

# Struttura e funzioni fondamentali delle cellule

## STRUTTURA DELLE CELLULE

### Caratteristiche generali delle cellule

La forma delle cellule dei mammiferi varia considerevolmente in base alle loro interazioni, all'ambiente extracellulare e alla loro struttura interna. La loro superficie si presenta estremamente ripiegata durante i processi di assorbimento o di trasporto attraverso la membrana cellulare. La dimensione delle cellule è condizionata dal tasso di diffusione delle sostanze in entrata o in uscita dalla cellula o tra i diversi compartimenti subcellulari. I movimenti delle macromolecole possono essere molto accelerati e anche guidati dai processi di trasporto attivo attraverso le membrane plasmatiche e dai meccanismi di trasporto all'interno della cellula. A seconda della localizzazione delle funzioni di assorbimento o di trasporto, un'ampia superficie per il trasporto e la diffusione viene offerta dai microvilli apicali (Fig. 1.1) o dalle invaginazioni basolaterali.

La motilità è una proprietà della maggior parte delle cellule, dovuta a uno spostamento del citoplasma o di specifici organuli da una parte all'altra della cellula. Essa include anche l'estensione di porzioni della

superficie cellulare come pseudopodi, lamellipodi, filopodi e microvilli; lo spostamento di tutta la cellula come nella migrazione ameboide dei macrofagi tissutali; il battito dei flagelli o delle ciglia per far muovere la cellula (per esempio negli spermatozoi) o i fluidi che la circondano (per esempio a livello dell'epitelio respiratorio); la divisione cellulare; e la contrazione muscolare. I movimenti della cellula sono coinvolti anche nell'assunzione di sostanze dall'ambiente (endocitosi, fagocitosi) e nella fuoriuscita dalla cellula di grandi complessi molecolari (esocitosi, secrezione).

Le cellule epiteliali operano raramente in maniera indipendente le une dalle altre e, in genere, vanno a costituire degli aggregati aderendo le une alle altre, spesso grazie anche alla presenza di giunzioni intercellulari specializzate. Possono anche comunicare tra loro mediante la generazione e la captazione di segnali molecolari che diffondono attraverso gli spazi intercellulari oppure, più rapidamente, grazie alle interazioni tra specifiche molecole di segnale legate alla membrana. Gruppi di cellule coese costituiscono i tessuti e raggruppamenti più complessi di tessuti formano sistemi funzionali o organi.

La maggior parte delle cellule ha un diametro compreso fra 5 e 50  $\mu\text{m}$ : per esempio, i linfociti quiescenti misurano 6  $\mu\text{m}$ , gli eritrociti 7,5  $\mu\text{m}$ , mentre le cellule degli epitelii colonnari sono alte 20  $\mu\text{m}$  e larghe

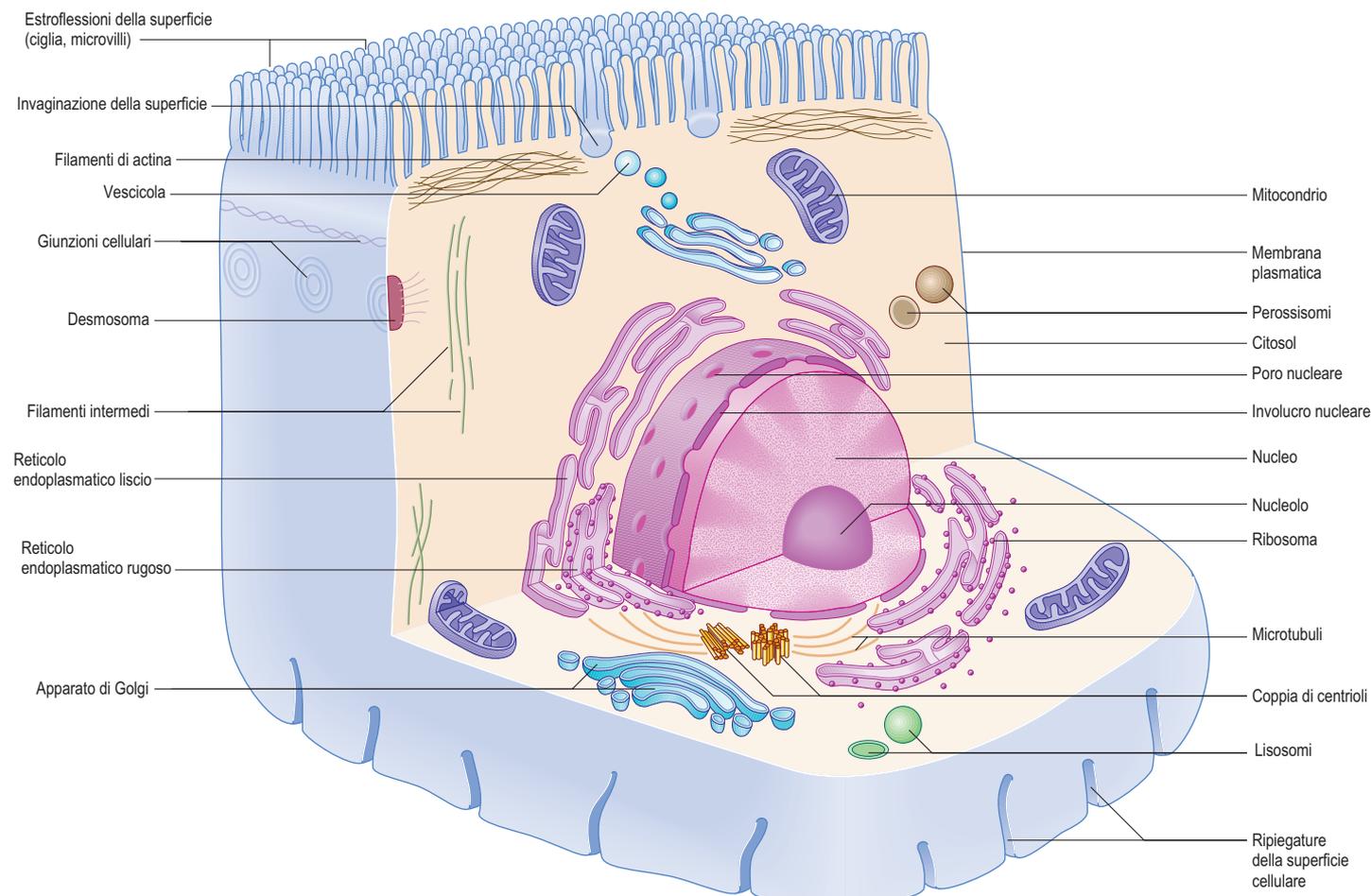
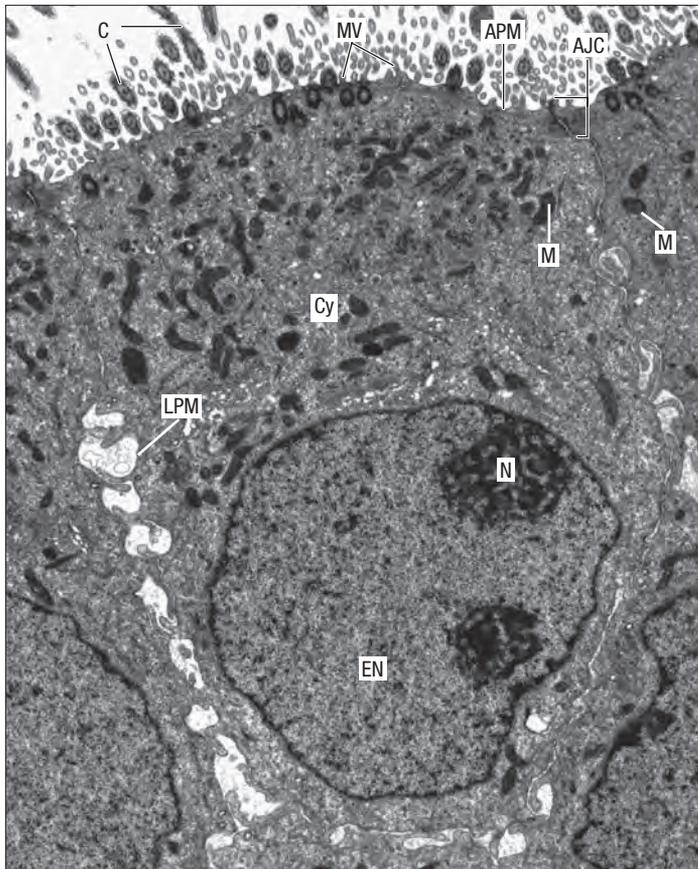


Fig. 1.1 Principali componenti strutturali e organizzazione interna di una cellula.

10  $\mu\text{m}$  (tutte le misure sono approssimate). Alcune cellule sono molto piú grandi: per esempio, i megacariociti del midollo osseo e gli osteoclasti per il rimodellamento osseo misurano piú di 200  $\mu\text{m}$  di diametro. I neuroni e le cellule del muscolo scheletrico hanno una forma relativamente estesa: alcuni neuroni misurano piú di 1 m di lunghezza.

## Organizzazione cellulare

Ogni cellula è delimitata dalla propria membrana plasmatica, che racchiude il citoplasma. Tutte le cellule, tranne gli eritrociti maturi, hanno un nucleo circondato dalla membrana o involucro nucleare (Fig. 1.2; si veda Fig. 1.1). Il nucleo contiene: i cromosomi, ove risiede il genoma della cellula; il nucleolo; e altre strutture subnucleari. Il citoplasma contiene strutture costituite da membrane a cui possono essere legati alcuni organuli. Tali formazioni costituiscono compartimenti distinti e separati del citoplasma e comprendono il reticolo endoplasmatico liscio, il reticolo endoplasmatico rugoso, l'apparato di Golgi e le vescicole da esso originate. Gli organuli comprendono i lisosomi, i perossisomi e i mitocondri. Il nucleo e i mitocondri sono delimitati da una duplice membrana, mentre lisosomi e perossisomi sono delimitati da una membrana singola. Esistono inoltre strutture non delimitate da membrana, dette inclusioni, che si trovano libere nel compartimento citosolico. Esse comprendono aggregati di glicogeno e pigmenti (per esempio lipofusina). Inoltre, nel citosol si ritrovano i ribosomi e una rete di proteine filamentose di collegamento, definita nel complesso



