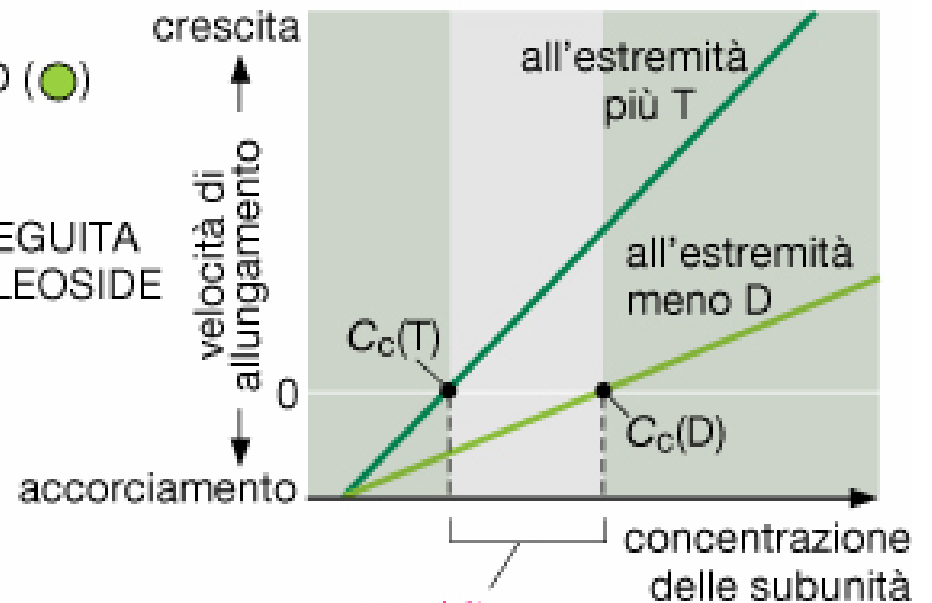


l'aggiunta all'estremità
 meno è lenta –
 l'idrolisi la raggiunge

l'aggiunta all'estremità
 più è veloce – l'idrolisi resta indietro

(A)

$C_c(T)$ è minore di $C_c(D)$

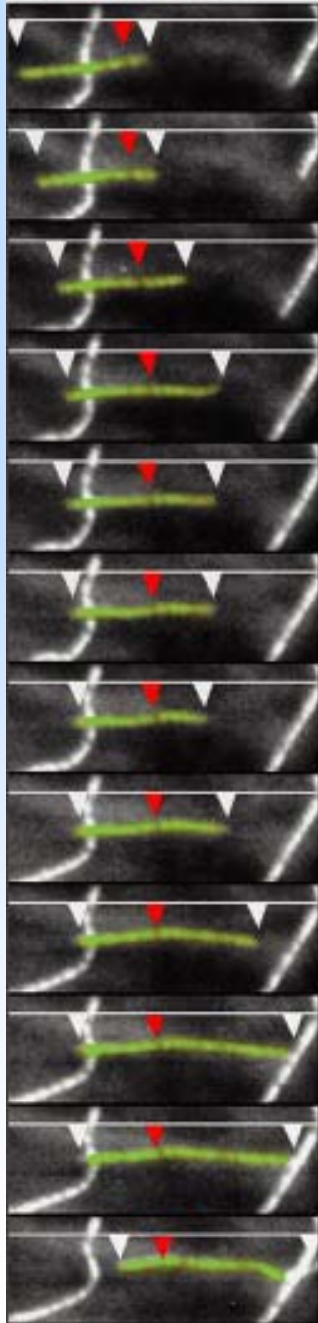


(B)

per $C > C_c(T)$ ma $< C_c(D)$,
 si ha treadmilling

- Ad una particolare concentrazione intermedia di subunità, la crescita del filamento all'estremità *più* è perfettamente bilanciata dall'accorciamento dell'estremità *meno*
- Dunque le subunità **ciclano** rapidamente fra lo stato libero e quello incorporato nel filamento, mentre la lunghezza del filamento rimane invariata

