

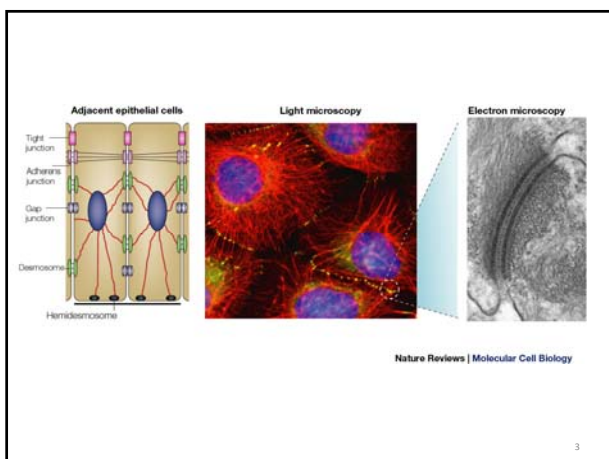
Intermediate filaments may function to integrate mechanically the various structures of the cytoplasmic space in a way that is tailored to the differentiated state of the cell.
Elias Lazarides, 1980 (ref. 1)

I filamenti intermedi possono funzionare per integrare meccanicamente le diverse strutture dello spazio citoplasmatico in un modo che è «cucito su misura» allo stato di differenziamento della cellula

Citoscheletro

Filamenti Intermedi

1



3

Coulombe PA, Wong P. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. Nat Cell Biol. 6: 699-706, 2004.

- ✚ I **filamenti intermedi** sono polimeri citoscheletrici codificati da una grande famiglia di **geni espressi in modo differenziale** che forniscono un **sostegno strutturale** cruciale al citoplasma e al nucleo degli eucarioti superiori.
- ✚ Perturbazioni della loro funzione spiegano diverse patologie determinate geneticamente in cui **le cellule fragilizzate non sono in grado di reggere stress meccanici e non-meccanici**.
- ✚ Studi recenti chiariscono come il **sostegno strutturale** sia **modulato per affrontare le necessità mutevoli delle cellule** e rivelano un nuovo ruolo tramite il quale i filamenti intermedi influenzano la crescita e la morte cellulare mediante interazioni dinamiche con proteine non-strutturali.

Adattato da Newsletter della Biomedica, Summer 1996, Volume 1, Issue 1

Herrmann H, Strelkov SV, Burkhard P, Aebi U. Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. J Clin Invest. 119:1772-1783, 2009.

- ✚ I **filamenti intermedi** (IFs) sono i principali costituenti del citoscheletro e dell'interfaccia col nucleo delle cellule animali.
- ✚ Svolgono ruoli di importanza fondamentale **nell'organizzazione degli elementi strutturali**.
- ✚ A seconda del **tipo cellulare, proteine morfologicamente simili ma distinte biochimicamente** formano **filamenti ad elevata viscoelasticità** che svolgono molteplici funzioni nanomeccaniche.
- ✚ Oltre al loro ruolo primario nella plasticità cellulare e alla loro funzione già ben stabilita di **ammortizzatori per gli stress cellulari**, alterazioni geniche recentemente identificate hanno elucidato che **le alterazioni strutturali degli IFs possono influenzare il loro coinvolgimento sia nelle vie di segnalamento che nelle reti di geni regolatori**.
- ✚ In questo articolo evidenziamo le proprietà strutturali e funzionali basiche degli IFs e ricaviamo un concetto su come le mutazioni possano influenzare l'architettura cellulare e perciò la costruzione e la fisiologia dei tessuti.

FILAMENTI INTERMEDI (1)

- ✚ Hanno diverse **proprietà caratteristiche** che li **distinguono dai microfilamenti e dai microtubuli**:
 - Sono **biochimicamente** molto più **eterogenei**:
 - ✳ Esistono subunità dei filamenti intermedi **diverse**, **ma correlate evolutivamente**, che sono spesso **espresse in modo tessuto-dipendente**.
 - Hanno **grande forze tensile**; es:
 - ✳ Peli e unghie: consistono principalmente di filamenti intermedi delle cellule morte

FILAMENTI INTERMEDI (2)

- ✚ **NON hanno una polarità intrinseca** come i microfilamenti e i microtubuli, e le loro unità costituenti **NON si legano ad un nucleotide**.
- ✚ Dato che non hanno polarità intrinseca **non si conoscono proteine motori che li usino come rotaie**
- ✚ Nonostante siano dinamici in termini di scambio di subunità, sono **molto più stabili** dei microfilamenti e i microtubuli dato che la velocità di scambio è molto più lenta.
- ✚ NON si trovano in tutti gli eucarioti:
 - I funghi e le piante non hanno filamenti intermedi
- ✚ Gli insetti hanno soltanto una classe, rappresentata da due geni che esprimono le lamine A/C e B (FI che sorreggono l'involucro nucleare).

Caratteristiche dei Filamenti Intermedi

- ✚ Stabili, resistenti.
- ✚ 8 – 10 nm di diametro.
- ✚ Prominenti nelle **cellule che debbono resistere a stress meccanici**.
- ✚ Insolubili in soluzioni concentrate di sali e detergenti non ionici.
- ✚ IFs caratteristici e **specifici per i diversi tipi di tessuti**.
- ✚ Si possono sciogliere con urea (potente denaturante delle proteine).

Filamenti intermedi

Struttura

FI: Struttura (1)

- ✚ Ogni isoforma delle proteine dei FI ha una sequenza aminoacidica caratteristica, ma tutti hanno un **dominio a bastoncino** fra i domini di testa e coda con dimensione variabile presenti alle due estremità.
- ✚ Il bastoncino è un "coiled-coil" parallelo di due α -eliche, di solito lungo circa 47 nm.
- ✚ Come gli altri "coiled-coils", i domini a bastoncino dei FI hanno una ripetizione di sette AA, in cui il primo e quarto residui forniscono una riga continua di **interazioni idrofobiche** lungo la l'interfaccia fra le due eliche.

FI: Struttura (2)

- ✚ Zone di carica positiva e negativa si alternano lungo il bastoncino.
 - Quando **sfalsate** in modo corretto, queste zone forniscono **legami elettrostatici complementari** per l'assemblaggio dei filamenti.
- ✚ Circa 20 residui altamente conservati ad ogni estremità del bastoncino sono essenziali per l'allungamento del filamento mediante **interazioni testa-coda fra molecole dimeriche**.
- ✚ Studi con proteine mutanti suggeriscono che queste zone del bastoncino contribuiscono alle associazioni laterali all'interno dei filamenti.
- ✚ Sequenze aminoacidiche indicano la presenza di tre interruzioni nel "coiled-coil"

ETEROGENEITÀ MOLECOLARE DEI FILAMENTI INTERMEDI - 1

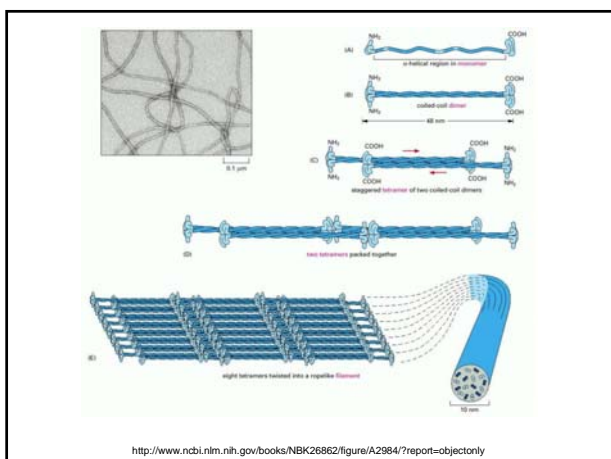
- ✚ Mentre i filamenti di **actina** e i **microtubuli** sono **polimeri di un unico tipo di proteina** (actina e tubulina, rispettivamente), i **filamenti intermedi** (FI) sono composti da una **gran varietà di proteine che sono espresse da tipi cellulari diversi**.
- ✚ Sono stati identificati più di 65 proteine diverse di FI, che sono state classificate in sei gruppi in base alle somiglianze di sequenze aminoacidiche.