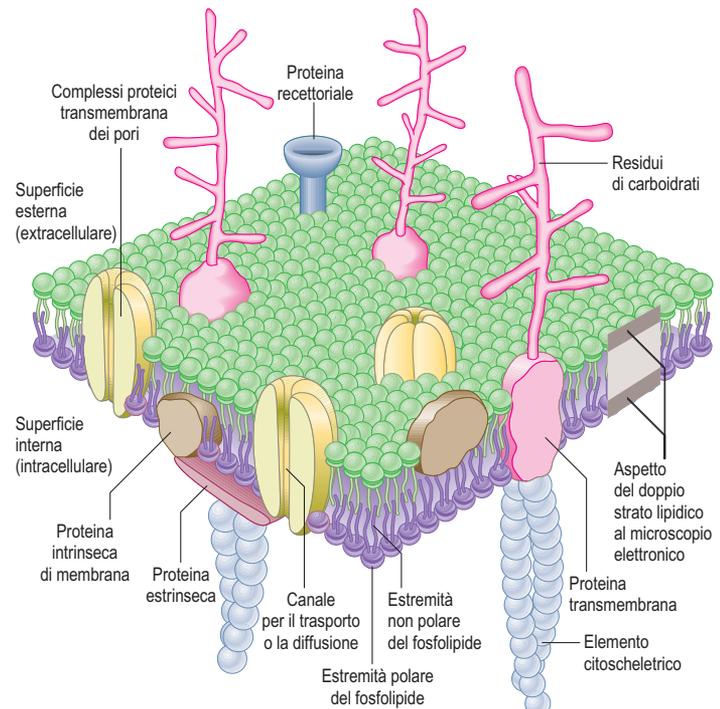
**Fig. 1.2** Organizzazione strutturale e alcuni dei principali organuli di una tipica cellula. In questo esempio si osserva una cellula dell'epitelio cilindrico ciliato della mucosa nasale umana. La cellula al centro, che occupa la maggior parte del campo visivo, è strettamente accostata alle cellule vicine lungo le superfici laterali delle loro membrane plasmatiche. A livello del complesso giunzionale apicale, queste membrane formano una zona saldamente sigillata (la giunzione serrata) che in questo caso isola i tessuti sottostanti dalla cavità nasale. Abbreviazioni: AJC, complesso giunzionale apicale; APM, membrana plasmatica apicale; C, ciglia; Cy, citoplasma; EN, nucleo euromatinico; LPM, membrana plasmatica laterale; M, mitocondri; MV, microvilli; N, nucleolo. (Per gentile concessione del Dr. Bart Wagner, Histopathology Department, Sheffield Teaching Hospitals, UK.)

citoscheletro. Il citoscheletro determina la forma della cellula e dà sostegno alle estroflessioni specializzate della superficie cellulare (microvilli, ciglia, flagelli). È inoltre coinvolto nell'assemblaggio di strutture specifiche (per esempio i centrioli) e regola i processi di trasporto nel citoplasma. Infine, il citosol contiene molte proteine solubili, ioni e metaboliti.

## Membrana plasmatica

Le cellule sono circondate da una membrana plasmatica specifica, che presenta aspetti in comune con i sistemi di membrane che suddividono in compartimenti il citoplasma e circondano il nucleo. Tutte le membrane sono formate da lipidi (soprattutto fosfolipidi, colesterolo e glicolipidi) e proteine, in percentuali approssimativamente uguali. I lipidi della membrana plasmatica sono disposti a formare un doppio strato lipidico, avente cioè lo spessore di due molecole lipidiche affrontate. L'estremità idrofobica di ogni molecola lipidica è rivolta verso l'interno della membrana, mentre l'estremità idrofila è rivolta verso l'esterno. La maggior parte delle proteine si trova inserita nel doppio strato lipidico oppure galleggia al suo interno, costituendo una sorta di mosaico fluido. Alcune proteine, a causa della presenza di grandi regioni idrofobiche nelle loro catene polipeptidiche, attraversano l'intero spessore della membrana (proteine transmembrana), mentre altre sono attaccate solo superficialmente al doppio strato mediante gruppi lipidici. Entrambe sono proteine integrali (intrinseche) di membrana, da distinguere dalle proteine periferiche (estrinseche) di membrana, che sono legate alla membrana solo mediante la loro associazione ad altre proteine. I carboidrati, sotto forma di oligosaccaridi o di polisaccaridi, si legano sia alle proteine (a formare glicoproteine) sia ai lipidi (a formare glicolipidi), e si estendono soprattutto nel dominio extracellulare (Fig. 1.3).

Combinazioni di tecniche biochimiche, biofisiche e biologiche hanno rivelato che i lipidi non sono distribuiti in modo omogeneo



**Fig. 1.3** Organizzazione molecolare della membrana plasmatica in base al modello del mosaico fluido. Nella categoria delle proteine intrinseche o integrali di membrana sono compresi anche i complessi che formano i canali per il trasporto di sostanze, le proteine recettoriali e le molecole di adesione. Queste possono attraversare l'intero spessore della membrana (si parla infatti di proteine transmembrana) e possono avere domini sia extracellulari che citoplasmatici. Le proteine transmembrana possiedono regioni idrofobiche che attraversano il doppio strato fosfolipidico e permettono alla proteina di "galleggiare" nel piano della membrana. Alcune proteine hanno una libertà di movimento limitata nei punti in cui i loro domini citoplasmatici sono ancorati al citoscheletro.

nelle membrane, ma alcuni si organizzano all'interno del doppio strato a formare microdomini, chiamati "membrane resistenti ai detergenti" o "raft" lipidici, ricchi in sfingomielinina e colesterolo. La capacità di determinati sottogruppi di proteine di ripartirsi nei differenti microdomini lipidici ha profondi effetti sulla loro funzione, come si osserva, per esempio, nel caso del recettore dei linfociti T e nella segnalazione cellula-cellula. La struttura altamente organizzata dei domini fornisce un ambiente idoneo ai meccanismi di segnalazione, al traffico di materiali e alla fusione delle membrane.

Al microscopio elettronico, le membrane fissate e impregnate di metalli pesanti come il tetrossido di osmio appaiono in sezione come due strati intensamente colorati separati da una zona elettronegativa, la classica unità di membrana. Lo spessore di ciascuno strato è all'incirca di 7,5 nm. Lo spessore complessivo della membrana plasmatica è generalmente di 15 nm. I piani di clivaggio con la metodica del *freeze fracture* passano solitamente lungo la parte idrofobica del doppio strato, dove le code idrofobiche dei fosfolipidi si incontrano, e dividono il doppio strato in due foglietti. Ciascuno dei due foglietti così separati ha una faccia superficiale e una faccia interna. La faccia superficiale di ciascun foglietto è rivolta verso il versante extracellulare (ES) o verso il versante intracellulare o protoplasmatico (citoplasmatico) (PS). La faccia extracellulare (EF) e la faccia protoplasmatica (PF) di ciascun foglietto si formano artificialmente in seguito al taglio della membrana. Questa tecnica ha anche dimostrato la presenza di particelle intramembrana inserite nel doppio strato lipidico; nella maggior parte dei casi, queste particelle intramembrana sono formate da grandi molecole proteiche transmembrana o da complessi proteici. Le particelle transmembrana sono distribuite in modo asimmetrico tra le due metà del doppio strato lipidico: di solito aderiscono di più a uno dei due foglietti del doppio strato che all'altro. Nelle membrane plasmatiche, il foglietto interno contiene la maggior parte delle particelle, che si vedono sulla sua superficie intracellulare (la PF). Laddove sono stati identificati, i gruppi (cluster) di particelle rappresentano in genere dei canali per il passaggio di ioni o molecole tra cellule adiacenti (*gap junction*, giunzioni comunicanti).

Le misurazioni biofisiche hanno dimostrato che il doppio strato lipidico è molto fluido e permette processi di diffusione all'interno della membrana. Le proteine possono pertanto muoversi liberamente sui piani della membrana, a meno che non siano ancorate all'interno della cellula. Le membrane in generale, e la membrana plasmatica in particolare, costituiscono dei confini che vanno a limitare selettivamente la diffusione e che creano compartimenti fisiologicamente distinti.

### **Trasporto attraverso le membrane cellulari**

La maggior parte delle molecole biologiche non può diffondere attraverso il doppio strato fosfolipidico. Specifiche proteine di trasporto, come le proteine carrier e le proteine canale, mediano il passaggio selettivo delle molecole attraverso la membrana, permettendo alla cellula di controllare la sua composizione interna. Alcune molecole (come l'ossigeno e l'anidride carbonica) sono in grado di attraversare la membrana plasmatica lungo il proprio gradiente di concentrazione, dissolvendosi dapprima nel doppio strato fosfolipidico e poi nell'ambiente acquoso presente a livello del versante citosolico o extracellulare della membrana. Questo meccanismo, chiamato diffusione passiva, non coinvolge proteine di membrana. Anche le sostanze lipidiche e liposolubili (per esempio, steroidi) possono attraversare il doppio strato.

Altre molecole biologiche (come il glucosio, le molecole cariche e i piccoli ioni  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Cl^-$ ) non sono in grado di dissolversi nell'interno idrofobico del doppio strato fosfolipidico. Richiedono quindi l'intervento di specifiche proteine trasportatrici e proteine canale, che facilitano il passaggio della maggior parte delle molecole biologiche attraverso un meccanismo chiamato diffusione facilitata. La diffusione facilitata richiede l'intervento di proteine carrier, che sono in grado di legarsi alle specifiche molecole da trasportare, oppure di proteine canale, che formano pori aperti attraverso la membrana. Le proteine carrier trasportano zuccheri, aminoacidi e nucleosidi. Le proteine canale formano canali ionici coinvolti nel trasporto rapido di ioni (trasporto più rapido rispetto a quello mediato dalle proteine carrier), sono altamente selettive alla dimensione e alla carica elettrica delle molecole e non sono costantemente aperte. I canali attivati dal ligando si aprono in risposta al legame di una molecola di segnalazione, mentre i canali attivati dal voltaggio si aprono in risposta a variazioni del potenziale elettrico attraverso la membrana. Analogamente alla diffusione passiva,

la diffusione facilitata delle molecole biologiche è determinata dai gradienti di concentrazione ed elettrico attraverso la membrana.

Esistono tre tipi di proteine trasporto: uniporto, simporto e antiporto. Le proteine di tipo uniporto possono essere proteine canale o proteine carrier. Sono coinvolte nella diffusione facilitata e trasportano una sola molecola alla volta da un lato all'altro della membrana lungo il rispettivo gradiente di concentrazione. Le proteine di tipo simporto e antiporto sono coinvolte nel trasporto attivo, in cui il trasportatore utilizza energia sotto forma di adenosina trifosfato (ATP) per mobilizzare le molecole contro il rispettivo gradiente di concentrazione al fine di mantenere le corrette concentrazioni di ioni e molecole all'interno delle cellule. Le proteine di tipo simporto sono cotrasportatori (come il cotrasportatore sodio-glucosio): trasportano due molecole simultaneamente o sequenzialmente nella stessa direzione. Le proteine di tipo antiporto, come la pompa sodio-potassio, trasportano due molecole simultaneamente o sequenzialmente in direzione opposta.