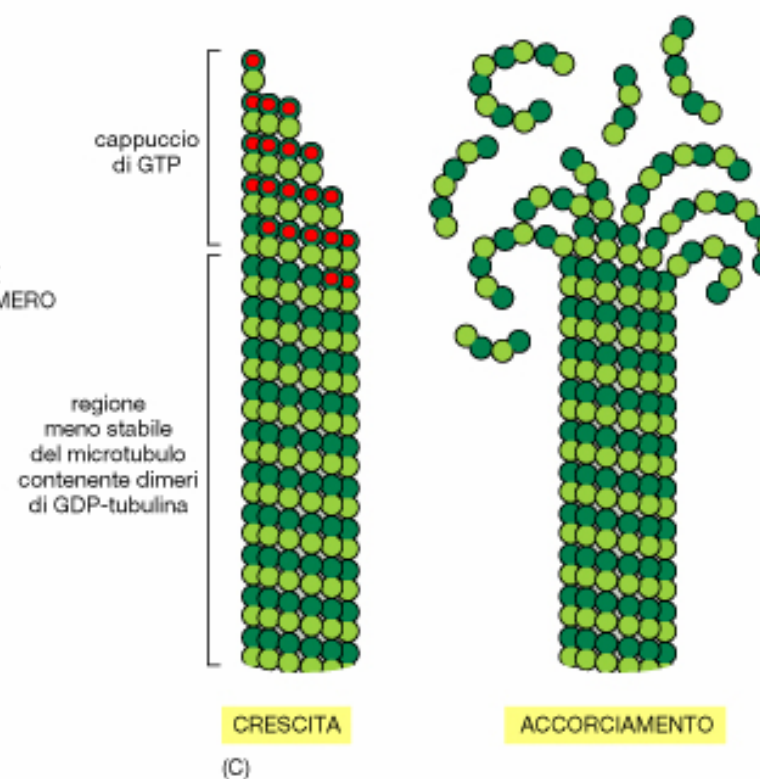
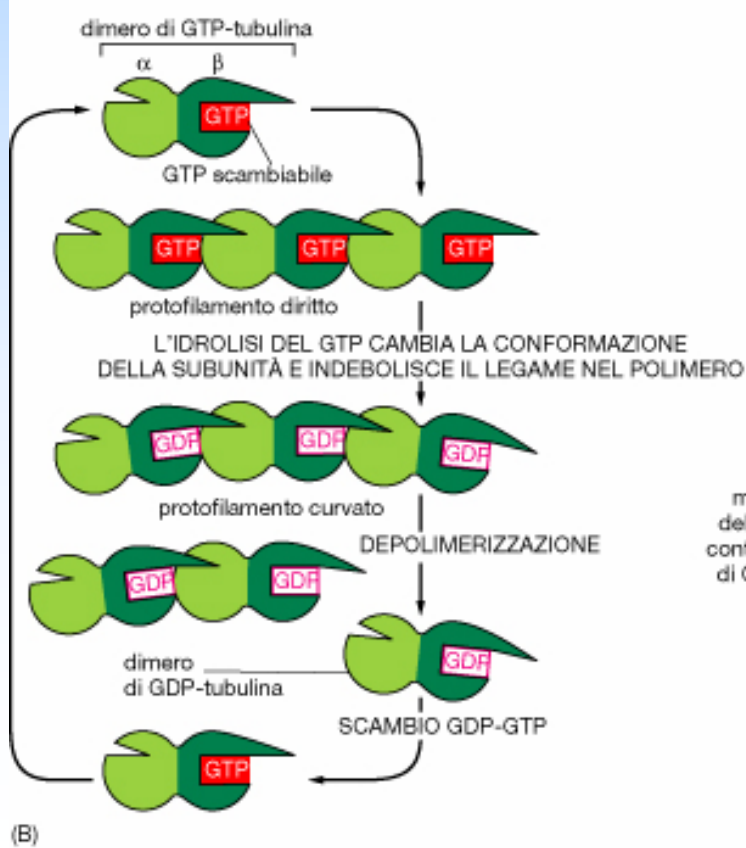
