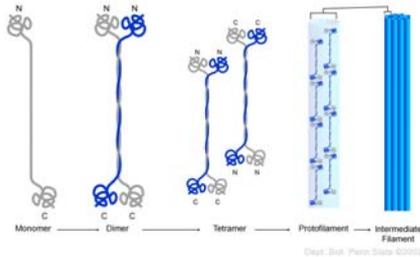
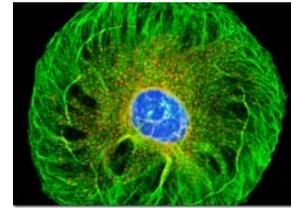


«I filamenti intermedi possono funzionare per integrare meccanicamente le diverse strutture dello spazio citoplasmatico in modo «cucito su misura» sullo stato di differenziamento della cellula» Elias Lazarides, 1980



Filamenti Intermedi



<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/gallery/cells/mdok/images/mdokexlarge8.jpg>

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

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 ad un ruolo principale nella plasticità cellulare e nell'**ammortizzazione degli 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**.

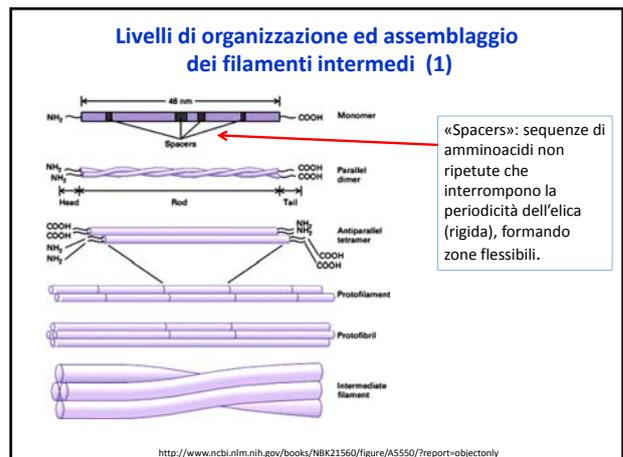
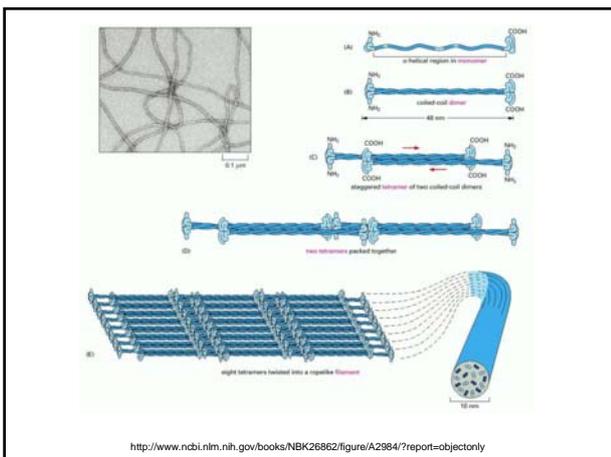
Herrmann H, Strelkov SV, Burkhard P, Aebl U. Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. J Clin Invest. 119:1772-1783, 2009.

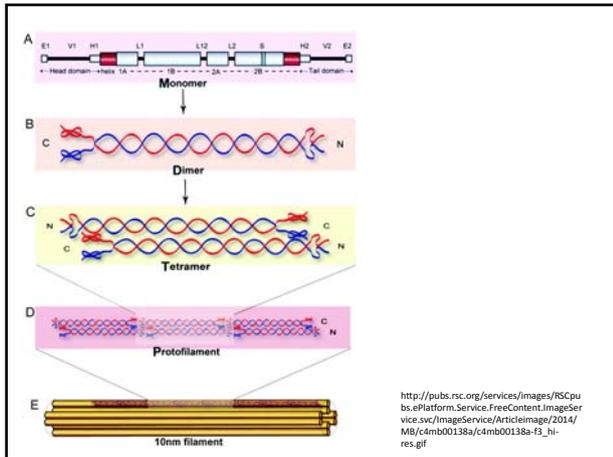
FILAMENTI INTERMEDI (1)

- ✚ Sono **biochimicamente** molto più **eterogenei**
- ✚ Hanno **grande forze tensile**; es:
 - ✚ Peli e unghie: consistono principalmente di filamenti intermedi delle cellule morte.
- ✚ 8 – 10 nm di diametro.
- ✚ Insolubili in soluzioni concentrate di sali e detergenti non ionici.
- ✚ Si possono sciogliere con urea (potente denaturante delle proteine).