### **Traslocazione di proteine attraverso le membrane intracellulari**

Generalmente, le proteine sono sintetizzate sui ribosomi presenti nel citoplasma o a livello del reticolo endoplasmatico rugoso: alcune vengono sintetizzate a livello di ribosomi mitocondriali. Una volta sintetizzate, molte proteine rimangono nel citosol, dove svolgono le proprie funzioni. Altre, come le proteine intrinseche di membrana o le proteine di secrezione, sono traslocate attraverso le membrane intracellulari per subire le modificazioni post-traduzionali ed essere indirizzate alle proprie destinazioni. Tutto questo avviene grazie alla sequenza segnale, un sistema di indirizzamento contenuto nella sequenza aminoacidica della proteina, che viene riconosciuta dai recettori o dai traslocatori a livello della membrana appropriata. Le proteine vengono smistate in base alla propria sequenza segnale (o in base a una serie di sequenze che si riuniscono in una struttura segnale quando la proteina si ripiega nella sua configurazione terziaria), che ne consente il riconoscimento e l'ingresso nel corretto compartimento membranoso intracellulare.

Le proteine della membrana plasmatica forniscono inoltre superfici per l'ancoraggio degli enzimi, siti per la ricezione di segnali esterni, inclusi ormoni e altri ligandi, e siti per il riconoscimento e l'adesione di altre cellule. Dal lato interno, la membrana plasmatica può servire come sede di ancoraggio per strutture intracellulari, in particolare per quelle coinvolte nella motilità e nelle altre funzioni del citoscheletro. Le membrane cellulari sono sintetizzate dal reticolo endoplasmatico rugoso in collaborazione con l'apparato di Golgi.

### **Mantello cellulare (glicocalice)**

La superficie esterna della membrana plasmatica differisce strutturalmente dalle membrane interne in quanto possiede un rivestimento glucidico esterno di aspetto lanuginoso, il glicocalice, costituito dalle porzioni glucidiche delle glicoproteine e dei glicolipidi incastonati nella membrana plasmatica (si veda Fig. 1.3). Il mantello cellulare forma una parte integrante della membrana plasmatica, proiettandosi dalla superficie lipoproteica sotto forma di uno strato diffusamente filamentoso dello spessore di 2-20 nm o più.

La composizione del glicocalice varia secondo il tipo cellulare; molti antigeni tessuto- o cellulo-specifici sono localizzati nel mantello, tra di essi per esempio sono compresi gli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità e gli antigeni dei gruppi sanguigni sugli eritrociti. Il glicocalice svolge pertanto un ruolo significativo per quanto riguarda l'istocompatibilità, di particolare interesse per i trapianti di organo. Il glicocalice distribuito sui microvilli apicali degli enterociti, le cellule che formano l'epitelio di rivestimento intestinale, comprende enzimi impegnati nel processo digestivo. I microvilli intestinali sono estroflessioni cilindriche (lunghe 1-2  $\mu m$  e aventi un diametro di circa 0,1  $\mu m$ ) formanti uno strato fortemente organizzato detto orletto a spazzola, che amplifica la superficie assorbente degli enterociti (si veda Fig. 1.26).

## **Citoplasma**

### **Compartimenti e organizzazione funzionale**

Il citoplasma è formato dal citosol e da due sistemi di citomembrane, il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi, il tutto delimitato dalla membrana cellulare o plasmatica. Il citosol è un materiale simile a gel formato da proteine colloidali come enzimi, carboidrati e piccole molecole proteiche, insieme a ribosomi e acidi ribonucleici. Il citoplasma contiene inoltre organuli delimitati da membrane (lisosomi,

perossisomi e mitocondri), inclusioni prive di membrana (glicogeno e pigmenti) e il citoscheletro. Il contenuto nucleare, o nucleoplasma, è separato dal citoplasma per mezzo della membrana nucleare.

### Reticolo endoplasmatico

Il reticolo endoplasmatico è un sistema di canali delimitati da membrane e interconnessi fra loro, situato all'interno del citoplasma (Fig. 1.4). Questi canali assumono varie forme, tra cui quelle di cisterne (sacchi appiattiti), tubuli e vescicole. Le membrane dividono il citoplasma in due compartimenti principali. Il compartimento all'interno delle membrane o intramembrana, o spazio cisternale, comprende lo spazio in cui i prodotti destinati alla secrezione vengono immagazzinati o trasportati al complesso di Golgi e quindi successivamente all'esterno della cellula: si continua con lo spazio perinucleare.

Dal punto di vista strutturale, il sistema di canali può essere suddiviso in reticolo endoplasmatico rugoso o granuloso (RER), che presenta ribosomi attaccati sulla sua superficie citosolica esterna, e reticolo endoplasmatico liscio o agranulare (REL), che è privo di ribosomi. Le funzioni del reticolo endoplasmatico sono molteplici e comprendono: sintesi, ripiegamento (*fold*ing) e trasporto delle proteine; biosintesi e trasporto di fosfolipidi e composti steroidei; degradazione del glicogeno; mantenimento dell'omeostasi del calcio. La degradazione associata al reticolo endoplasmatico (ERAD) fa parte del sistema di controllo della qualità delle proteine cellulari ed è responsabile dell'eliminazione dal reticolo endoplasmatico (RE) di proteine malripiegate per la loro successiva degradazione da parte dei proteasomi citosolici.

In generale il RER è ben sviluppato nelle cellule che producono abbondanti proteine; mentre il REL è abbondante nelle cellule che producono steroidi e nelle cellule muscolari lisce. Il reticolo sarcoplasmatico è una variante del reticolo endoplasmatico nelle cellule

muscolari, dove il calcio viene immagazzinato per essere poi rilasciato nella contrazione muscolare. Per ulteriori approfondimenti circa il reticolo endoplasmatico, si veda Bravo et al. (2013).

### Reticolo endoplasmatico liscio

Il reticolo endoplasmatico liscio (si veda Fig. 1.4A) è associato al metabolismo dei carboidrati e a molti altri processi metabolici, tra cui i processi di detossificazione e la sintesi di lipidi, colesterolo e altri composti steroidei. Le membrane del reticolo endoplasmatico liscio offrono ancoraggio a numerosi sistemi enzimatici, tra cui, per esempio, il citocromo P450, che è coinvolto in importanti meccanismi di detossificazione e risulta così accessibile ai suoi substrati, che generalmente sono lipofili. Il reticolo endoplasmatico liscio degli epatociti (che sono in grado di immagazzinare glicogeno) contiene l'enzima glucosio-6-fosfatasi, che converte il glucosio-6-fosfato in glucosio, una tappa della gluconeogenesi. Queste membrane cooperano inoltre con il reticolo endoplasmatico rugoso e con l'apparato di Golgi per sintetizzare nuove membrane; le componenti proteiche, glucidiche e lipidiche vengono aggiunte a livello di compartimenti strutturali diversi.

### Reticolo endoplasmatico rugoso

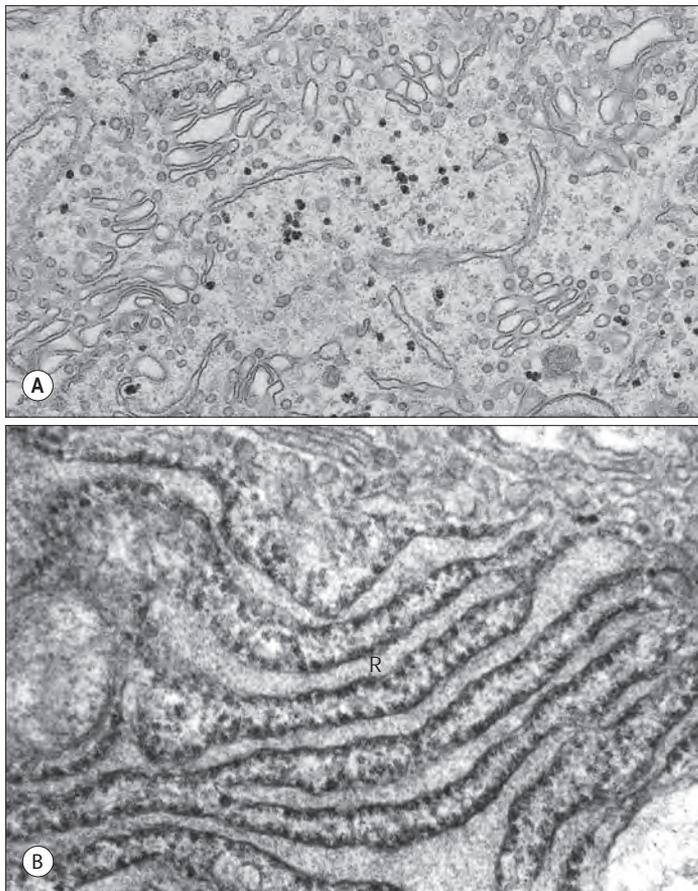
Il reticolo endoplasmatico rugoso è sede della sintesi proteica; la sua superficie citosolica è ricoperta di ribosomi (si veda Fig. 1.4B). I ribosomi si legano al reticolo endoplasmatico solo quando le proteine destinate alla secrezione cominciano a essere sintetizzate. La maggior parte delle proteine passa attraverso le sue membrane e si accumula nelle sue cisterne, sebbene alcune proteine intrinseche di membrana, come per esempio i recettori di membrana, siano inserite nella membrana del reticolo endoplasmatico rugoso, dove poi rimangono. Dopo il passaggio attraverso il reticolo endoplasmatico rugoso, le proteine rimangono all'interno di organuli citoplasmatici circondati da membrana come i lisosomi, oppure sono incorporate in una nuova membrana plasmatica, o sono secrete dalla cellula. Anche alcuni carboidrati sono sintetizzati da enzimi presenti nelle cavità del reticolo endoplasmatico rugoso, e possono essere uniti alle proteine neoformate (glicosilazione). Le vescicole gemmano dal reticolo endoplasmatico rugoso, per il trasporto nel Golgi in una fase del processo cellulare di targeting delle proteine.