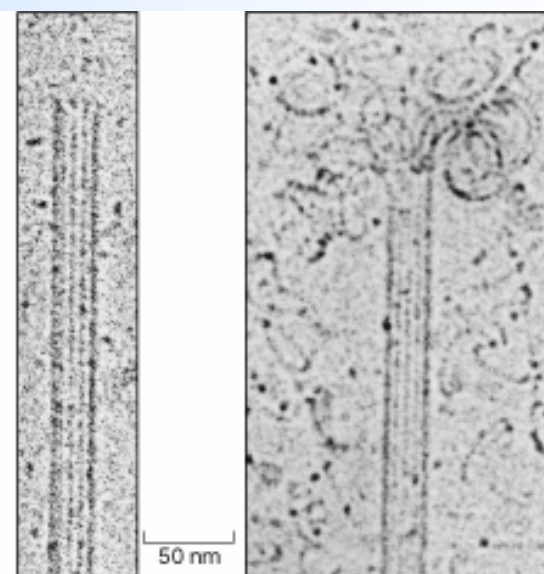
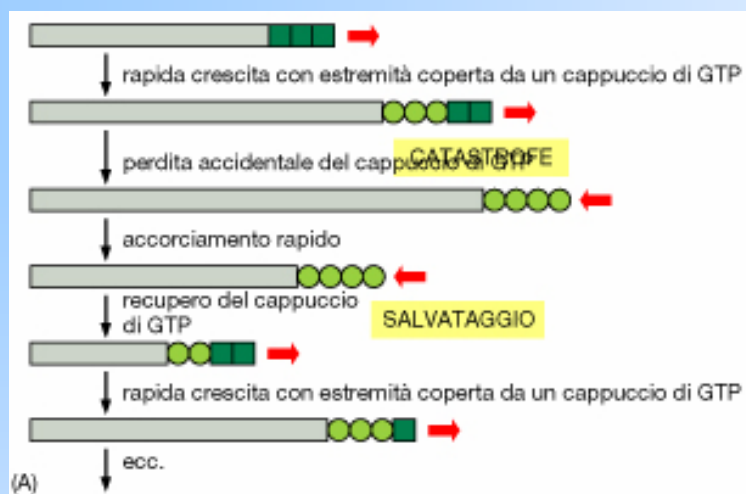
tempo 0 secondi