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 in quanto 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).





Fl: Struttura (1)

- Ogni isoforma delle proteine dei Fl ha una sequenza aminoacidica caratteristica, ma fra i domini N- e C- terminali tutti hanno un **dominio a bastoncino** con dimensione variabile.
- 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 Fl 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.

Fl: 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"

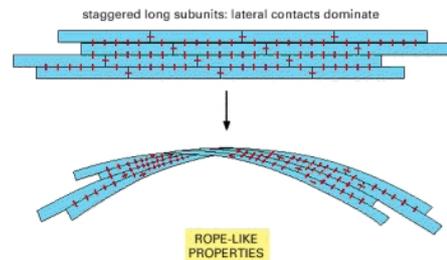
Livelli di organizzazione ed assemblaggio dei filamenti intermedi

- 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

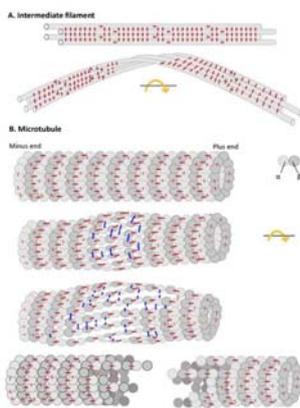
- I FI hanno un'elevata **resistenza alla trazione, forze di compressione, torsione e al piegamento.**
- La natura elastica dei FI è dovuta **all'assemblaggio sfalsato delle subunità** e alto grado di interazioni laterali rispetto a quelle longitudinali all'interno dei FI.

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



Lunghe subunità sfalsate:
predominano i contatti laterali.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26862/figure/A2963/>



Rispetto ai microtubuli, le **numerose interazioni laterali** e le molto minori interazioni longitudinali fra i protofilamenti dei filamenti intermedi generano una **elevata resistenza alla trazione** e rendono i FI **resistenti alle forze di compressione, piegamento, torsione e stiramento.**

<https://mbi-figure.storage.googleapis.com/figure/1384241602789.jpg>
<http://www.mechanobio.info/Home/glossary-of-terms/General/intermediate-filaments>

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.

ETEROGENITÀ 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 -internexina	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

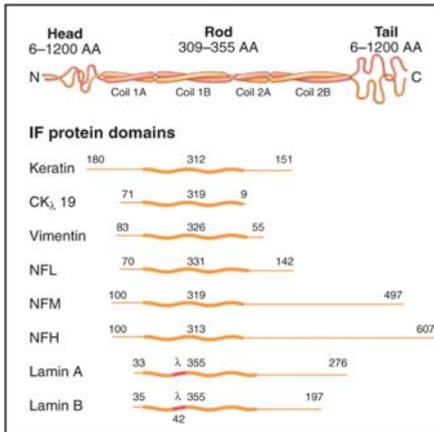
Adattato da: Cooper GM & Hausman RE: The Cell: A Molecular Approach, 4th ed, ASM Press, Sinauer Associates

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/ifs1349313378352.png>

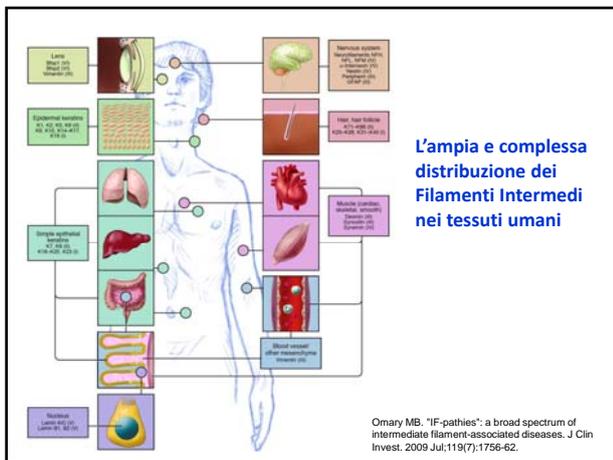


© Garland Science, Inc. All rights reserved. www GarlandScience.com

The intermediate filament protein multigene family.