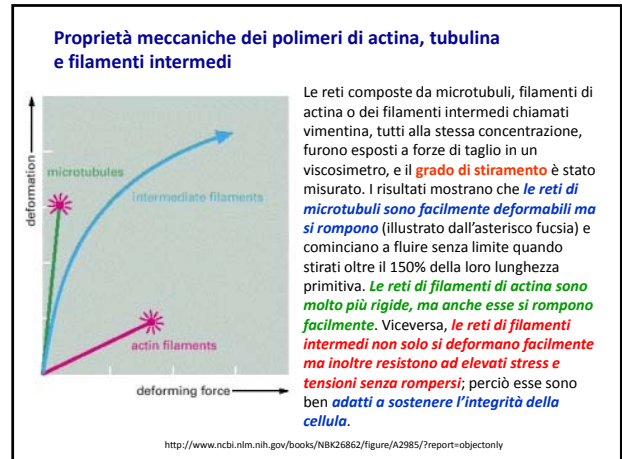
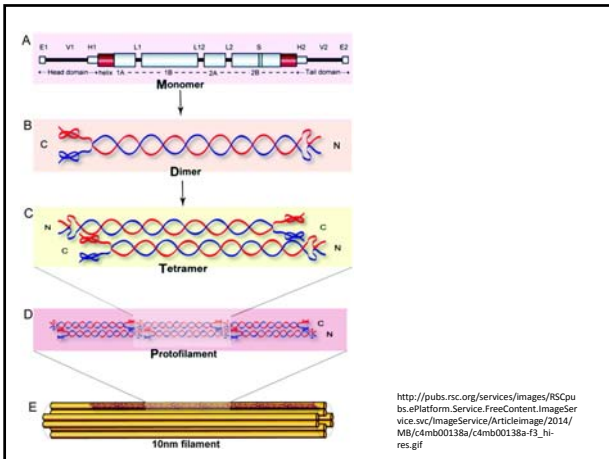
Filamenti intermedi

Polimerizzazione

Livelli di organizzazione ed assemblaggio dei filamenti intermedi

- + Le proteine dei filamenti intermedi (IF) formano **omo-** ed **eterodimeri** con un **dominio altamente conservato ad alfa-elica e code e teste non elicoidali**, che hanno **dimensione e sequenza di aminoacidi variabili**.
 - Il dominio "core" centrale contiene tre elementi spaziatori non elicoidali.
- + Un tetramero si forma mediante **aggregazione sfalsata, antiparallela di due dimeri identici**.
 - I tetrameri si aggregano coda contro coda, formando un protofilamento;
 - Successivamente, copie di protofilamenti si associano lateralmente formando una protofibrilla. L'associazione laterale di quattro protofibrille forma un cilindro con 10 nm di spessore.

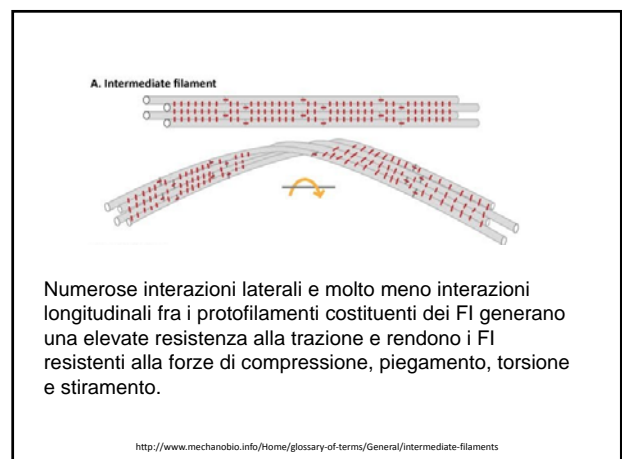


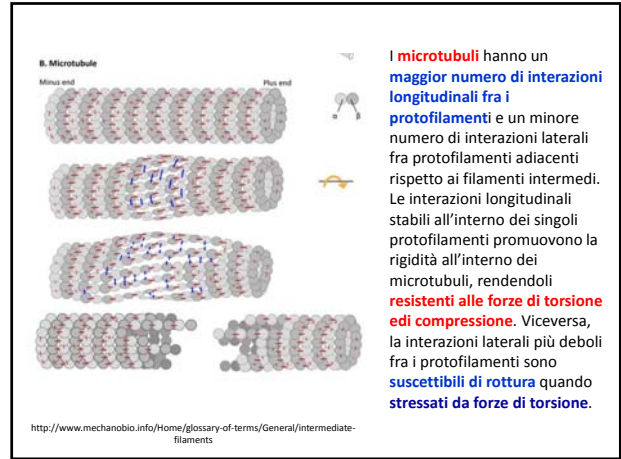
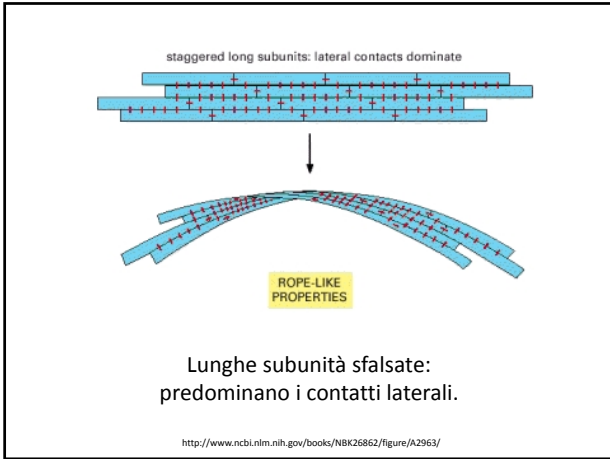


Filamenti intermedi e resistenza alla trazione

- ⚡ I FI hanno un'elevata **resistenza alla trazione, forze di compressione, torsione e al piegamento.**
- ⚡ La natura elastica dei FI è dovuta **all'assemblaggio sfalsato delle subunità** e alto grado di interazioni laterali rispetto a quelle longitudinali all'interno dei FI.

<http://www.mechanobio.info/Home/glossary-of-terms/General/intermediate-filaments>





ETEROGENEITÀ MOLECOLARE DEI FILAMENTI INTERMEDI - 2

Tipo	Proteina	Dimensione (kD)	Sito di espressione
I	Cheratine acide (~ 15 proteine)	40-60	Cellule epiteliali
II	Cheratine neutre o basiche (~ 15 proteine)	50-70	Cellule epiteliali
III	Vimentina	54	Fibroblasti, leucociti e altri tipi cellulari
	Desmina	53	Cellule muscolari
	Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	51	Cellule gliali
	Periferina	57	Neuroni periferici
IV	Proteine dei neurofilamenti		
	NF-L	67	Neuroni
	NF-M	150	Neuroni
	NF-H	200	Neuroni
	α -interneuxina	66	Neuroni
V	Lamine nucleari	60-75	Lamina nucleare di tutti i tipi cellulari
VI	Nestina	200	Cellule staminali, soprattutto del SNC

Le nestine sono talvolta classificate come FI di tipo IV piuttosto che di tipo VI

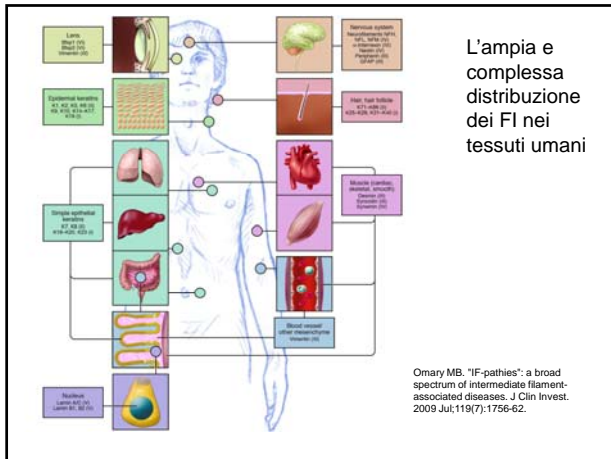
Adattato da: Cooper GM & Hausman RE. The Cell: A Molecular Approach*, 4th ed, ASM Press, Sinauer Associates