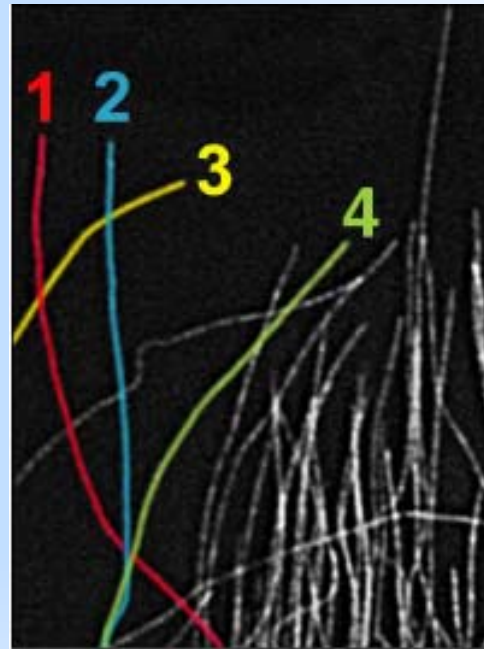
tempo
89 secondi



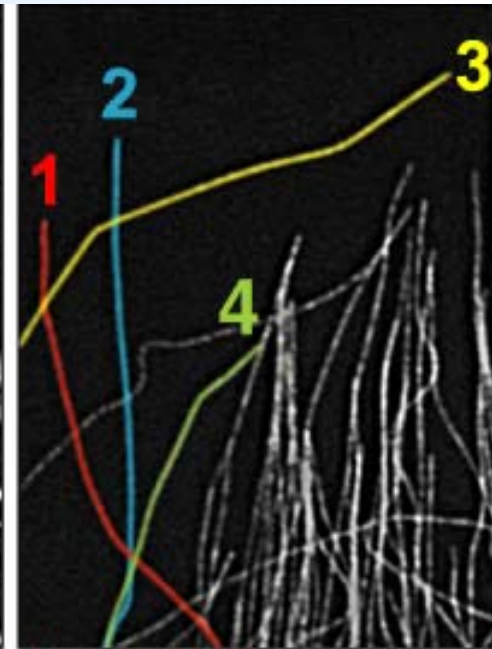
- Il cambiamento verso un accorciamento rapido, si chiama **catastrofe**, mentre quello verso la crescita si chiama **salvataggio**
- Si pensa che nelle cellule l'*instabilità dinamica* predomini nei microtubuli, mentre il *treadmilling* predomini nei filamenti di actina



Di norma un microtubulo scatta tra fase di crescita e di accorciamento varie volte al minuto

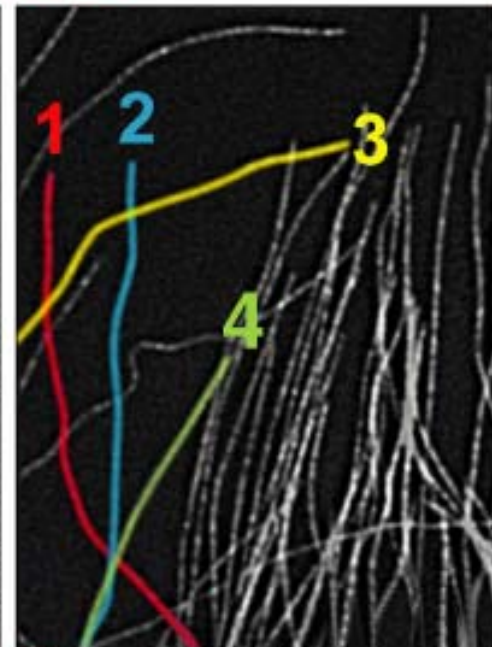
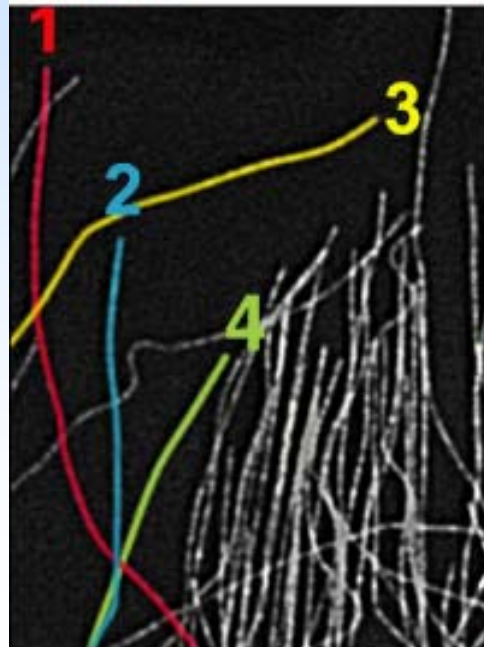