Member name	Sequence homology class	cDNA-decoded mass in kDa	Typical occurrence in mammals/rotatable features
Assembly group 1			
Acidic cytokeratins* CK9-20	I	40-64	Cytoplasmic; All epithelia; heteropolymer with a type II CK
Basic cytokeratins* CK1-8	II	52-68	All epithelia; heteropolymer with a type I CK
Assembly group 2			
Vimentin	III	55	Cytoplasmic; Mesenchymal cells
Desmin	III	83	Muscle cells
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	III	50-52	Glia cells, astrocytes, stellate cells of liver
Peripherin	III	54	Diverse neuronal cells
Synermin	III/V	182*	Muscle cells; copolymer with desmin and/or vimentin
Paranemin	IV/I	178	Muscle cells; copolymer with desmin and/or vimentin
Nestin	III/IV/I	240	Neuroepithelial stem cells; muscle cells; copolymer with vimentin and/or α -internexin
α-Internexin			
Neurofilament triplet proteins	IV	56	Neurons
NFL	IV	68	Neurons
NF-M	IV	110	Neurons; copolymer with NF-L
NF-H	IV	130	Neurons; copolymer with NF-L
Assembly group 3			
Lamins	V	62-72	Nuclear
type A/C/I	V	62-72	Most differentiated cells
type B	V	65-68	All cell types
Orphan assembly group			
Phakoin	(?)*	46	Cytoplasmic
Phakoin	(?)*	83	Lens; copolymer with filensin
Phakoin	(?)*	83	Lens; copolymer with phakoin

Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. Curr Opin Cell Biol. 2000 Feb;12(1):79-90.



Livelli di organizzazione ed assemblaggio dei filamenti intermedi (2)

- ✦ Le proteine dei filamenti intermedi (IF) formano **omero-** 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 copolimerizzano 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

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

Seminario

Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics

Harald Herrmann, Harald Bär**, Laurent Kreplak#, Sergei V. Streikov# and Ueli Aebi#*

Figure 1 | Intermediate filament organization in metazoan cells.

Seminario

<http://www.nature.com/nrm/journal/v8/n7/images/nrm2197-41.jpg>

Harald Herrmann/Cellular Cell Biology

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**, giunzioni di membrana che collegano funzionalmente il citoscheletro dei filamenti intermedi delle cellule epiteliali.

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

Cheratine

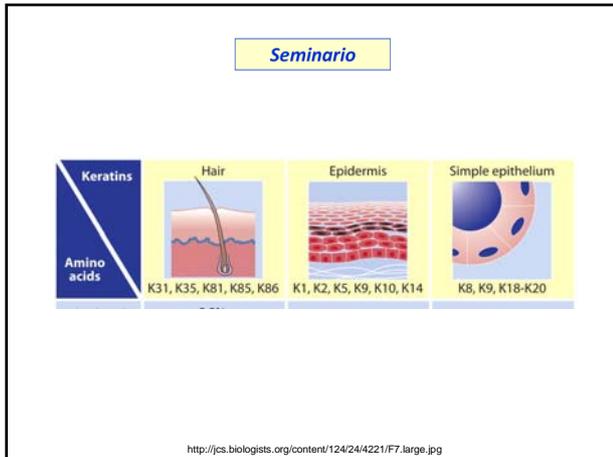
Animal Cell Micrograph

Figure 2

<http://www.chimicare.org/curiosita/la-chimica-nella-vita-domestica/perche-i-capelli-di-aricciano-quando-il-tempo-e-umido/>

<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/intermediatefilaments/intermediatefilaments.html>