TABLE 18-1 The Major Classes of Intermediate Filaments in Mammals

CLASS	PROTEIN	DISTRIBUTION	PROPOSED FUNCTION
I	Acidic keratins	Epithelial cells	Tissue strength and integrity
II	Basic keratins	Epithelial cells	
III	Desmin, GFAP, vimentin	Muscle, glial cells, mesenchymal cells	Sarcomere organization, integrity
IV	Neurofilaments (NFL, NFM, and NFH)	Neurons	Axon organization
V	Lamins	Nucleus	Nuclear structure and organization

Table 18-1
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

<https://classconnection.s3.amazonaws.com/587/flashcards/1781587/png/ff51349313378352.png>



Livelli di organizzazione ed assemblaggio dei filamenti intermedi (2)

- ✦ Le proteine dei filamenti intermedi (IF) formano **omo- o eterodimeri** con un **dominio altamente conservato ad alfa-elica e code e teste non elicoidali**, che hanno **dimensione e sequenza di aminoacidi variabili**.
 - Il dominio "core" centrale contiene tre elementi spaziatori non elicoidali.
- ✦ Un tetramero si forma mediante **aggregazione sfalsata, antiparallela di due dimeri identici**.
 - I tetrameri si **aggregano coda contro coda**, formando un **protofilamento**;
 - Successivamente copie di protofilamenti si associano lateralmente formando una **protofibrilla**. L'associazione laterale di quattro protofibrille forma un cilindro con 10 nm di spessore.

ETEROGENITÀ MOLECOLARE DEI FILAMENTI INTERMEDI - 3

- ✦ I **tipi I e II** consistono in due gruppi di **cheratine**, ciascuno consistente di circa 15 proteine diverse, che sono espresse nelle **cellule epiteliali**.
 - Ogni tipo di cellula epiteliale sintetizza **almeno un tipo di cheratina I** (acide) **e un tipo di tipo II** (basiche, neutre), che copolimerizza per formare filamenti.
 - Alcuni tipi di cheratine di tipo I e II (dette **cheratine dure**) sono usate per produrre strutture dure quali i capelli, le unghie e le corna.
 - Altri tipi di cheratina (**cheratine molli, citocheratine**) sono abbondanti nel citoplasma delle cellule epiteliali; nei vari tipi di cellule epiteliali sono espresse combinazioni diverse.

Adattato da: Cooper GM & Hausman RE: The Cell: A Molecular Approach, 4th ed, ASM Press, Sinauer Associates

Coulombe PA, Wong P. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. Nat Cell Biol. 6: 699-706, 2004.

- ✦ I **filamenti intermedi** sono polimeri citoscheletrici codificati da una grande famiglia di geni **espressi in modo differenziale** che forniscono un **sostegno strutturale** cruciale al citoplasma e al nucleo degli eucarioti superiori.
- ✦ Perturbazioni della loro funzione spiegano diverse patologie determinate geneticamente in cui le **cellule fragilizzate non sono in grado di reggere stress meccanici e non-meccanici**.
- ✦ Studi recenti chiariscono come il **sostegno strutturale** sia **modulato per affrontare le necessità mutevoli delle cellule** e rivelano un nuovo ruolo tramite il quale i filamenti intermedi influenzano la crescita e la morte cellulare mediante interazioni dinamiche con proteine non-strutturali.

Adattato da Newsletter della Biomedica, Summer 1996, Volume 1, Issue 1

Regolazione dell'assemblaggio dei filamenti intermedi

- La maggior parte delle cellule hanno le proteine dei FI totalmente polimerizzate
 - Tuttavia, vi sono alcuni tetrameri liberi
 - Sono questi la vera subunità di base ????
- Un modo di regolare i FI è fosforilare i residui di serina all'estremità aminoterminale. Ciò provoca il disassemblaggio dei FI.
- Le proteine dei FI si associano con altre proteine nella cellula. Non sempre chiaro come ciò avviene

http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/intermediate_filaments.htm

I filamenti intermedi si associano con altre proteine

- Le "Intermediate Filament Associated Proteins" (IFAPs):
 - Aggiungono sostegno
 - Collegano i FI alle altre strutture
- Esempi:
 - Plectina**
 - Stabilisce legami crociati tra i FI e i microtubuli
 - Può anche legarsi alle Microtubule Associated Proteins (MTAPs) e a Microfilament Associated Proteins come la spettrina
 - Recettore per la Lamina B**: collega la Lamina B alla membrana nucleare interna
 - Anchirina**: collega l'actina con gli IF alla base della cellula
 - Desmoplachina**: collega i FI ai siti dei desmosomi e degli emidesmosomi

http://www.cytochemistry.net/Cell-biology/intermediate_filaments.htm

TIPI DI FILAMENTI INTERMEDI - 1

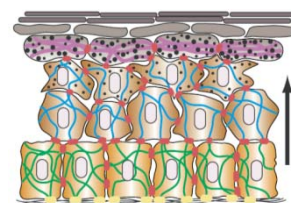
CITOCHERATINE

- Questo è il primo tipo di filamento intermedio a comparire durante la segmentazione dello zigote ed è già rivelabile allo stadio di 8 cellule.
- Più tardi, durante l'embriogenesi, la famiglia delle citocheratine è presente nelle cellule **epiteliali**.
- Gli epitelii semplici, monostratificati o le cellule epiteliali in rapida divisione contengono le citocheratine di PM più basso, mentre gli epitelii complessi, con cellule altamente differenziate contengono citocheratine di dimensioni maggiori, con terminali aminico e carbossilico idrofobici.* Questi interagiscono con una proteina citoplasmatica strettamente associata, la **filaggrina**, per formare un complesso insolubile ma molto malleabile che fornisce la barriera protettiva della pelle.
- Le citocheratine sono anche associate ai **desmosomi**, le giunzioni che collegano le cellule epiteliali.

Adattato da Smith and Wood: Cell Biology, Chapman & Hall, London, 1992

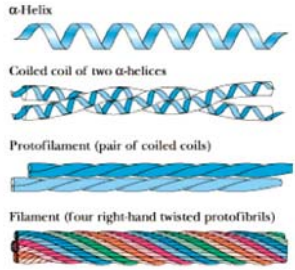
Principali funzioni cellulari dei filamenti intermedi citoplasmatici -1

Mechanical support



Sostegno meccanico: L'epidermide è un buon esempio per illustrare questa funzione che è condivisa dalla maggior parte dei filamenti intermedi. I filamenti intermedi di tipo cheratina sono abbondanti nei cheratinociti, con un range fra > 10% del contenuto totale di proteine nelle cellule progenitrici basali fino a > 70% nelle cellule di differenziamento più avanzato. I cambiamenti nel colore dei filamenti riflettono l'espressione differenziale e la composizione delle cheratine nelle cellule basali, di differenziamento precoce e di differenziamento tardivo (la freccia indica il differenziamento). Le reti di filamenti di cheratina si estendono attraverso tutto il citoplasma dei singoli cheratinociti e sono integrate fra cellule mediante collegamento alle giunzioni cellula-cellula di tipo desmosomi (punti rossi) e fra le cellule basali e la lamina basale mediante collegamento ad emi-desmosomi (punti gialli). Questa organizzazione massimizza il sostegno meccanico fornito dai filamenti di cheratina.