tempo 0 sec



125 sec

307 sec



669 sec

10 μm

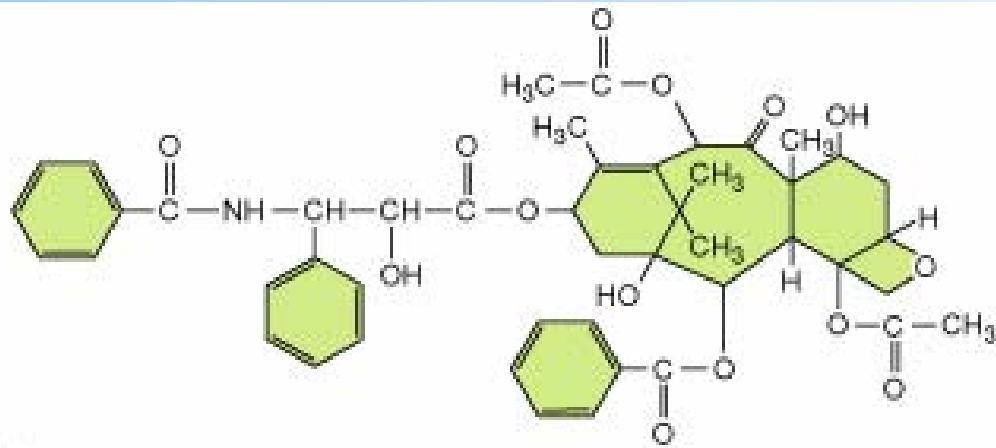
- ❖ Il treadmilling e l'instabilità dinamica richiedono costantemente energia ma sono utili per la cellula:
 - avvantaggiando la flessibilità spaziale e temporale
 - controllando la forma e la struttura della cellula
 - evitando il passaggio critico della nucleazione

- ✓ In varie cellule specializzate parti del citoscheletro diventano meno dinamiche
- ✓ Nei neuroni, per esempio, è auspicabile mantenere una struttura costante nel tempo, dunque i filamenti di actina e i microtubuli sono stabilizzati per associazione con altre proteine

- Sostanze specifiche che influenzano i filamenti citoscheletrici di actina:
 - falloidina si lega ai filamenti e li stabilizza
 - citocalasina incappuccia le estremità più dei filamenti
 - latrunculina si lega alle subunità impedendone la polimerizzazione

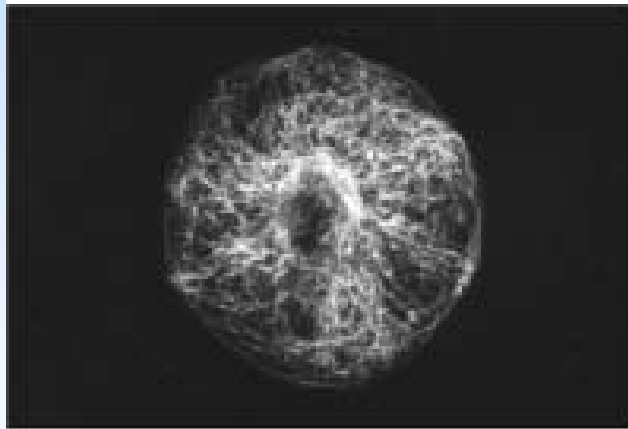
➤ Sostanze specifiche per i microtubuli:

- taxolo si lega ai microtubuli stabilizzandoli
- colchicina, colcemid, vinblastina, vincristina e nocodazolo si legano alle subunità e ne impediscono la polimerizzazione



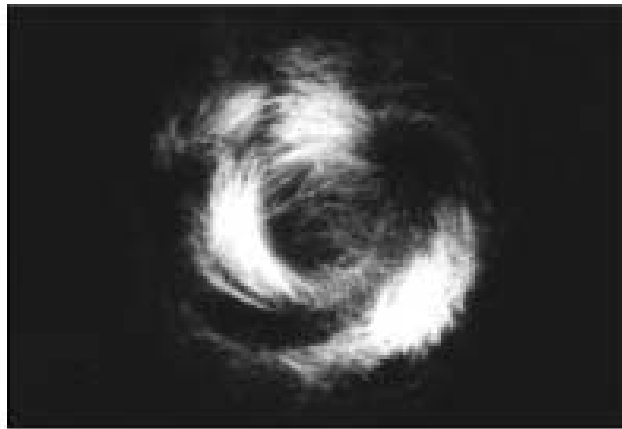
(A)

taxolo



(B)