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



Seminario

Keratin types	Type I		Type II	
	new name	former name	new name	former name
Epithelial keratins	K9	K9	K1	K1
	K10	K10	K2	K2
	K12	K12	K3	K3
	K13	K13	K4	K4
	K14	K14	K5	K5
	K15	K15	K6a	K6a
	K16	K16	K6b	K6b
	K17	K17	K6c	K6c/h
	K18	K18	K7	K7
	K19	K19	K8	K8
	K20	K20	K76	K2p
	K23*	K23	K77	K1b
	K24*	K24	K78*	K5b
			K79*	K6j
			K80*	K520
Hair follicle-specific epithelial keratins (root sheath)	K25	K25irs1	K71	K6irs1
	K26	K25irs2	K72	K6irs2
	K27	K25irs3	K73	K6irs3
	K28	K25irs4	K74	K6irs4
			K75	K6hf
Hair keratins	K31	Ha1	K81	Hb1
	K32	Ha2	K82	Hb2
	K33a	Ha3-1	K83	Hb3
	K33b	Ha3-11	K84	Hb4
	K34	Ha4	K85	Hb5
	K35	Ha5	K86	Hb6
	K36	Ha6		
	K37	Ha7		
	K38	Ha8		
	K39	Ka35		
	K40	Ka36		

*Expression pattern still unknown, only gene information available

Tabella 2.1: La nuova nomenclatura delle cheratine umane. (Schweitzer et al. 2006)

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

- ⚡ Espressa dai tessuti mesenchimali (connettivi), 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.

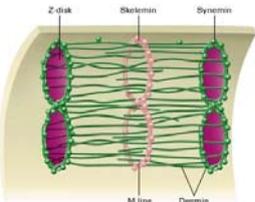
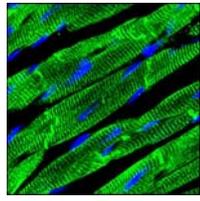
Adattato da Smith and Wood: Cell Biology, Chapman & Hall, London, 1992

DESMINA

- ⚡ Questa proteina è espressa soprattutto 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 microfilamente ad allinearsi in registro nelle fibre muscolari scheletriche ed entrambe rimangono come componenti minori nel muscolo scheletrico maturo.
- ⚡ La desmina è presente anche nella **muscolatura liscia** e 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

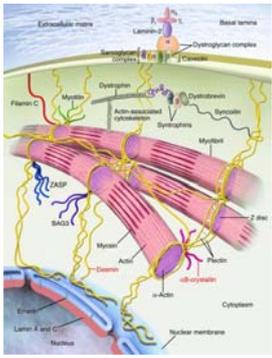
http://www.cellsignal.com/products/image/s/4024_ff_md_071214.jpg

Questi filamenti intermediari di tipi III avvolgono il disco Z e stabiliscono 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/>

Seminario

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

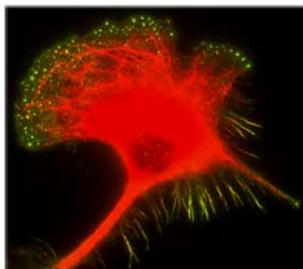


La **desmina** è la principale proteina dei FI del muscolo. Interagisce con altre proteine per sostenere le miofibrille a livello dei dischi Z e forma una rete continua di citoscheletro che mantiene i rapporti spaziali fra l'apparato contrattile e gli altri elementi strutturali della cellula. **La desmina mantiene l'integrità cellulare, la trasmissione di forza, e il segnalamento meccanochimico.** 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 disfunzioni 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

Seminario

Vimentina: cellule di origine mesenchimale

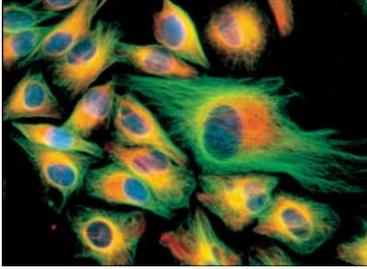


La rete di filamenti intermedi di vimentina (rosso) si estende verso i lamellipodi dove i tetrameri co-localizzano con la proteina filiprina (verde), che forma fasci di actina. Questi foci fluorescenti sono adesioni focali specializzate che si trovano negli osteoclasti e macrofagi, chiamati podosomi.