Cheratine



α-Helix

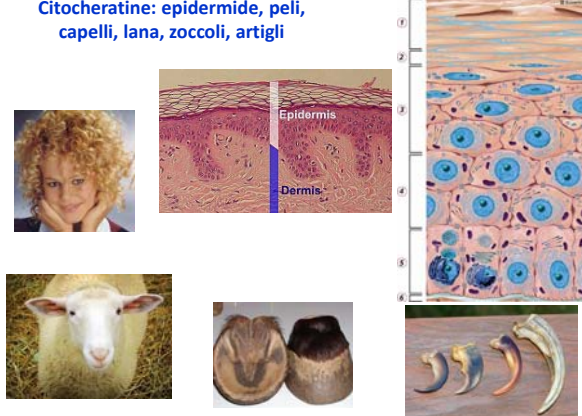
Coiled coil of two α-helices

Protofilament (pair of coiled coils)

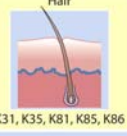
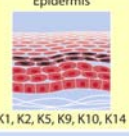

Filament (four right-hand twisted protofibrils)

BUSB 2011 - Filamenti Intermedi 33

Citocheratine: epidermide, peli, capelli, lana, zoccoli, artigli



© Carl Gustav Sorenson

Keratins	Hair	Epidermis	Simple epithelium
Amino acids			
	K31, K35, K81, K85, K86	K1, K2, K5, K9, K10, K14	K8, K9, K18-K20

<http://jcs.biologists.org/content/124/24/4221/F7.large.jpg>

TIPI DI FILAMENTI INTERMEDI - 2

NEUROFILAMENTI

- ⚡ Queste tre proteine, NF-L, NF-M e NF-H sono sintetizzate nei **neuroni**.
- ⚡ Non sono distribuite in modo uguale:
 - i corpi cellulari contengono soprattutto NF-L e NF-H.
 - gli assoni esprimono preferenzialmente NF-M e NF-H
- ⚡ Hanno residui carbossilici altamente carichi.

VIMENTINA

- ⚡ Questo filamento intermedio è espresso dai tessuti mesenchimali ed è tipica delle cellule primitive.
- ⚡ Le cellule in coltura ritornano ad esprimere vimentina anche se questo non è il loro filamento intermedio del tessuto maturo, forse come risultato della stimolazione a migrare e a dividersi rapidamente.

Adattato da Smith and Wood: Cell Biology, Chapman & Hall, London, 1992 36

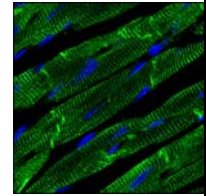
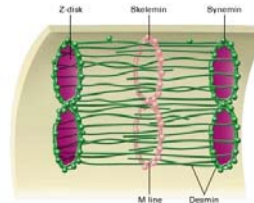
TIPI DI FILAMENTI INTERMEDI - 3

DESMINA

- Questa proteina è espressa dalle cellule **muscolari scheletriche**, aumentando negli stadi più tardivi di differenziamento, quando l'espressione della vimentina cessa.
- La desmina e la vimentina sembrano aiutare i microfilamenti ad allinearsi in registro nelle fibre muscolari scheletriche ed entrambe rimangono come componenti minori nel muscolo scheletrico maturo.
- La desmina è presente nella **muscolatura liscia** ed anche in **cellule non muscolari con attività contrattile**, come i periciti, le cellule stellate del fegato, le cellule mio-epiteliali e i podociti del rene.
- E' anche presente in altre cellule non muscolari come le cellule endoteliali.
- Quindi, l'espressione di desmina non è interamente muscolo-specifica.

Adattato da Smith and Wood: Cell Biology, Chapman & Hall, London, 1992

Desmina nel muscolo

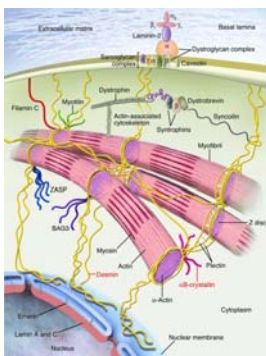


http://www.cellsignal.com/products/images/4024_HF_md_071214.jpg

Questi filamenti intermedi di tipo III avvolgono il disco Z e fanno contatti ulteriori con i circostanti dischi Z della stessa miofibrilla. L'allineamento dei filamenti di desmina con il sarcomero del muscolo è mantenuto da numerose proteine associate ai filamenti intermedi (IFAPs, "intermediate filaments-associated proteins"), che includono la schelemina nella linea M e la sinemina nel disco Z.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21560/figure/A5561/>

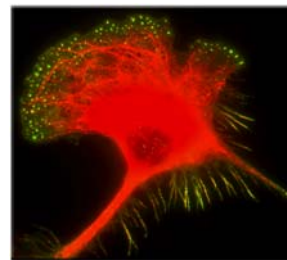
Architettura molecolare di un miocito, in cui sono evidenziate le proteine coinvolte nelle miopatie scheletriche e cardiache



La **desmina** è la principale proteina dei FI del muscolo. Interagisce con altre proteine per sostenere le miofibrille a livello dei dischi Z e forma una rete continua di citoscheletro che mantiene i rapporti spaziali fra l'apparato contrattile e gli altri elementi strutturali della cellula. La desmina mantiene l'integrità cellulare, la trasmissione di forza, e il segnalamento mecanochimico. Mutazioni in altre proteine sarcomeriche e citoscheletriche (plectina, miotilina, filamina, α B-cristallina, «Z band alternatively spliced PDZ-motif protein [ZASP]», e «BCL2-associated athanogene 3 [BAG3]» provocano disordini neuromuscolari.)

Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease
Lev G. Goldfarb, Marinos C. Dalakas
J Clin Invest 2009; 119(7):1806-1813

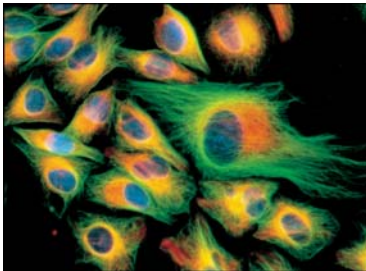
Vimentina: cellule di origine mesenchimale



La rete di filamenti intermedi di vimentina (rosso) si estende verso le lamelle dove i tetrameri colocalizzano con la proteina che forma fasci di actina, la fimbrina (verde). Questi foci fluorescenti sono adesioni focali specializzate che si trovano negli osteoclasti e macrofagi, chiamate pososomi.

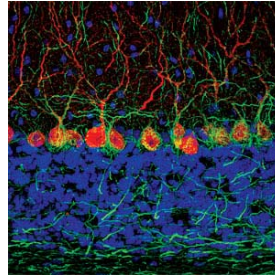
<http://web.wi.mit.edu/matsudaira/pub/fimbrin.shtml>

Vimentina: cellule di origine mesenchimale



<http://www.sigmaaldrich.com/prodimages/c/c1801-ff.jpg>

Neurofilamenti

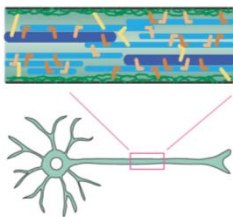


Confocal immunofluorescent image of mouse cerebellum labeled with Neurofilament-H (RMdO 20) Mouse mAb (green) and Calbindin Antibody #2136 (red). Blue pseudocolor = DRAQS™ (fluorescent DNA dye).