### Ribosomi, poliribosomi e sintesi proteica

I ribosomi sono complessi macromolecolari che catalizzano la sintesi delle proteine a partire dagli aminoacidi; la loro sintesi e il loro assemblaggio in subunità avvengono nel nucleolo e comprendono l'associazione di RNA ribosomiale (rRNA) a proteine ribosomiali traslocate nel nucleolo dalla loro sede di sintesi nel citoplasma. Le singole subunità sono poi trasportate al citoplasma dove rimangono separate le une dalle altre fino a quando non sintetizzano attivamente le proteine. I ribosomi sono granuli di circa 25 nm di diametro, composti da molecole di rRNA e proteine distribuite in due diverse subunità. Le subunità possono essere separate mediante un'ultracentrifugazione in base al loro coefficiente di sedimentazione (S) in due componenti: uno, con coefficiente di sedimentazione 60S più grande e un componente con coefficiente di sedimentazione 40S, più piccolo. Le subunità sono associate a 73 proteine diverse (40 nella subunità grande e 33 in quella piccola), che rivestono funzioni strutturali ed enzimatiche. La subunità maggiore è formata da tre piccoli filamenti di rRNA estremamente convoluti (28S, 5.8S e 5S), mentre la subunità minore è formata da un singolo filamento (18S).

Una cellula contiene milioni di ribosomi. Essi possono formare dei gruppi (detti poliribosomi o polisomi) attaccati all'RNA messaggero (mRNA), che è da essi tradotto durante la sintesi proteica per formare proteine che saranno utilizzate fuori dal sistema dei compartimenti di membrane, come per esempio gli enzimi del citosol e le proteine citoscheletriche. Alcuni di questi prodotti citosolici includono proteine che saranno inserite direttamente nelle membrane (o attraverso le membrane) di specifici organuli, come i mitocondri e i perossisomi. I ribosomi possono essere attaccati alle membrane del reticolo endoplasmatico rugoso (si veda Fig. 1.4B).

In un polisoma maturo, tutti i siti di legame dell'mRNA sono occupati mentre i ribosomi si muovono lungo l'mRNA stesso, sintetizzando le proteine in base alla sequenza nucleotidica. Di conseguenza, il numero e gli spazi di intervallo tra i ribosomi in un polisoma sono indicativi della lunghezza della molecola di mRNA e quindi delle dimensioni della proteina che si sta formando. Le due subunità svolgono ruoli diversi nella sintesi proteica. La subunità 40S è il sito di legame e traduzione



**Fig. 1.4 A.** Reticolo endoplasmatico liscio con vescicole associate. Le particelle dense sono granuli di glicogeno. **B.** Reticolo endoplasmatico rugoso (R), dove le cisterne racchiuse del reticolo endoplasmatico sono punteggiate di ribosomi a livello delle loro superfici citoplasmatiche. (A. Per gentile concessione di Rose Watson, Cancer Research UK. B. Per gentile concessione del Dr. Bart Wagner, Histopathology Department, Sheffield Teaching Hospitals, UK.)

dell'mRNA. La subunità 60S è responsabile del rilascio della proteina neoformata e, qualora indicato, del legame al reticolo endoplasmatico mediante una proteina di attacco intermedia che guida le proteine neosintetizzate attraverso la membrana fin dentro alle cisterne.

La sintesi proteica sui ribosomi può essere soppressa da una classe di molecole di RNA chiamata RNA interferente breve (siRNA) o RNA silenziatore. Queste molecole generalmente hanno una lunghezza di 20-25 nucleotidi e si legano (come complesso con proteine) a specifiche molecole di mRNA attraverso la loro sequenza complementare. Questo determina una distruzione enzimatica dell'mRNA o previene lo spostamento dei ribosomi lungo l'mRNA stesso. La sintesi della proteina codificata viene di conseguenza impedita. La loro normale funzione può essere di tipo antivirale o avere effetti protettivi. È inoltre possibile sviluppare siRNA artificiali come strumento terapeutico per inibire i geni associati alla malattia.

### Apparato di Golgi (complesso di Golgi)

L'apparato di Golgi è un sistema separato di citomembrane, localizzato in prossimità del nucleo e del centrosoma. Esso è particolarmente evidente nelle cellule secretorie quando viene colorato con argento o altri sali metallici. Il traffico tra il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi è bidirezionale e avviene tramite vescicole di trasporto che si formano per gemmazione da un sito donatore, vanno a coniugarsi e si fondono con il sito di destinazione.

Le golgine sono lunghe proteine, avvolte a spirale, che aderiscono alla superficie citoplasmatica delle membrane cisternali e formano una matrice fibrillare che circonda l'apparato di Golgi per renderlo stabile; esse sono implicate nel traffico delle vescicole (Witkos e Lowe 2015). L'apparato di Golgi ha molte funzioni: è correlato al flusso anterogrado e retrogrado di proteine e lipidi nei processi di secrezione; è la sede in cui si verifica la glicosilazione di proteine e lipidi, e fornisce le superfici di membrana alle quali si legano le proteine che funzionano nel *signaling* e nello smistamento.

Dal punto di vista ultrastrutturale, l'apparato di Golgi (Fig. 1.5A) ha un aspetto simile a un nastro continuo costituito da una pila di numerose cisterne membranose appiattite e da gruppi di vescicole che ne circondano le superfici. Le cisterne differiscono per il loro contenuto e per l'attività enzimatica. Le piccole vescicole di trasporto provenienti dal reticolo endoplasmatico rugoso, generate mediante un processo di gemmazione, vengono captate da una faccia delle cisterne del complesso di Golgi, la faccia *cis* convessa (superficie di ingresso o di formazione), dove rilasciano il proprio contenuto alla prima cisterna della serie mediante fusione delle membrane. La proteina è trasportata dai confini della cisterna alla cisterna successiva mediante gemmazione di vescicole e successiva fusione, e tale processo si ripete finché non viene raggiunta l'ultima cisterna a livello della faccia *trans* concava (superficie di uscita o di condensazione). Qui, si formano le vescicole più grandi per raggiungere altre parti della cellula.

Le reti di membrane *cis*-Golgi e *trans*-Golgi sono parte integrante dell'apparato di Golgi (Fig. 1.5B). Il network *cis* di Golgi è un'area costituita da complessi canali formati da membrane interposti fra il reticolo endoplasmatico rugoso e la faccia *cis* di Golgi che riceve e trasferisce le vescicole in entrambe le direzioni. La sua funzione è quella di selezionare, tra le proteine sintetizzate dal reticolo endoplasmatico rugoso, quelle adatte a essere trasferite, tramite vescicole, al complesso delle cisterne di Golgi, mentre quelle inappropriate vengono riportate indietro al reticolo endoplasmatico rugoso.

Anche il network *trans* di Golgi, all'altro lato del complesso, è un'area di canali formati da membrane interconnessi fra loro e coinvolti nello smistamento delle proteine. Qui, le proteine modificate nelle cisterne di Golgi, vengono impacchettate selettivamente in vescicole e quindi inviate a regioni diverse della cellula. L'impacchettamento dipende dal riconoscimento, da parte della rete *trans* di Golgi, di particolari sequenze aminoacidiche che fungono da segnali e fanno sì che la proteina venga inserita in una vescicola formata da una membrana dalla composizione adatta, in modo tale che sia poi possibile effettuare ulteriori modifiche: per esempio, estraendo l'acqua per aumentare la concentrazione (vescicole che rientrano nel processo dell'esocitosi) o pompando protoni all'interno della vescicola stessa per acidificarne il contenuto (lisosomi destinati ai processi di smistamento intracellulare).

A livello delle cisterne dell'apparato di Golgi, le proteine vanno incontro a una serie di modificazioni chimiche successive a opera di enzimi presenti nel Golgi e sintetizzati nel reticolo endoplasmatico

rugoso. Queste comprendono: glicosilazione (cambiamenti nei gruppi glicosidici, per esempio rimozione di mannosio e aggiunta di *N*-acetilglucosamina e acido sialico); solfatazione (aggiunta di gruppi solfato ai glicosaminoglicani); e fosforilazione (aggiunta di gruppi fosfato). Alcuni cambiamenti servono come segnale per indirizzare proteine e lipidi verso la loro destinazione all'interno della cellula, come lisosomi e membrana plasmatica. Anche i lipidi formati nel reticolo endoplasmatico sono indirizzati alle vescicole per esservi incorporati.

### Pathway di esocitosi (secrezione)

Proteine, lipidi, glicoproteine, piccole molecole come ammine e altri prodotti cellulari destinati a essere esportati fuori dalle cellule, sono trasportati verso la membrana plasmatica in piccole vescicole rilasciate dalla faccia *trans* dell'apparato di Golgi. Questo processo può essere costitutivo, con trasporto e secrezione che si verificano più o meno continuamente, come la produzione delle immunoglobuline nelle plasmacellule, o essere regolato da segnali esterni, come il controllo della secrezione salivare a opera della stimolazione da parte del sistema nervoso autonomo. Nella secrezione controllata, il prodotto di secrezione è stoccato temporaneamente in granuli secretori delimitati da membrana o vescicole. L'esocitosi avviene mediante fusione della membrana della vescicola secretoria con la membrana plasmatica e conseguente rilascio del contenuto della vescicola nell'ambiente extracellulare. Nelle cellule dotate di polarità, per esempio la maggior parte delle cellule epiteliali, l'esocitosi si verifica in corrispondenza della membrana apicale. Le cellule epiteliali ghiandolari riversano il prodotto di secrezione nel lume di un dotto, come nel caso del pancreas, o in corrispondenza della superficie libera, come nel caso dell'epitelio di rivestimento dello stomaco. Negli epatociti, la bile è secreta attraverso un'area molto ristretta della membrana plasmatica che forma la parete del canalicolo biliare. Questa regione, la membrana plasmatica apicale, è la sede della secrezione esocrina, mentre la secrezione delle proteine plasmatiche da parte degli epatociti nel flusso ematico avviene specificamente in corrispondenza delle superfici basolaterali delle cellule che si affacciano sui sinusoidi. L'impacchettamento dei diversi prodotti di secrezione nelle vescicole appropriate avviene nella porzione *trans* di Golgi. L'invio delle vescicole secretorie alle giuste aree della membrana plasmatica avviene grazie alla presenza di specifiche sequenze di smistamento presenti nelle estremità citoplasmatiche delle proteine della membrana delle vescicole.

### Pathway di endocitosi (internalizzazione)

Il processo di endocitosi inizia a livello della membrana plasmatica e termina nei lisosomi (si veda oltre) implicati nella degradazione del materiale endocitato grazie all'attività enzimatica delle idrolasi lisosomiali. Il materiale da endocitare viene internalizzato a livello della membrana plasmatica negli endosomi precoci e quindi negli endosomi tardivi. Questi ultimi trasportano il loro contenuto ai lisosomi dove il materiale viene degradato in seguito alla fusione e al rimescolamento dei contenuti degli endosomi e dei lisosomi. Gli endosomi precoci derivano dalle vescicole endocitotiche (caveole e vescicole rivestite di clatrina). Una volta internalizzate, le vescicole endocitotiche perdono il loro rivestimento di adaptina e clatrina e si fondono a formare l'endosoma precoce dove le molecole recettoriali rilasciano le molecole legate precedentemente. La membrana e i recettori provenienti dagli endosomi precoci possono essere riciclati in corrispondenza della superficie cellulare come vescicole di esocitosi.