Correia I, Chu D, Chou YH, Goldman RD, Matsudaira P. Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. adhesion-dependent formation of filiprin-vimentin complexes in macrophages. *J Cell Biol.* 1999 Aug 23;146(4):831-42.

Seminario

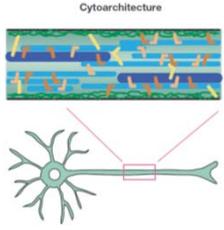
Vimentina: cellule di origine mesenchimale



<http://www.signaldrich.com/prodimages/c/c1801-if.jpg>

Seminario

Ruolo dei filamenti intermedi citoplasmatici nella citoarchitettura



Nei motoneuroni, la crescita radiale dei processi assionali richiede la loro interazione con neurofilamenti (blu chiaro) in modo da trovare la corretta stechiometria fra le subunità di PM "leggero" (NF-L), medio (NF-M) e "pesante" (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).

Intermediate Filament (IF) Proteins of the Nervous System

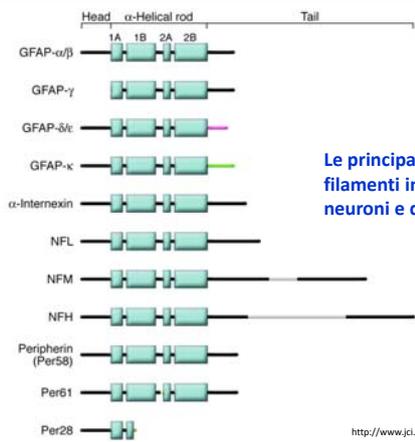
IF type	Subunit	Cell type
Type III	Vimentin	Neural and glial precursors
	GFAP	Astrocytes, some Schwann cells
	Peripherin	Subset of neurons, particularly in PNS, may coassemble with NFH/NFM/NFL
	Desmin	Smooth muscle cells in vasculature
Type IV	NFH	Most neurons, most abundant in large neurons
	NFM	
	NFL	
	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=bnchrn&part=A569&rendertype=table&id=A578>

Seminario

Le principali proteine dei filamenti intermedi dei neuroni e delle cellule gliali



<http://www.jci.org/articles/view/38003/figure/1>

Neurofilamenti

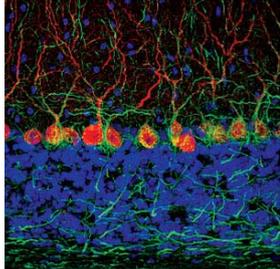
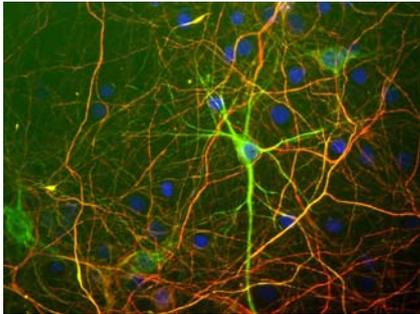


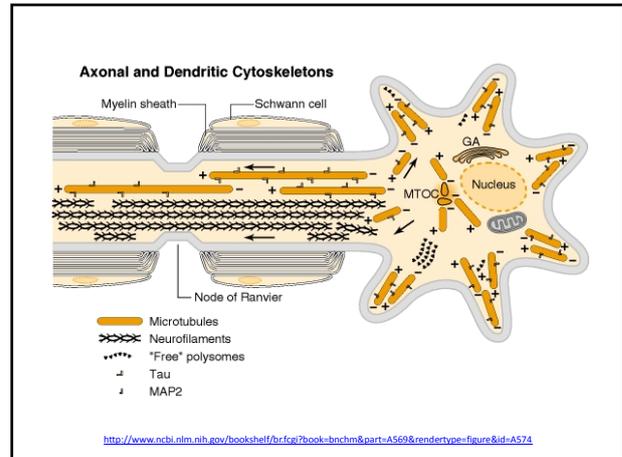
Immagine al microscopio confocale del cervelletto di topo immunomarcato con anticorpi RMdO 20 contro il Neurofilamento-H di topo (verde) e #2136 contro la proteina legante il calcio Calbindina (rosso). Pseudocolore blu = DRAQ5™ (fluocromo per il DNA).