<http://www.cellsignal.com/products/2836.html>

Principali funzioni cellulari dei filamenti intermedi citoplasmatici -2

Cytoarchitecture



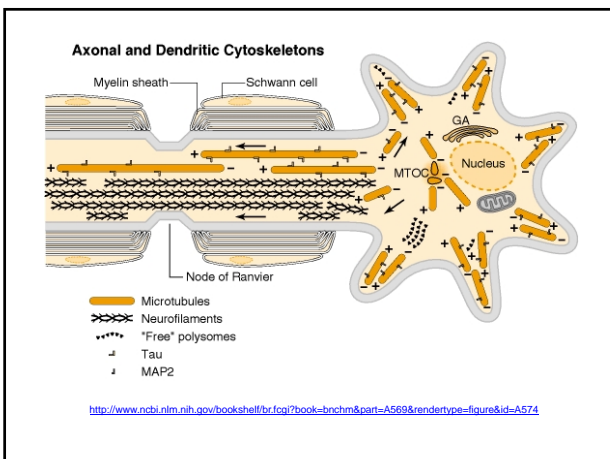
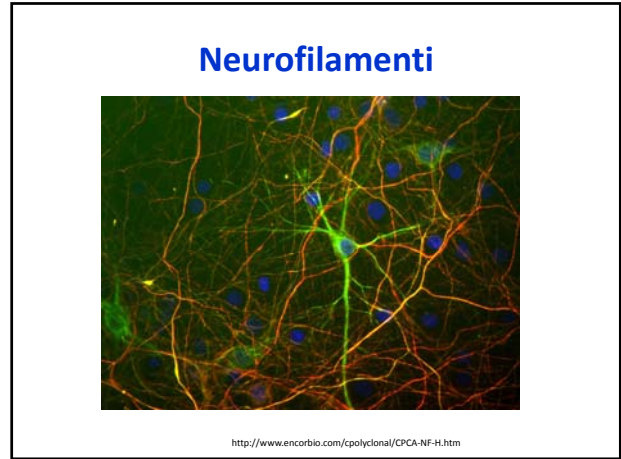
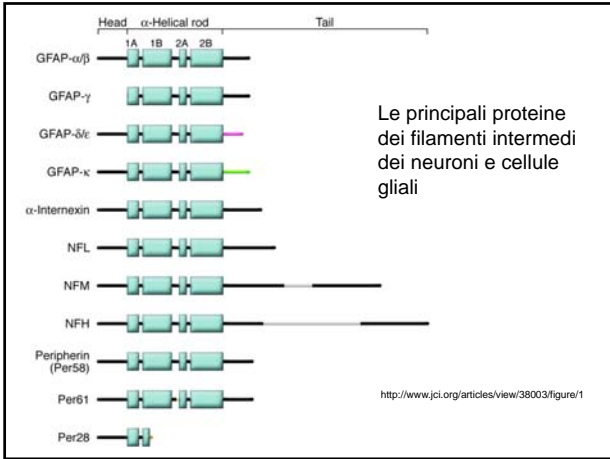
Citoarchitettura. Nei motoneuroni, la crescita radiale dei processi assonali richiede la loro interazione con neurofilamenti (blu chiaro) in modo da trovare la corretta stechiometria fra le subunità "light" (NF-L), media (NF-M) e "heavy" (NF-H). I grandi domini della coda C-terminale delle subunità NF-H (rosso) e NF-M (arancione) sono iperfosforilati e si proiettano al di fuori della zona centrale del filamento, così determinando la spaziatura fra i filamenti e il calibro dell'assone. Gli abbondanti neurofilamenti interagiscono con i microtubuli meno abbondanti (blu scuro) e con i filamenti di actina subcorticali (verde scuro) mediante proteine linker del citoscheletro, quali la plectina e la BPAG1 (giallo). Un ruolo citoarchiteturale è stato inoltre dimostrato per le lamine nucleari ed altri filamenti intermedi citoplasmatici quali la desmina e le cheratine.

Intermediate Filament (IF) Proteins of the Nervous System

IF type	Subunit	Cell type
Type III	Vimentin	Neural and glial precursors
	GFAP	Astrocytes, some Schwann cells
	Peripherin	Subset of neurons, particularly in PNS, may coassemble with NFH/NFM/NFL
	Desmin	Smooth muscle cells in vasculature
Type IV	NFH	Most neurons, most abundant in large neurons
	NFM	
	NFL	
	α -Internexin	Subset of neurons, particularly parallel fibers in cerebellum, may also coassemble with NFH/NFM/NFL
Type IV?	Nestin	Neuroectodermal precursors in developing brain

GFAP, glial fibrillary acidic protein; NFH, NFM and NFL, neurofilaments of high, medium and low molecular weight, respectively.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bnchm&part=A569&rendertype=table&id=A578>



Didascalia della figura sul citoscheletro degli assoni e dei dendriti (1)

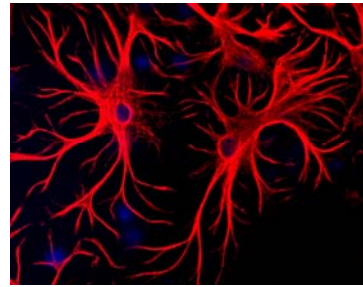
⚡ **I citoscheletri degli assoni e dei dendriti differiscono sia in composizione che in organizzazione.** Le principali differenze sono illustrate diagrammaticamente in questa Figura. Con un'eccezione, tutte le proteine citoscheletriche sono sintetizzate su polisomi liberi nel corpo cellulare, e successivamente trasportate ai loro differenti compartimenti cellulari. L'eccezione è la **MAP2**, che è la **principale proteina associata ai microtubuli dei dendriti**. Mentre una certa parte della MAP2 è sintetizzata nel corpo cellulare, **il mRNA per la MAP2 è specificamente arricchito nel compartimento dendritico** e si ritiene che una frazione significativa sia sintetizzata in quel sito.

⚡ Si crede che i **microtubuli** dei corpi cellulari, dei dendriti e degli assoni siano nucleati nel centro organizzatore dei microtubuli (MTOC), e quindi rilasciati e consegnati ai dendriti oppure all'assone. Nel dendrite, i microtubuli spesso hanno polarità miste con sia estremità le "meno" che le "più" presenti nella parte distale rispetto al corpo cellulare. La conseguenza funzionale di tale organizzazione è incerta ma potrebbe aiutare a spiegare come mai i dendriti assumono una forma affusolata mentre si allontanano dal corpo cellulare.

Didascalia della figura sul citoscheletro degli assoni e dei dendriti (2)

- ⚡ Vice-versa, tutti i microtubuli degli assoni sono orientati con l'estremità "più" in posizione distale rispetto al corpo cellulare ed esibiscono una distribuzione uniforme lungo l'assone.
- ⚡ Nonostante una certa quantità di proteina tau possa essere identificata nei corpo cellulari e nei dendriti, **i microtubuli assonali sono arricchiti in tau** e la tau assonale è fosforilata in modo diverso. La MAP2 sembra essere assente dall'assone. **I neurofilamenti sono in gran parte esclusi dai compartimenti dendritici ma sono abbondanti negli assoni di grandi dimensioni.** Il distanziamento dei neurofilamenti è sensibile al livello di fosforilazione. Sia i microtubuli che i neurofilamenti si fermano ed iniziano nell'assone piuttosto e non proseguono nel corpo cellulare. I microfilamenti hanno un'organizzazione più dispersa e possono essere di difficile visualizzazione nel neurone maturo. Essi sono principalmente abbondanti vicino alla membrana plasmatica ma sono anche molto abbondanti nei terminali pre-sinaptici e nelle spine dendritiche. GA: apparato di Golgi.

Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)



<http://encorbio.com/cpolyclonal/CPCA-GFAP.htm>

Filamenti intermedi

APPLICAZIONE IN ONCOLOGIA E BIOLOGIA DELLO SVILUPPO

DIAGNOSI DEI TUMORI UMANI IN BASE ALLA LORO ESPRESSIONE DI FILAMENTI INTERMEDI - 1

- ⚡ Normalmente quando i pazienti con tumori sono trattati con radiazione o farmaci, la decisione sul tipo di trattamento è basata sulla diagnostica del tumore.
 - Per esempio, alcuni tipi tumorali rispondono al trattamento con la radiazione mentre altri sono resistenti.
- ⚡ Man mano che i tumori crescono, le caratteristiche strutturali del tessuto normale scompaiono e le singole cellule spesso perdono le loro caratteristiche proteine di membrana, il che rende la loro identificazione molto difficile.
- ⚡ Tuttavia, tumori di origine sconosciuta possono essere diagnosticati mediante l'identificazione dei loro filamenti intermedi con anticorpi specifici. Questo perché l'espressione dei filamenti intermedi è cellula-specifica, ossia, ogni proteina di filamento intermedio è associata ad un tipo cellulare particolare.
 - Ad esempio, i tumori che esprimono citocheratine possono essere classificati come carcinomi (di origine epiteliale) e distinti dai sarcomi (di origine mesenchimale) che esprimono vimentina.