L'endocitosi clatrina-dipendente ha luogo a livello di zone specializzate della membrana plasmatica chiamate invaginazioni rivestite (*coated pits*); questo meccanismo è utilizzato anche per internalizzare i ligandi legati alle molecole recettoriali di superficie ed è detto anche endocitosi recettore-mediata. Le *caveolae* sono vescicole di pinocitosi strutturalmente distinte, utilizzate soprattutto dalle cellule dell'endotelio e del muscolo liscio, nelle quali sono coinvolte in meccanismi di transitosi, di trasduzione del segnale e probabilmente anche in altre funzioni. Oltre che con gli endosomi tardivi, i lisosomi possono fondersi anche con fagosomi, autofagosomi e porzioni di membrana plasmatica destinate alla riparazione delle membrane. Le idrolasi lisosomiali processano e degradano materiali esogeni (fagocitosi o eterofagia) e materiale endogeno (autofagia). La fagocitosi consiste nell'internalizzazione da parte di cellule specializzate di agenti patogeni che hanno invaso l'organismo, o cellule apoptotiche o altri materiali estranei. I lisosomi sono numerosi nelle cellule con elevata fagocitosi, per esempio macrofagi e granulociti neutrofili, responsabili della distruzione delle particelle fagocitate, come

i batteri. Queste cellule possono contenere fagosomi, vescicole potenzialmente in grado di contenere un microrganismo patogeno e di fondersi con diversi lisosomi.

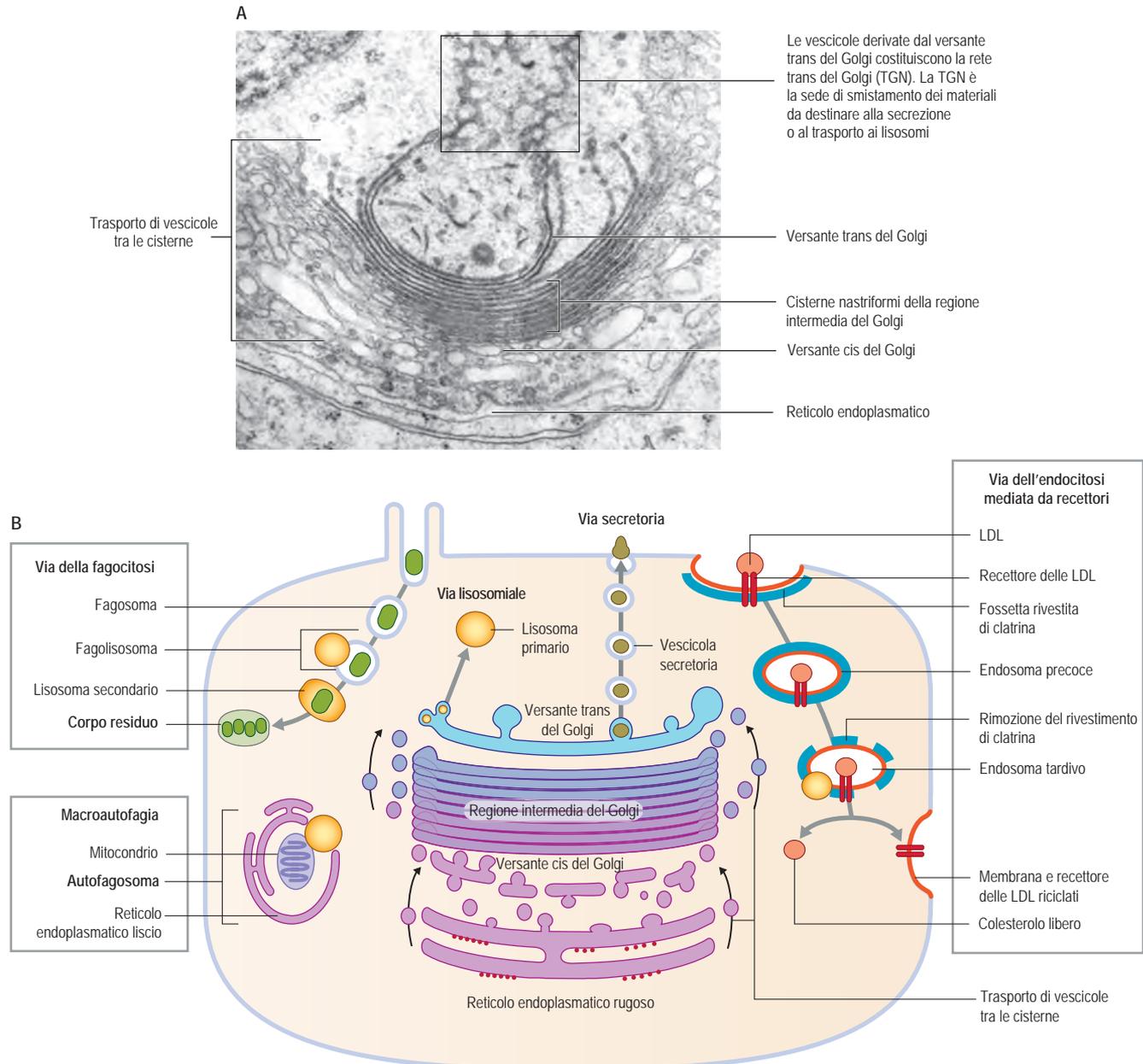
Alcune cellule specializzate del sistema immunitario, le cellule presentanti l'antigene (APC), degradano a livello lisosomiale molecole proteiche (antigeni) trasportate mediante endocitosi e ne espongono dei frammenti all'esterno della cellula al fine di stimolare una risposta immunitaria, inizialmente mediata dai linfociti T helper.

Gli endosomi tardivi ricevono enzimi lisosomiali da lisosomi primari (Fig. 1.5C), derivati dall'apparato di Golgi, in seguito all'accolamento e alla fusione delle membrane dell'endosoma tardivo e del lisosoma, seguiti dalla diffusione del contenuto dei lisosomi nel lume dell'endosoma. Il pH interno all'organulo ibrido di fusione, detto lisosoma secondario, è basso (circa 5,0): ciò attiva le idrolasi acide lisosomiali per la degradazione del contenuto dell'endosoma. I prodotti

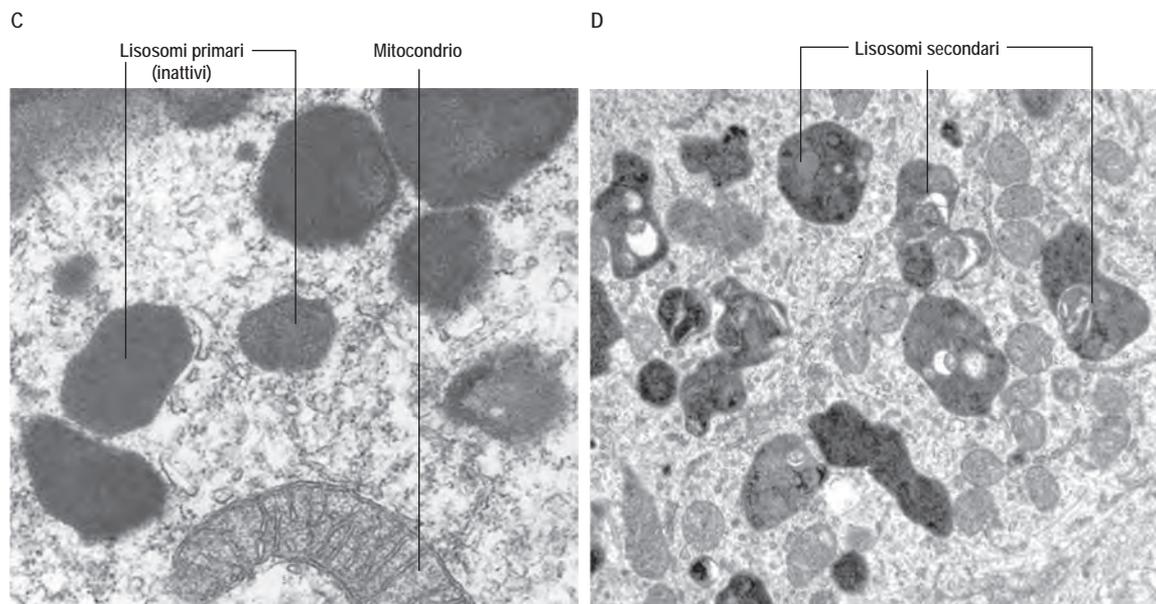
dell'idrolisi possono passare attraverso la membrana nel citosol o possono essere trattenuti nel lisosoma secondario (Fig. 1.5D). I lisosomi secondari possono aumentare notevolmente di dimensioni per fusione vescicolare e formare corpi multivescicolari, la concentrazione enzimatica può aumentare fortemente per formare grandi lisosomi.

**Lisosomi**

I lisosomi sono organuli delimitati da membrana, del diametro di 80-800 nm, spesso contenenti complesse inclusioni di materiale che va incontro a idrolisi (lisosomi secondari). Due classi di proteine partecipano alla funzione lisosomiale, ovvero idrolasi acide solubili e proteine lisosomiali integrali di membrana. Ciascuna delle 60 o più idrolasi acide note (tra cui proteasi, lipasi, glicosidasi, esterasi e nucleasi), degrada un substrato specifico. Esistono circa 25 proteine lisosomiali di membrana che partecipano all'acidificazione del lume lisosomiale,



**Fig. 1.5 A.** L'apparato di Golgi è costituito da quattro compartimenti principali funzionalmente distinti. I prodotti derivati dal reticolo endoplasmatico entrano nell'apparato di Golgi a livello del versante *cis* del Golgi. I materiali fuoriescono in corrispondenza del versante *trans*. La regione *intermedia* del Golgi è costituita da una pila di cisterne nastriformi interposte tra le facce *cis* e *trans* del Golgi. I materiali destinati al trasporto verso i lisosomi o alla secrezione (esocitosi) vengono smistati nella rete *trans* del Golgi (TGN). **B.** Esistono tre vie principali per la degradazione intracellulare dei materiali. Le particelle extracellulari possono essere assunte mediante fagocitosi o endocitosi mediata da recettori. Le componenti intracellulari senescenti vengono degradate mediante macroautofagia, un processo non selettivo. L'apparato di Golgi rilascia vescicole destinate alla secrezione oppure vescicole contenenti lisosomi che rimangono nella cellula. I lisosomi sono organuli che contengono circa 40 tipi di enzimi idrolitici attivi in un ambiente acido (pH approssimativamente pari a 5,0) (*segue*).