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

Neurofilamenti



<http://www.encyclopedia.com/c/polyclical/CPCA-NF-H.htm>



Seminario

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 presenza sia di estremità "meno" che "più" 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.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bnchm&part=A569&rendertype=figure&id=A574>

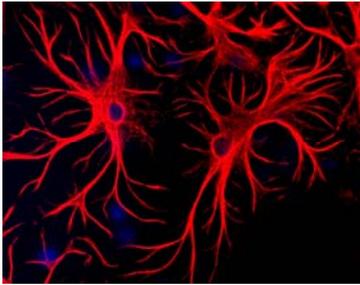
Seminario

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 corpi 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.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bnchm&part=A569&rendertype=figure&id=A574>

Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)



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

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 radio-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.

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

Seminario

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 ubidiscono 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 co-polimerizzano 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)

Seminario

Caratteristiche immunostochimiche dei tumori (1)

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

Seminario

Caratteristiche immunostochimiche dei tumori (2)

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 antigens	B- and T- cells	Gliomas, Carcinoids, small cell (lung), neuroblastomas, neuroendocrine, melanoma, meningiomas, schwannomas
Factor VIII related antigens	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	Rhabdomyosarcomas
		Muscle derived sarcomas
		Pheochromocytoma, carcinoids, paragangliomas

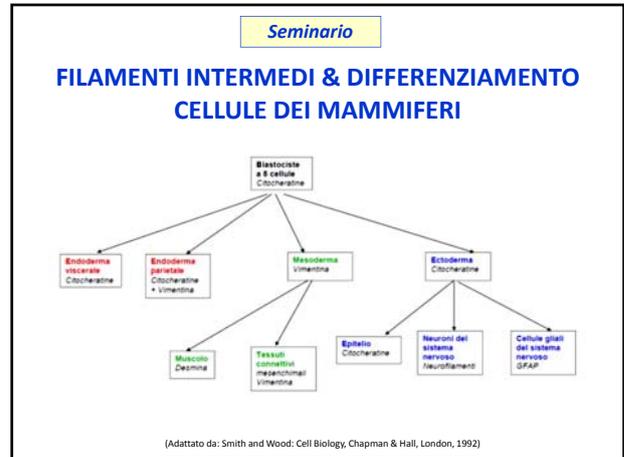


Table I. Types of Intermediate Filament

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

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 molecolare 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.

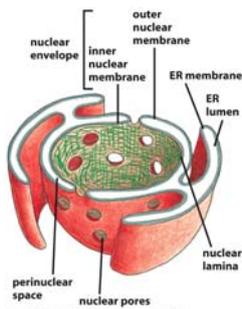
N.B. Importante anche per capitolo NUCLEO

Involucro nucleare (1)

- ✦ La scorsa decade ha visto un completo ripensamento della tradizionale visione dell'**involucro nucleare** come essendo 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)

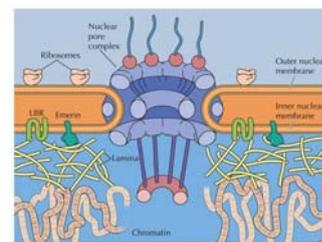
N.B. Importante anche per capitolo NUCLEO Involucro Nucleare (2)



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

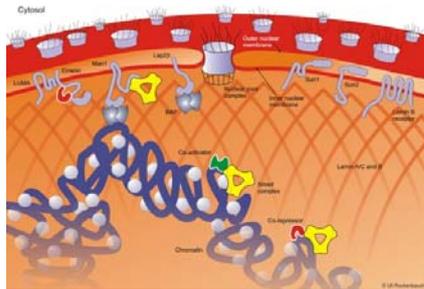
Figure 12-8 Molecular Biology of the Cell 5/e © Garland Science 2008

N.B. Importante anche per capitolo NUCLEO Lamina nucleare



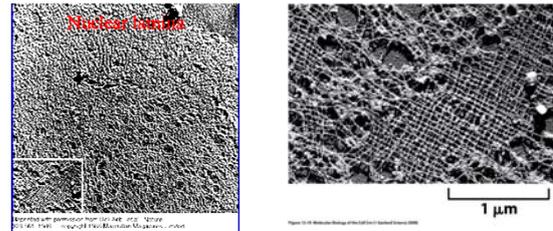
La **membrana nucleare interna** contiene diverse proteine integrali, tra cui l'**emerina** e il **recettore per la lamina B (LBR)** che **interagiscono con le lamine nucleari**. Le **lamine** interagiscono inoltre con la **cromatina**.