DIAGNOSI DEI TUMORI UMANI IN BASE ALLA LORO ESPRESSIONE DI FILAMENTI INTERMEDI - 2

- Il successo di questo metodo dipende moltissimo dall'assoluta specificità dell'anticorpo per un determinato tipo di filamento intermedio.
- Un altro fattore critico per la diagnostica è che le cellule tumorali non sempre ubbidiscono alle "regole" dell'espressione tissutale. E' stato dibattuto vivacemente ed ora accettato che, al contrario delle cellule normali non cancerose, le cellule tumorali possono co-esprimere due tipi di filamenti intermedi, ad esempio citocheratine e vimentina. Tuttavia, queste non copolimerizzano in filamenti, ma esistono come reti separate.
- Se le limitazioni di cui sopra sono tenute in considerazione, l'espressione dei filamenti intermedi dai tumori rimane un metodo per la loro diagnosi.

(Adattato da: Smith and Wood: Cell Biology, Chapman & Hall, London, 1992)

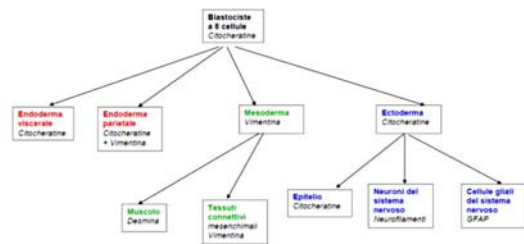
Type of Filament	Tissue Origin	Tumor Type
Keratin, Cytokeratin	Epithelial Cells	Carcinomas (Squamous and Adeno)
		Synovial and epithelial sarcomas
		Non-Seminoma Germ Cell Tumors
		Some neuroendocrine carcinomas
Vimentin	Mesenchymal Cells	Sarcomas (all types)
	Macrophages	Malignant Fibrous Histiocytoma
	Endothelial Cells	Melanoma
Desmin	Muscle Cells	Seminoma
	Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Glial Cells
Neurofilament		Neurons or neural crest
		Astrocytomas, gliomas
		Choroid plexus tumors, some oligodendrogliomas, Schwannomas, neurofibromas, some salivary gland mixed tumors
		Neuron-derived CNS tumors
		Neural crest-origin tumors:
		Neuroblastoma, retinoblastoma, medulloblastoma

Immunohistochemical tumor differentiation (1)

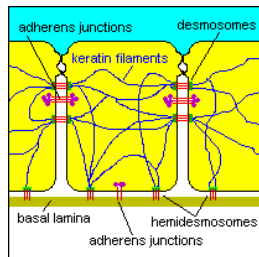
Immunohistochemical tumor differentiation (2)

Antibody	Target Tissue	Associated Tumors
S-100 Protein	Central Nervous and Peripheral Nervous System	Neuroectoderm-derived tumors: Pheochromocytoma, lung, and GI tract carcinoids, some small cell lung ca, Merkel Cell tumor, parathyroid adenoma, pancreatic islet cell tumors, paraganglioma
Epithelial Membrane Antigen	Milk fat globule membranes	Central Nervous System and Peripheral Nervous System Tumors
Neuron Specific Enolase	Neurons	Melanomas, histiocytosis X, Cholangiocarcinoma, pancreatic duct and islet cell carcinomas, other various carcinomas
Melanoma Specific Antibody (HMB-45)	Melanocytes	Same as keratin
Leukocyte common antigen	B- and T- cells	Gliomas, Carcinoids, small cell (lung), neuroblastomas, neuroendocrine, melanoma, meningiomas, schwannomas
Factor VIII related antigen	Endothelial Cells	Benign and malignant tumors of the melanocytes
Myoglobin	Skeletal Muscle	Leukemias, and Lymphomas
Muscle-specific actin	Muscle all types	Angiosarcomas, Kaposi's Sarcoma
Chromogranin	Neuroendocrine	Rhabdomyosarcoma
		Muscle derived sarcomas
		Pheochromocytoma, carcinoids, paragangliomas

FILAMENTI INTERMEDI & DIFFERENZIAMENTO CELLULE DEI MAMMIFERI



(Adattato da: Smith and Wood: Cell Biology, Chapman & Hall, London, 1992)



Filamenti intermedi

DESMOSOMI, EMIDESMOSOMI (VEDI POWERPOINT GIUNZIONI DI MEMBRANA)

Table I. Types of Intermediate Filament

Type I and II: Acid and basic keratin

Type III:

- Vimentin
- Desmin
- Glial fibrillary acidic protein
- Peripherin

Type IV: Neurofilaments

Type V: Lamin A, B,C

Type VI: Nestin

Lamine

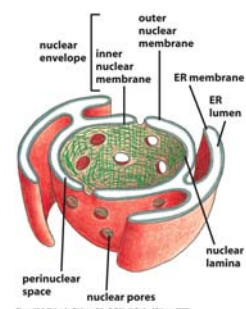
Lamina nucleare

Involucro nucleare (1)

- ✚ La scorsa decade ha visto un complete ripensamento della tradizionale visione dell'involucro nucleare come soltanto un involucro passivo per i cromosomi.
- ✚ La convergenza di diverse linee di ricerca di base e clinica ha rivelato ruoli addizionali sia nel segnalamento che nella progressione mitotica.
- ✚ Sta diventando evidente che **l'involucro nucleare definisce non solo l'organizzazione nucleare ma anche quella del citoscheletro** e in questo modo, **integra sia l'architettura nucleare che quella citoplasmatica.**

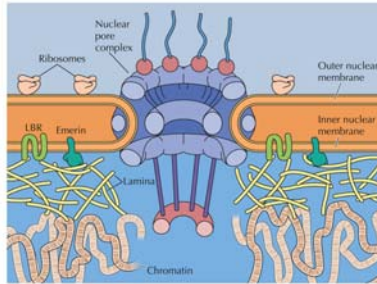
(Stewart et al., Science, 2007)

Involucro Nucleare (2)



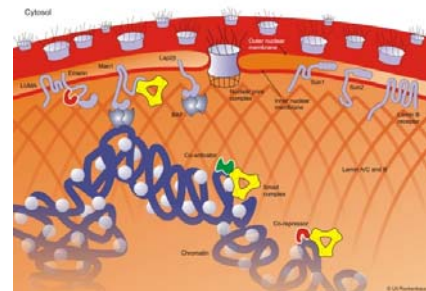
L'involucro formato da due membrane è penetrato dai pori nucleari ed è continuo con il reticolo endoplasmico. I ribosomi, che sono legati alla superficie citosolica della membrane del RE e alla membrana nucleare esterna, non sono evidenziati

Lamina nucleare



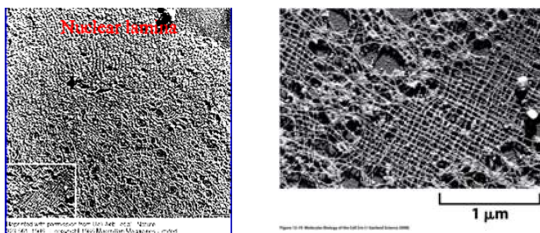
La **membrana nucleare interna** contiene diverse proteine integrali, tra cui l'**emerina** e il **recettore per la lamina B (LBR)** che **interagiscono con le lamine nucleari**. Le **lamine** interagiscono inoltre con la **cromatina**

Lamina nucleare



<http://userpage.chemie.fu-berlin.de/biochemie/agknaus/SNE.html>

Lamina Nucleare (Scanning Electron Microscopy)



Lamina nucleare & Lamine - 1

- ✚ La lamina nucleare è composta da un gruppo di proteine chiamate **lamine A, B e C** che hanno un PM di circa 60-70 kD.
 - Il gruppo **A** è espresso soprattutto nelle cellule differenziate
 - Le lamine **B** sono prodotte costitutivamente
 - Le lamine **C** sono identiche al tipo A, ad eccezione di un'estensione di ulteriori 90 AA, che deriva dallo splicing alternativo del prodotto genico nelle cellule dei mammiferi.
 - Si conoscono diversi tipi di lamine B, tutti prodotti di geni diversi.