**Fig. 1.5 Seguito.** C. I lisosomi primari sono siti di immagazzinamento inattivi per gli enzimi idrolitici. D. I lisosomi secondari sono deputati alla degradazione dei materiali e contengono residui delle strutture degradate. (A, C e D. Per gentile concessione di Kierszenbaum AL, Tres LL *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*, 5th ed. Elsevier. Copyright 2019.)

al trasporto di proteine dal citosol, alla fusione con la membrana e al trasporto dei prodotti di degradazione al citoplasma. I materiali che sono stati idrolizzati nei lisosomi secondari, possono essere completamente degradati a prodotti solubili, per esempio aminoacidi, che vengono riciclati mediante vie metaboliche. Tuttavia, di solito la degradazione è incompleta, e residuano alcuni detriti. Una vescicola piena di detriti è detta corpo residuo o lisosoma terziario (si veda Fig. 1.5B) e può essere trasferita alla superficie cellulare, dove è espulsa mediante esocitosi; in alternativa, può rimanere all'interno della cellula come un corpo residuo inerte. All'interno delle cellule a vita lunga può accumularsi un numero considerevole di corpi residui che spesso si fondono a dare grandi vacuoli densi con complesse inclusioni lamellari. Poiché i loro contenuti hanno spesso una pigmentazione scura, essi possono cambiare il colore del tessuto: nei neuroni, per esempio, il prodotto finale della digestione lisosomiale, la lipofuscina (neuromelanina o pigmento senile), dà ai cervelli di età avanzata una colorazione bruno-giallastra. Gli enzimi lisosomiali possono anche essere secreti, spesso di un processo che va a modificare la matrice extracellulare, come si riscontra nell'erosione osteoclastica durante il riassorbimento osseo. Per ulteriori approfondimenti circa la biogenesi dei lisosomi, si veda Saftig e Klumperman (2009).

### Disfunzioni dei lisosomi

Il fattore di trascrizione EB (TFEB) è responsabile della regolazione della biogenesi e della funzione dei lisosomi, della segnalazione tra nucleo e lisosomi e del catabolismo lipidico (per ulteriori approfondimenti, si veda Settembre et al. 2013). In presenza di un'alterazione dell'azione delle idrolasi lisosomiali, del meccanismo di acidificazione dei lisosomi o delle proteine della membrana lisosomiale, si verifica una disfunzione progressiva dei lisosomi in diversi organi e tessuti. Ciò può essere dovuto da una difettiva degradazione e riciclo dei substrati extracellulari rilasciati ai lisosomi dall'endosoma tardivo o dei substrati intracellulari destinati all'autofagia.

Le malattie da accumulo lisosomiale (LSD, Lysosomal Storage Disorders), dipendono da disfunzioni lisosomiali. Sono state identificate circa 60 forme diverse di LSD in base al tipo di materiale accumulato nelle cellule (come mucopolisaccaridi, sfingolipidi, glicoproteine, glicogeno e lipofuscine).

### Perossisomi

I perossisomi sono piccoli (0,2-1  $\mu\text{m}$  di diametro) organuli delimitati da membrana, presenti nella maggior parte delle cellule dei mammiferi. Contengono più di 50 enzimi responsabili di numerosi processi catabolici e di sintesi biochimica, in particolare della  $\beta$ -ossidazione di acidi grassi a catena molto lunga (>C22) e del metabolismo del perossido di

idrogeno (da cui il nome di perossisomi). I perossisomi possono derivare da perossisomi preesistenti che si dividono per scissione. In alternativa, possono originare de novo per gemmazione di vescicole pre-perossisomiali dal reticolo endoplasmatico e forse dai mitocondri (Farré et al. 2019). Tutte le proteine della matrice e alcune proteine della membrana dei perossisomi sono sintetizzate dai ribosomi del citosol e contengono un segnale per i perossisomi in modo tale da consentire di essere importate per mezzo di proteine dette perossine (Braverman et al. 2013, Theodoulou et al. 2013).

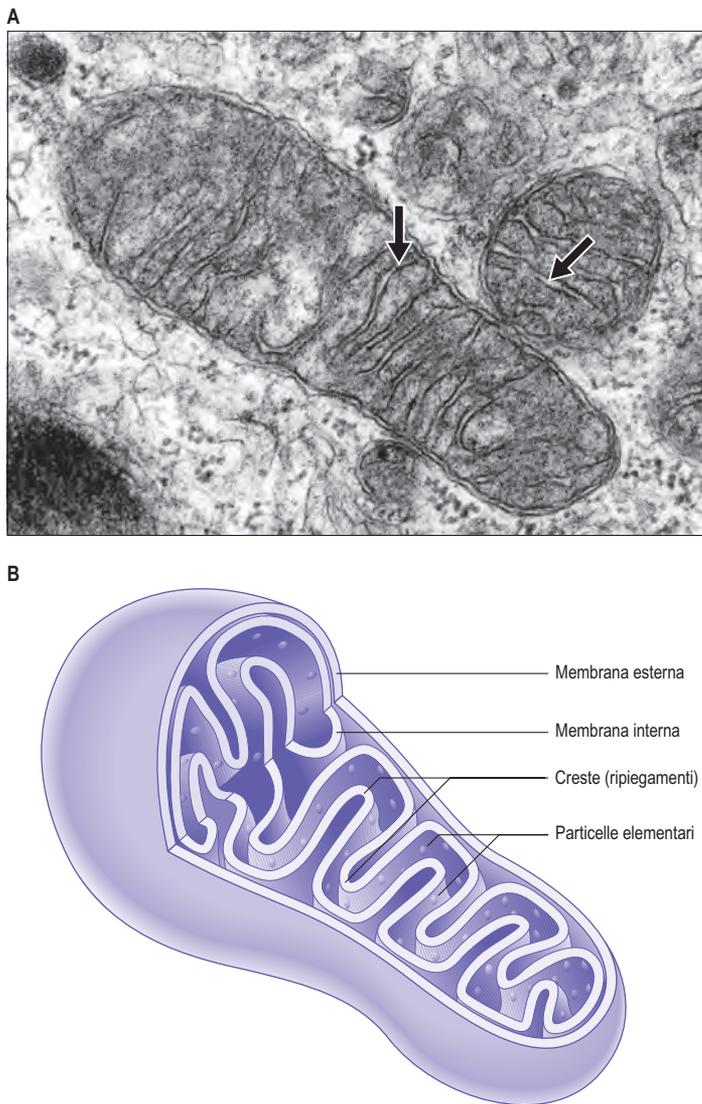
I perossisomi spesso contengono inclusioni cristalline composte principalmente dall'enzima urato ossidasi in concentrazioni elevate. Le ossidasi usano ossigeno molecolare per ossidare substrati organici specifici (come l-aminoacidi, D-aminoacidi, urato, xantina e acidi grassi a catena molto lunga) e producono perossido di idrogeno che viene detossificato (degradato) da una catalasi dei perossisomi. Essi sono importanti nella detossificazione ossidativa di vari substrati assunti o prodotti dalle cellule. Sono particolarmente numerosi negli epatociti.

L'accumulo di acidi grassi a catena molto lunga nel sistema nervoso e nei surreni determina il deterioramento progressivo della funzione cerebrale e insufficienza surrenalica (malattia di Addison). Per ulteriori approfondimenti, si veda Braverman et al. (2013).

### Mitocondri

I mitocondri appaiono al microscopio ottico come strutture sottili e allungate nel citoplasma della maggior parte delle cellule, specie quelle con intenso metabolismo come le cellule secernenti delle ghiandole esocrine. Al microscopio elettronico, i mitocondri in genere appaiono come corpi rotondeggianti o ellittici lunghi 0,5-2,0  $\mu\text{m}$  (Fig. 1.6), formati da: una membrana mitocondriale esterna; una membrana mitocondriale interna separata da quella esterna mediante uno spazio intermembrane; creste, invaginazioni della membrana interna che ospitano ATP sintetasi per la formazione dell'ATP; matrice mitocondriale, uno spazio delimitato dalla membrana interna e da numerose creste. La permeabilità delle due membrane mitocondriali differisce considerevolmente: la membrana esterna è liberamente permeabile a molte sostanze per la presenza di grandi canali aspecifici formati da proteine (le porine), mentre la membrana interna è permeabile solo a uno spettro (range) ristretto di molecole. La presenza di cardiolipina, un fosfolipide, nella membrana interna può contribuire a tale impermeabilità relativa.

I mitocondri sono la sorgente principale di energia chimica nella maggior parte delle cellule. Essi sono la sede del ciclo dell'acido citrico (o ciclo di Krebs) e della catena di trasporto degli elettroni (catena dei citocromi) per mezzo della quale molecole organiche complesse sono alla fine ossidate in anidride carbonica e acqua. Questo processo



**Fig. 1.6** Mitochondri nel muscolo cardiaco umano. Le creste ripiegate (frecce) si proiettano nella matrice dalla membrana mitocondriale interna. **B.** Localizzazione delle particelle elementari che accoppiano reazioni di ossidazione e di fosforilazione. (**A.** Per gentile concessione del Dr. Bart Wagner, Histopathology Department, Sheffield Teaching Hospitals, UK.)

fornisce l'energia necessaria per la produzione di ATP dall'adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorganico (fosforilazione ossidativa). I vari enzimi del ciclo dell'acido citrico sono localizzati nella matrice mitocondriale, mentre quelli del sistema dei citocromi e della fosforilazione ossidativa sono localizzati principalmente nella membrana mitocondriale interna. Lo spazio tra le membrane ospita il citocromo *c*, una molecola implicata nell'attivazione dell'apoptosi.

Il numero di mitocondri in una determinata cellula riflette le sue esigenze energetiche; per esempio nell'epatocita ve ne possono essere fino a 2.000, mentre nel linfocita a riposo di solito ve ne sono molto pochi. Gli eritrociti maturi sono del tutto privi di mitocondri. Le cellule con pochi mitocondri di solito utilizzano ampiamente la glicolisi per le loro necessità energetiche. Queste comprendono alcune cellule molto attive, per esempio le fibre muscolari scheletriche a contrazione rapida, che sono in grado di agire rapidamente solo per periodi limitati. I mitocondri sono distribuiti all'interno delle cellule in funzione dei fabbisogni energetici locali, per esempio in prossimità della base delle ciglia negli epitelii ciliati, a livello del dominio basale delle cellule nei tubuli contorti prossimali della corteccia del rene (dove si verificano importanti processi di trasporto attivo), nonché attorno al segmento prossimale, chiamato tratto intermedio, del flagello degli spermatozoi. Nelle cellule viventi i mitocondri cambiano continuamente forma e posizione intracellulare; crescono e si moltiplicano per divisione e possono andare incontro a fusione.