Lamina nucleare



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

Lamina Nucleare (Scanning Electron Microscopy)

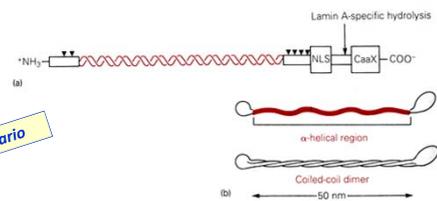


Lamina nucleare & Lamine

- ⚡ 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).

Schema di una molecola di lamina



Seminario

- ⚡ 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"

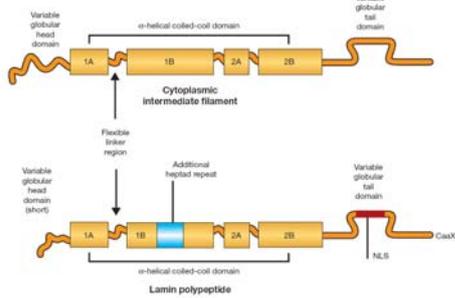
CaaX box: sito di modificazioni post-traduzionali.

Freccia: indica sito specifico di proteolisi della lamina A.

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

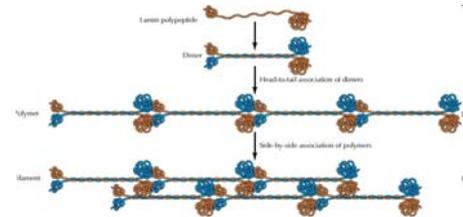
Seminario

Paragone tra filamenti intermedi del citoplasma e lamine



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

Modello di assemblaggio delle lamine

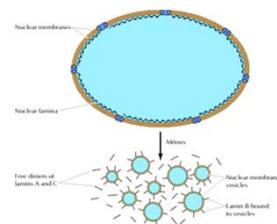


I polipeptidi delle lamine formano dimeri in cui le regioni centrali ad α -elica si avvolgono sull'altra. Ulteriore assemblaggio può coinvolgere un'associazione testa-coda dei dimeri per formare polimeri lineari e associazioni laterali di polimeri per formare filamenti.

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

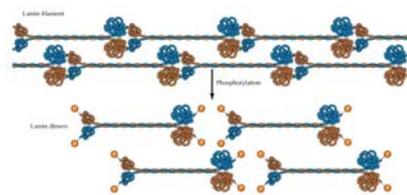
FRAMMENTAZIONE DELL'INVOLUCRO NUCLEARE (profase)

Importante per capitolo DIVISIONE CELLULARE



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.

Dissoluzione della lamina nucleare (profase)



La lamina nucleare consiste in una rete di filamenti di lamine. Nella mitosi, la proteina chinasi 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

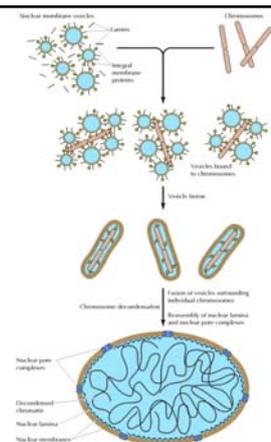
- ✚ Le **lamine A e C**, che sono codificate dalla stessa unità di trascrizione e prodotte per **splicing alternativo** di un singolo pre-mRNA, sono identiche, all'eccezione di una regione di 133 residui nel C-terminale della lamina A, che è assente nella lamina C.
- ✚ La **lamina B**, codificata da 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 (telofase)

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/A13.2/>