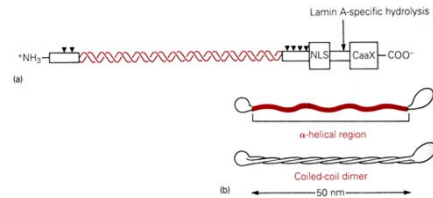
(Smith & Wood, Cell Biology, Stanley Thornes, Cheltenham, 2nd edition, 1999).

Lamina nucleare & Lamine - 2

- Le lamine appartengono alla famiglia di proteine dei Filamenti Intermedi; presumibilmente sono evolute da un antenato comune.
- Le lamine hanno le caratteristiche molecolari strutturali tipiche della famiglia dei FI:
 - Una regione interna di PM 40 kD contenente circa 350 residui di AA che formano un **dominio ad α -elica** a forma di bastoncino.
 - Questo dominio è fiancheggiato da **regioni non-elicoideali ad entrambe le estremità N- e C-terminali** di PM 40 kDa e 20-30 kDa, rispettivamente.
 - Le lamine B differiscono dalle lamine A in quanto hanno una porzione C-terminale più piccola.
 - Questi dimeri si aggregano per formare lunghe fibre con diametro di circa 10 nm, che si associano per formare la **rete della lamina nucleare**.

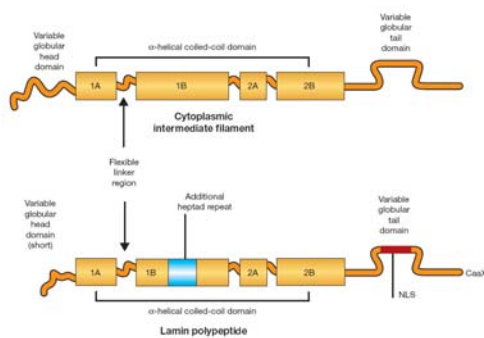
(Smith & Wood, Cell Biology, Stanley Thomes, Cheltenham, 2nd edition, 1999)

Schema di una molecola di lamina



- La regione interna elicoidale è lunga circa 50 nm ed è fiancheggiata da domini non elicoidali.
 - I triangoli indicano siti di fosforilazione.
 - NLS: "Nuclear Localization Signal"
 - CaaX box: sito di modificazioni post-traduzionali.
 - Freccia: indica sito specifico di proteolisi della lamina A.
- (Smith & Wood, Cell Biology, Stanley Thomes, Cheltenham, 2nd edition, 1999)

Paragone tra filamenti intermedi del citoplasma e lamine (1)



Hutchison CJ, Worman HJ. A-type lamins: guardians of the soma? Nat Cell Biol. 2004 Nov;6(11):1062-7.

Paragone tra filamenti intermedi del citoplasma e lamine (2)

- Le proteine dei filamenti intermedi hanno una struttura a domini conservata che consiste in un **dominio di testa globulare variabile**, un **dominio di dimerizzazione centrale ad α -elica** che consiste in **quattro regioni a "coiled-coil" basate su ripetizioni di sette aminoacidi (eptadi)**, interrotte da domini flessibili di collegamento ("linker"), e un **dominio di coda globulare variabile**. I domini a "coiled-coil" sono designati 1°, 1B, 2° e 2B, rispettivamente. I domini "linker" non sono elicoidali.
- Le principali differenze fra le lamine e i filamenti intermedi citoplasmatici dei vertebrati consistono:
 - I domini di testa sono molto corti (circa 33 aminoacidi).
 - Vi è un'estensione di sei eptadi del "coil" 1B.
 - Il dominio di globulare di coda è di solito caratterizzato dal fatto che possiede una **sequenza di localizzazione nucleare** e un **sito per modificazioni post-traduzionali** quali metilazione, **farnesilazione** (**aggiunta di coda lipidica**) e scissione proteolitica (CaaX).

Hutchison CJ, Worman HJ. A-type lamins: guardians of the soma? Nat Cell Biol. 2004 Nov;6(11):1062-7.

Lamina nucleare & Lamine - 3

- ✚ Le lamine differiscono dalle proteine citoplasmatiche dei FI in quanto hanno un **segnale di localizzazione nucleare**, e una cosiddetta "CaaX box" vicino al C-terminale.
 - La box è il sito di tre successive modificazioni post-traduzionali:
 - (a) **Isoprenilazione** di un residuo di cisteina (inserimento di **coda lipidica**)
 - (b) La rimozione proteolitica di tre residui di AA nel C-terminale
 - (c) La cabossimetilazione del residuo di cisteina isoprenilato.
 - Queste modificazioni aumentano l'idrofobicità del C-terminale e sono necessarie per **indirizzare le lamine di nuova sintesi verso la membrana nucleare interna**.
 - **Siti potenziali di fosforilazione sono presenti ad entrambe le estremità della regione elicoidale.**

(Smith & Wood, Cell Biology, Stanley Thornes, Cheltenham, 2nd edition, 1999)

Lamina nucleare & Lamine - 3

- ✚ Le lamine differiscono dalle proteine citoplasmatiche dei FI in quanto hanno un **segnale di localizzazione nucleare**, e una cosiddetta "CaaX box" vicino al C-terminale.
 - La box è il sito di tre successive modificazioni post-traduzionali:
 - (a) **Isoprenilazione** di un residuo di cisteina (inserimento di **coda lipidica**)
 - (b) La rimozione proteolitica di tre residui di AA nel C-terminale
 - (c) La cabossimetilazione del residuo di cisteina isoprenilato.
 - Queste modificazioni aumentano l'idrofobicità del C-terminale e sono necessarie per **indirizzare le lamine di nuova sintesi verso la membrana nucleare interna**.
 - **Siti potenziali di fosforilazione sono presenti ad entrambe le estremità della regione elicoidale.**

(Smith & Wood, Cell Biology, Stanley Thornes, Cheltenham, 2nd edition, 1999)

Lamina nucleare & Lamine - 4

- ✚ Le lamine di tipo A sono soggette a proteolisi specifica che rimuove il C-terminale modificato post-traduzionalmente, ma **le lamine B trattengono questa estremità modificate e si sa che legano un gruppo di proteine sulla faccia nucleare della membrana nucleare interna chiamata complesso p58**.
- ✚ La proteina p58 (PM 58 kDa) legante la lamina B forma un oligomero con i polipeptidi p18.
 - ✚ Si ritiene che sia p58 che p18s siano proteine integrali della membrana nucleare interna.
- ✚ Altre proteine del complesso includono una p58 chinasi, p34 e p150 (PM 34 e 150 kDa, rispettivamente) e le lamine A e B che probabilmente sono tutte proteine periferiche di membrana.
- ✚ Non si hanno informazioni specifiche sulla modalità con la quale le lamine del complesso interagiscono con la cromatina. Si sa che in vivo **la lamina A** in particolare **si lega alla cromatina** e che queste interazioni coinvolgono i C-terminali delle lamine e le fibre cromatiniche di 30 nm.