I mitocondri possono essere coinvolti in reazioni metaboliche tessuto-specifiche: i mitocondri delle cellule epatiche, per esempio, contengono vari enzimi per la produzione di urea. Inoltre, un certo numero di malattie genetiche mitocondriali interessano esclusivamente particolari tessuti, come per esempio le miopatie mitocondriali (che colpiscono il muscolo scheletrico) e le neuropatie mitocondriali (che interessano il tessuto nervoso).

La matrice mitocondriale è un ambiente acquoso che contiene una varietà di enzimi e filamenti di DNA mitocondriale con la capacità di trascrivere e tradurre un unico set di geni mitocondriali (mRNA e RNA transfer mitocondriali, ribosomi mitocondriali con rRNA). Il DNA forma un anello di circa 5  $\mu\text{m}$  di diametro, di cui in ogni mitocondrio sono presenti numerose copie identiche. Il rapporto tra le basi si differenzia da quello del DNA nucleare; anche le sequenze di RNA differiscono nello specifico codice genetico utilizzato per la sintesi proteica. Almeno 13 enzimi della catena respiratoria della matrice e della membrana interna vengono codificati dal piccolo numero di geni presenti nel DNA mitocondriale (mtDNA). La stragrande maggioranza delle proteine mitocondriali è codificata da geni nucleari, sintetizzata nel citosol e quindi inserita attraverso canali speciali nelle membrane mitocondriali, per raggiungere le proprie destinazioni. I lipidi delle membrane mitocondriali vengono sintetizzati nel reticolo endoplasmatico.

I ribosomi mitocondriali sono più piccoli e alquanto diversi da quelli presenti nel resto della cellula, in quanto assomigliano a quelli batterici (così come gli acidi nucleici mitocondriali). Questa somiglianza è a supporto della teoria secondo cui gli antenati dei mitocondri fossero batteri utilizzatori di ossigeno che vivevano in relazione simbiotica con cellule eucariote incapaci di metabolizzare l'ossigeno prodotto dalle prime piante.

È stato dimostrato che i mitocondri sono di origine materna, poiché i mitocondri dello spermatozoo generalmente non vengono incorporati nell'ovulo al momento della fecondazione. Dal momento che i mitocondri si formano solo da mitocondri preesistenti, tutti i mitocondri dell'organismo derivano da quelli presenti nel citoplasma dell'ovulo. I mitocondri (come anche le variazioni e le mutazioni genetiche mitocondriali) vengono pertanto trasmessi solo attraverso la linea femminile. Per ulteriori informazioni sulla genetica e sui disordini mitocondriali, si veda Chinnery e Hudson (2013).

### Inclusioni citoplasmatiche

Il citosol acquoso circonda gli organuli membranosi descritti nei paragrafi precedenti. Esso contiene anche varie inclusioni non circondate da membrana, tra cui ribosomi liberi, componenti del citoscheletro e altre inclusioni come granuli di accumulo (per esempio glicogeno), pigmenti (come granuli di lipofuscina, residui del metabolismo ossidativo lipidico presenti nella corticale del surrene).

### Vacuoli lipidici

I vacuoli lipidici sono corpi sferici di dimensioni variabili presenti in molte cellule, ma particolarmente abbondanti soprattutto negli adipociti (o cellule adipose) del tessuto connettivo adiposo. Non appartengono al sistema dei vacuoli connesso al Golgi. I vacuoli lipidici dispersi nel citosol sono circondati dalle proteine perilipine che regolano l'accumulo dei lipidi e la lipolisi. Per ulteriori approfondimenti sull'obesità e sulle perilipine, si veda Smith e Ordovás (2012). Nelle cellule specializzate per l'immagazzinamento lipidico i vacuoli raggiungono gli 80  $\mu\text{m}$  e oltre di diametro. Essi funzionano negli adipociti come depositi di energia chimica, isolanti termici e anche come ammortizzatori degli insulti meccanici. In molte cellule, possono rappresentare i prodotti finali di altre vie metaboliche, come, per esempio, nelle cellule che sintetizzano steroidi, dove costituiscono una componente preminente del citoplasma. Possono anche essere secreti, come avviene nell'epitelio alveolare della mammella durante l'allattamento.

### Signalling cellulare

I sistemi cellulari dell'organismo comunicano tra loro allo scopo di coordinare e integrare le loro funzioni mediante una serie di processi, definiti complessivamente come meccanismi di *signalling* cellulare, nell'ambito dei quali una molecola segnale prodotta da una cellula è captata da un'altra, quasi sempre grazie a specifiche proteine recettoriali. La cellula che riceve il segnale, che nella maggior parte dei casi è rilevato a livello della membrana plasmatica, lo trasduce in messaggi chimici intracellulari che modificano il comportamento della cellula.

## CELLULE, TESSUTI E SISTEMI

Il segnale può agire su lunghe distanze, come avviene per esempio nel *signalling* del sistema endocrino, mediante il rilascio di ormoni nel torrente ematico, oppure nel *signalling* sinaptico neuronale mediante la trasmissione di impulsi elettrici lungo gli assoni e il successivo rilascio di trasmettitori chimici a livello delle sinapsi o delle giunzioni neuromuscolari. Un tipo particolare di *signalling* endocrino (detto neurocrino o neuroendocrino) si ha quando i neuroni o i paraneuroni (per esempio le cellule cromaffini della midollare del surrene) secernono un ormone nel fluido interstiziale o nel torrente ematico. In alternativa, il *signalling* può avvenire a breve raggio attraverso un meccanismo paracrino, in cui cellule di un certo tipo rilasciano molecole nel fluido interstiziale circostante. Tali molecole sono poi captate dalle cellule vicine di tipo diverso che esprimono proteine recettoriali specifiche.

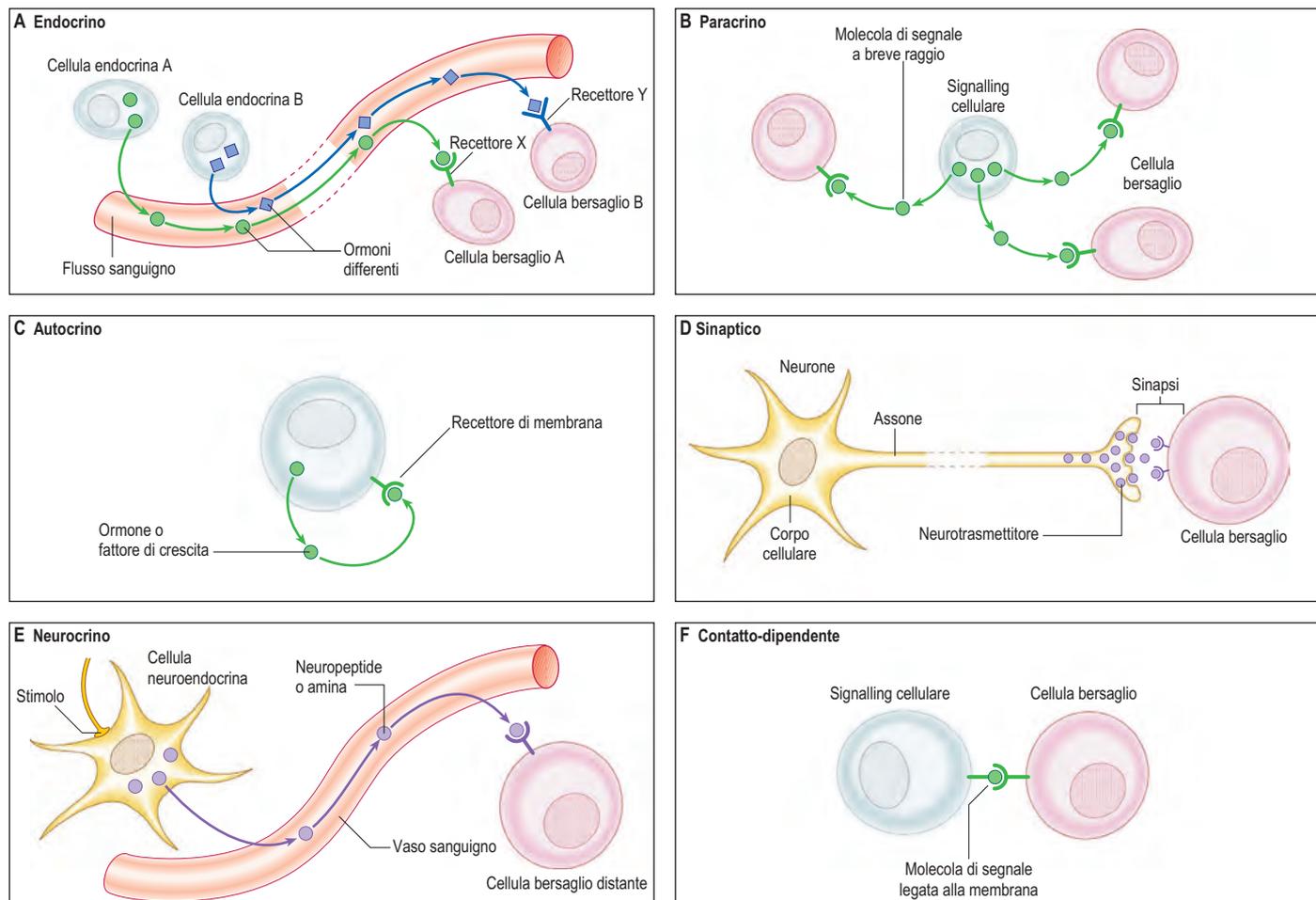
Il *signalling* neuroendocrino utilizza messengeri chimici che sono utilizzati anche nel sistema nervoso centrale, i quali possono agire in modo paracrino attraverso il fluido interstiziale, oppure possono raggiungere tessuti bersaglio più lontani mediante il flusso ematico. Le cellule possono produrre e rispondere allo stesso segnale. È questo il *signalling* autocrino, un fenomeno che rafforza le funzioni coordinate di un gruppo di cellule analoghe, che rispondono insieme a un'alta concentrazione di una molecola *signalling* locale. La forma più estrema di *signalling* a breve distanza è quella contatto-dipendente (si parla di *signalling* giustacrino), in cui una cellula risponde alle proteine transmembrana di una cellula adiacente che si legano ai recettori di superficie presenti sulla membrana plasmatica della cellula stessa. Il *signalling* contatto-dipendente include anche la risposta cellulare che fa seguito al legame delle integrine espresse sulla membrana agli elementi della matrice extracellulare. Il *signalling* giustacrino è importante durante lo sviluppo e nella risposta immunitaria. Questi diversi meccanismi di *signalling* intercellulare sono illustrati nella **Figura 1.7**.