15 μ m

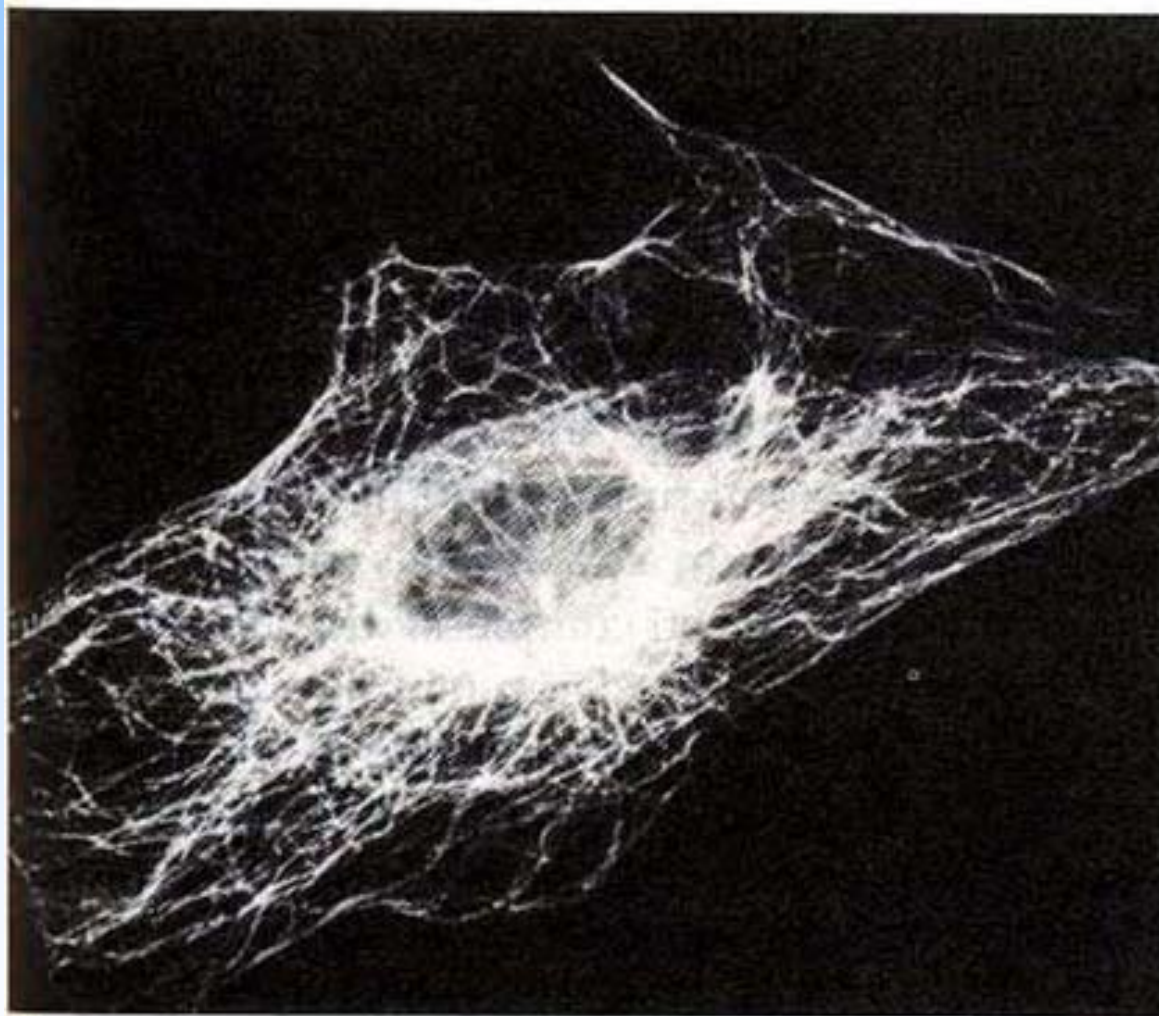


(C)



(D)

Effetto del taxolo sull'organizzazione dei microtubuli



(A)



(B)

10 μm