(Smith & Wood, Cell Biology, Stanley Thornes, Cheltenham, 2nd edition, 1999)

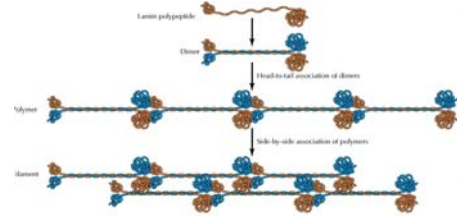
Lamina nucleare (1)

- ✚ La membrana interna dell'involucro nucleare si trova vicino ad uno strato di filamenti sottili che circonda il nucleo ovunque tranne che all'altezza dei pori nucleari. Questi possono anche fungere da filamenti di stabilizzazione. Questa struttura è detta **lamina nucleare**. Ha le seguenti caratteristiche strutturali e funzionali:
 - Consiste di "**filamenti intermedi**", di spessore 30-100 nm.
 - Questi filamenti intermedi sono polimeri di **lamine**, con pesi molecolari 60-75 kD.
 - Le **lamine di tipo-A** si trovano all'interno, verso il nucleoplasma.
 - Le **lamine di tipo B** si trovano vicino alla membrana nucleare (interna) e possono legarsi a proteine integrali all'interno della membrana.
 - Le lamine possono essere coinvolte nell'**organizzazione strutturale del nucleo**.

Lamina nucleare (2)

- Le lamine possono giocare un ruolo **nell'assemblaggio e disassemblaggio prima e dopo la mitosi**.
- La loro **fosforilazione** provoca il disassemblaggio della lamina e provoca la disgregazione dell'involucro nucleare in vescicole.
- La **defosforilazione** rovescia questo processo e permette al nucleo di riformarsi.
- Se si iniettano anticorpi contro le lamine nelle cellule, il nucleo non si può riformare dopo la divisione. Quindi le lamine sono essenziali per il riassetto.

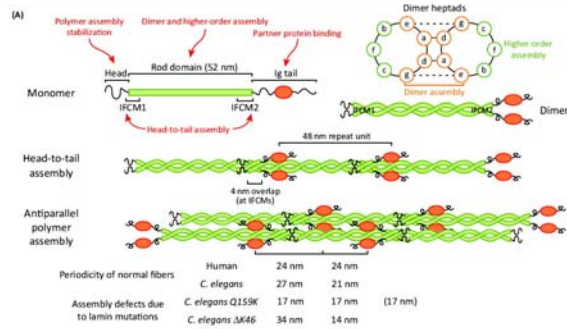
Modello di assemblaggio delle lamine



I polipeptidi delle lamine formano dimeri in cui le regioni centrali ad α -elica si avvolgono una rispetto all'altra. Ulteriore assemblaggio può coinvolgere un'associazione testa-coda dei dimeri per formare polimeri lineari e associazioni laterali di polimeri per formare filamenti.

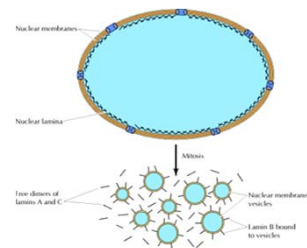
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9927/figure/A1328/>

Polimerizzazione delle lamine



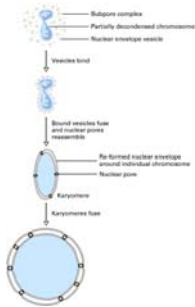
<http://www.cell.com/cms/attachment/2012273815/2034260151/gr1.jpg>

FRAMMENTAZIONE DELL'INVOLUCRO NUCLEARE



Mentre la lamina nucleare si dissocia, l'involucro nucleare si frammenta in vescicole. Le lamine di tipo B rimangono legate a queste vescicole, mentre le lamine A e C vengono rilasciate come dimeri liberi.

RIASSEMBLAGGIO DELL'INVOLUCRO NUCLEARE DURANTE LA TELOFASE



⚡ Vescicole dell'involucro nucleare, generate dalla rottura dell'involucro durante la profase, si associano con i cromosomi in fase di decondensazione e quindi si fondono.

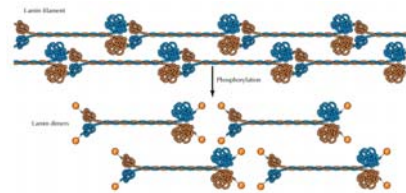
⚡ I complessi dei subpore si riassemblano nei pori nucleari, formando mininuclei individuali detti **cariomeri**.

⚡ I cromosomi da essi racchiusi si decondensano ulteriormente e la subseguente fusione degli involucri nucleari di tutti i cariomeri all'altezza dei poli del fuso forma un nucleo singolo contenente un corredo completo di cromosomi.

⚡ Il riassetto della lamina nucleare non è indicato.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21704/figure/A3523/>

Dissoluzione della lamina nucleare



La lamina nucleare consiste in una rete di filamenti di lamina. Nella mitosi, la Cdc2 ed altre proteina chinasi fosforilano le lamine, provocando la dissociazione dei filamenti in dimeri di lamina liberi.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9890/figure/A1377/?report=objectonly>

LA FOSFORILAZIONE DELLE LAMINE PORTA ALLA DEGRADAZIONE DELL'INVOLUCRO NUCLEARE -1

- ⚡ L'**involucro nucleare** è una **estensione del reticolo endoplasmico ruvido** circondata da una doppia membrana che contiene molti complessi dei pori nucleari.
- ⚡ Il doppio strato lipidico della membrana interna è sostenuto dalla **lamina nucleare**, una rete di filamenti di lamine localizzato sotto la faccia interna dell'involucro nucleare.
- ⚡ Le tre **lamine nucleari (A, B, e C)** presenti nelle cellule dei Vertebrati appartengono alla classe dei **filamenti intermedi** delle proteine del citoscheletro, che sono cruciali per sostenere le membrane cellulari.

LA FOSFORILAZIONE DELLE LAMINE PORTA ALLA DEGRADAZIONE DELL'INVOLUCRO NUCLEARE -2

- ⚡ Le **lamine A e C**, che sono codificate dalla stessa unità di trascrizione e prodotte per **splicing alternativo** di un singolo pre-mRNA, sono identiche, all'eccezione di una regione di 133 residui nel C-terminale della lamina A, che è assente nella lamina C.
- ⚡ La **lamina B**, codificata da una unità trascrizionale diversa, viene **modificata post-traduzionalmente mediante l'aggiunta di un gruppo isoprenilico idrofobico vicino al C-terminale**.
 - Questo acido grasso viene incorporato nel foglietto interno del bilayer lipidico che forma la membrana nucleare interna, **ancorando così la lamina nucleare alla membrana**.
- ⚡ Tutte tre le lamine nucleari formano dimeri che contengono una sezione centrale bastoncellare ad α -elica e domini di testa e di coda globulari; la polimerizzazione di questi dimeri mediante associazioni testa-a-testa e coda-a-coda genera i filamenti intermedi che compongono la lamina nucleare.

LA FOSFORILAZIONE DELLE LAMINE PORTA ALLA DEGRADAZIONE DELL'INVOLUCRO NUCLEARE -3

⚡ All'**inizio della mitosi**, il **Mitosis Promoting Factor (MPF)** **fosforila residui di serina specifici in tutte tre le lamine**, provocando la depolimerizzazione dei filamenti intermedi della lamina. I dimeri fosforilati di lamine A e C vengono rilasciati in soluzione, mentre i dimeri fosforilati di lamine B rimangono associati alla membrana nucleare mediante la loro ancora isoprenilica.

⚡ La **depolimerizzazione delle lamine nucleari** porta alla **disintegrazione della rete della lamina nucleare** e contribuisce alla rottura dell'involucro nucleare in piccole vescicole.

Ri-formazione dell'involucro nucleare

Il primo passo del riassetto dell'involucro nucleare consiste nel legame di vescicole di membrana ai cromosomi, che può essere mediato sia da proteine integrali di membrana che da lamine di tipo B. Le vescicole allora si fondono, la lamina nucleare si riassume e i cromosomi decondensano.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9890/figure/A13.82/>