### Molecole di signalling e loro recettori

La maggior parte delle molecole di *signalling* (ligandi) è idrofila e quindi non può attraversare la membrana plasmatica di una cellula ricevente

per operare dei cambiamenti al suo interno se prima non si lega a una proteina recettoriale sulla membrana plasmatica. I ligandi sono principalmente proteine (di solito glicoproteine), polipeptidi o amine biogene altamente cariche, e comprendono: i classici ormoni peptidici del sistema endocrino; le citochine, prodotte principalmente dalle cellule di derivazione ematica e coinvolte nelle risposte infiammatorie e nel rimodellamento tissutale (per esempio gli interferoni, le interleuchine, il fattore di necrosi tumorale, il fattore inibente la leucemia); i fattori di crescita polipeptidici (per esempio la superfamiglia del fattore di crescita epiteliale, il fattore di crescita neuronale, il fattore di crescita derivato dalle piastrine, la famiglia del fattore di crescita dei fibroblasti, il fattore di crescita trasformante- $\beta$  e i fattori di crescita insulino-simili). I fattori di crescita polipeptidici sono molecole polifunzionali prodotte da e attive su un numero di tipi cellulari maggiore di quanto suggeriscano i loro nomi. Questi fattori e i loro recettori sono spesso mutati o espressi in modo aberrante in certi tumori. La variante genica che è causa di tumore è definita oncogene trasformante, mentre la versione normale (selvaggia, *wild-type*) del gene è l'oncogene cellulare o proto-oncogene. Il recettore attivato funziona come un trasduttore che genera segnali intracellulari, i quali possono essere piccoli secondi messengeri che diffondono con facilità (per esempio il calcio, il cAMP o il diacilglicerolo liposolubile della membrana plasmatica) oppure complessi proteici più grandi che amplificano il segnale e lo ritrasmettono ai sistemi di controllo della cellula.

Alcune molecole segnale sono idrofobiche, per cui possono attraversare liberamente la membrana plasmatica. Esempi classici sono gli ormoni steroidei, gli ormoni tiroidei, i retinoidi e la vitamina D. Gli steroidi, per esempio, entrano nelle cellule in maniera non selettiva, ma danno origine a una risposta specifica solo in quelle cellule bersaglio che esprimono specifici recettori citoplasmatici o nucleari. Anche gli stimoli luminosi attraversano la membrana plasmatica dei fotorecettori e, almeno nei bastoncelli, interagiscono con le proteine recettoriali fotosensibili legate alla membrana. I ligandi idrofobici vengono trasportati nel torrente ematico o nei fluidi interstiziali,



**Fig. 1.7** Le diverse modalità di *signalling* intercellulare.

generalmente legati a proteine di trasporto, e spesso hanno un'emivita più lunga ed effetti più duraturi sui propri bersagli rispetto ai ligandi idrosolubili.

Un altro gruppo di molecole *signalling* che sono in grado di attraversare liberamente la membrana plasmatica è rappresentato dai gas, in particolare l'ossido nitrico. Il principale bersaglio del *signalling* a breve raggio dell'ossido nitrico è il muscolo liscio che, in risposta a esso, si rilassa. L'ossido nitrico è rilasciato dall'endotelio vascolare come risultato dell'azione del sistema nervoso autonomo che innerva la parete vasale, e va a determinare a livello locale il rilassamento del muscolo liscio e la conseguente dilatazione dei vasi. Nel pene, questo meccanismo è responsabile dell'erezione. L'ossido nitrico si distingue dalle altre molecole di *signalling* in quanto non si lega a una specifica proteina recettoriale: agisce infatti direttamente sugli enzimi che attivano la risposta intracellulare.

### Proteine recettoriali

Esistono almeno 20 diverse famiglie di proteine recettoriali, ognuna delle quali comprende numerose isoforme che rispondono a ligandi diversi. La maggior parte di questi recettori è costituita da proteine transmembrana. I membri di ogni famiglia condividono alcune caratteristiche strutturali relative al dominio extracellulare dove si trovano i siti di legame per il ligando, oppure al dominio citoplasmatico che attiva meccanismi di trasduzione del segnale, oppure a entrambi i domini. Vi sono scarse correlazioni tra la natura di un ligando e sia la famiglia di proteine recettoriali a cui esso si lega e che attiva, sia i meccanismi di trasduzione del segnale mediante i quali si realizza la risposta intracellulare. Lo stesso ligando può attivare tipi di recettori fondamentalmente diversi in cellule differenti.

I recettori polipeptidici espressi sulla superficie cellulare sono generalmente classificati denominati in base al loro collegamento con uno dei seguenti tre sistemi intracellulari: recettori legati a canali ionici, recettori accoppiati a proteine G o recettori connessi a sistemi enzimatici. Esistono altri recettori non si inseriscono perfettamente in nessuna di queste categorie. Tutti i recettori noti accoppiati a proteine G appartengono a una categoria di proteine strutturali che attraversano la membrana sette volte con una serie di anse. Per questo, tali recettori sono conosciuti come recettori a sette domini transmembrana o, poiché le regioni transmembrana sono formate da domini ad  $\alpha$ -elica, come recettori a sette eliche. In quest'ampia categoria di recettori, antichi dal punto di vista filogenetico, quelli meglio conosciuti sono le proteine del sistema olfattivo che legano le molecole odorose, il recettore luce-sensibile, la rodopsina e molti recettori per farmaci clinicamente utili. Un elenco completo delle proteine recettoriali, dei ligandi che le attivano ed esempi delle funzioni biologiche che ne derivano è presente in Pollard et al. (2016).

### Principali vie di signalling

La maggior parte dei recettori della superficie cellulare stimola enzimi target intracellulari, che a loro volta trasmettono e amplificano un segnale in seguito al legame di un ligando. Una via di *signalling* può attivare una serie di target intracellulari situati a valle del recettore, in particolare l'attività di proteine intracellulari o, come avviene per i recettori dei neurotrasmettitori, può controllare il flusso di acqua (acquaporine) ed elettroliti attraverso la formazione di canali ionici ligando-dipendenti situati sulla membrana plasmatica. Un segnale amplificato può essere propagato al nucleo, in modo da regolare l'espressione genica in risposta a uno stimolo cellulare esterno.

Un'importante via di *signalling* intracellulare è la via dell'adenosina monofosfato ciclico (cAMP). Per esempio, quando l'adrenalina (epinefrina) si lega al suo recettore, si verifica un aumento della concentrazione intracellulare di cAMP. L'adrenalina determina la degradazione del glicogeno a glucosio prima della contrazione muscolare. Il cAMP si forma a partire dall'ATP per azione dell'enzima adenilato ciclasi e viene degradato a adenosina monofosfato (AMP) per azione dell'enzima cAMP fosfodiesterasi. Questo meccanismo ha portato all'idea di un primo messaggero (adrenalina) che media un effetto di *signalling* cellulare prodotto da un secondo messaggero, il cAMP.

Le vie di *signalling* svolgono un ruolo importante nello sviluppo embrionale e fetale, nella modellazione dell'asse corporeo, nonché nella migrazione e proliferazione delle cellule. Tutte contengono componenti soggette a vari meccanismi di regolazione e interazione reciproca e alcune utilizzano differenti effettori a valle attivati da specifici

fattori di trascrizione. Le seguenti vie di *signalling* hanno rilevanza clinica: le vie di *signalling* JAK-STAT, Hedgehog (Hh), Wnt, nonché quelle mediate dal fattore di crescita trasformante (TGF)- $\beta$ . Per esempio, l'eritropoietina stimola lo sviluppo della linea eritroide (formazione dei globuli rossi del sangue) nel midollo osseo attraverso un meccanismo che coinvolge la via JAK-STAT.

### Citoscheletro

Il citoscheletro è una rete tridimensionale di proteine filamentose intracellulari di diverse forme, dimensioni e composizione, distribuite in tutto il citoplasma. Esso fornisce un supporto meccanico, mantiene la forma e la rigidità cellulare e rende le cellule capaci di assumere forme estremamente asimmetriche o irregolari. Svolge un ruolo importante nello stabilire la polarità strutturale e i diversi domini funzionali a livello della cellula. Fornisce anche un supporto meccanico alle estroflessioni permanenti della superficie cellulare (si veda oltre) come i microvilli persistenti e la ciglia, nonché ai processi transitori come le sottili protrusioni digitiformi dette filopodi (0,1-0,3  $\mu$ m) e lamellipodi (0,1-0,2  $\mu$ m). I filopodi sono formati da fasci paralleli di filamenti di actina e hanno un ruolo nella migrazione cellulare, nella guarigione delle ferite e nella crescita neuritica. Le sottili e ampie protrusioni dette lamellipodi, che si trovano lungo il bordo delle cellule mobili, contengono una rete ramificata di filamenti di actina.

Il citoscheletro confina strutture specifiche in particolari distretti cellulari, per esempio l'apparato di Golgi vicino al nucleo e al reticolo endoplasmatico, e i mitocondri vicino alle sedi che richiedono energia. Inoltre, il citoscheletro fa da guida per il trasporto intracellulare (per esempio lo spostamento di vescicole e macromolecole, dette cargo, verso i diversi siti citoplasmatici), per il movimento dei cromosomi durante la divisione cellulare (mitosi e meiosi), o per il movimento dell'intera cellula nella morfogenesi embrionale o nella migrazione chemiotattica extravascolare dei leucociti durante l'*homing*. Esempi di funzioni altamente sviluppate e specializzate del citoscheletro comprendono la contrazione del sarcomero nelle cellule muscolari striate e la flessione dell'assonema di ciglia e flagelli.

L'elenco delle proteine strutturali del citoscheletro è vasto e in continua espansione. Le principali strutture filamentose localizzate in cellule non muscolari sono i microfilamenti (7 nm di spessore), i microtubuli (25 nm di spessore) e i filamenti intermedi (10 nm di spessore). Altre componenti importanti sono rappresentate dalle proteine che si legano ai principali tipi di filamento per collegarli o scollegarli, per regolarne la stabilità o per generare il movimento. Tra queste rientrano le proteine leganti l'actina come la miosina, che in alcune cellule si possono assemblare a dare filamenti spessi, e le proteine associate ai microtubuli. Patologie caratterizzate da anomalie del citoscheletro comprendono: ciliopatie (dipendenti da anomalie dell'assemblaggio e della funzione di centrioli, corpi basali e ciglia); malattie neurodegenerative (conseguenti a difetti nel trasporto anterogrado di neurotrasmettitori lungo i microtubuli negli assoni) e sterilità (determinata da difetti o assenza di dineina associata ai microtubuli negli assonemi, per esempio nella sindrome di Kartagener).

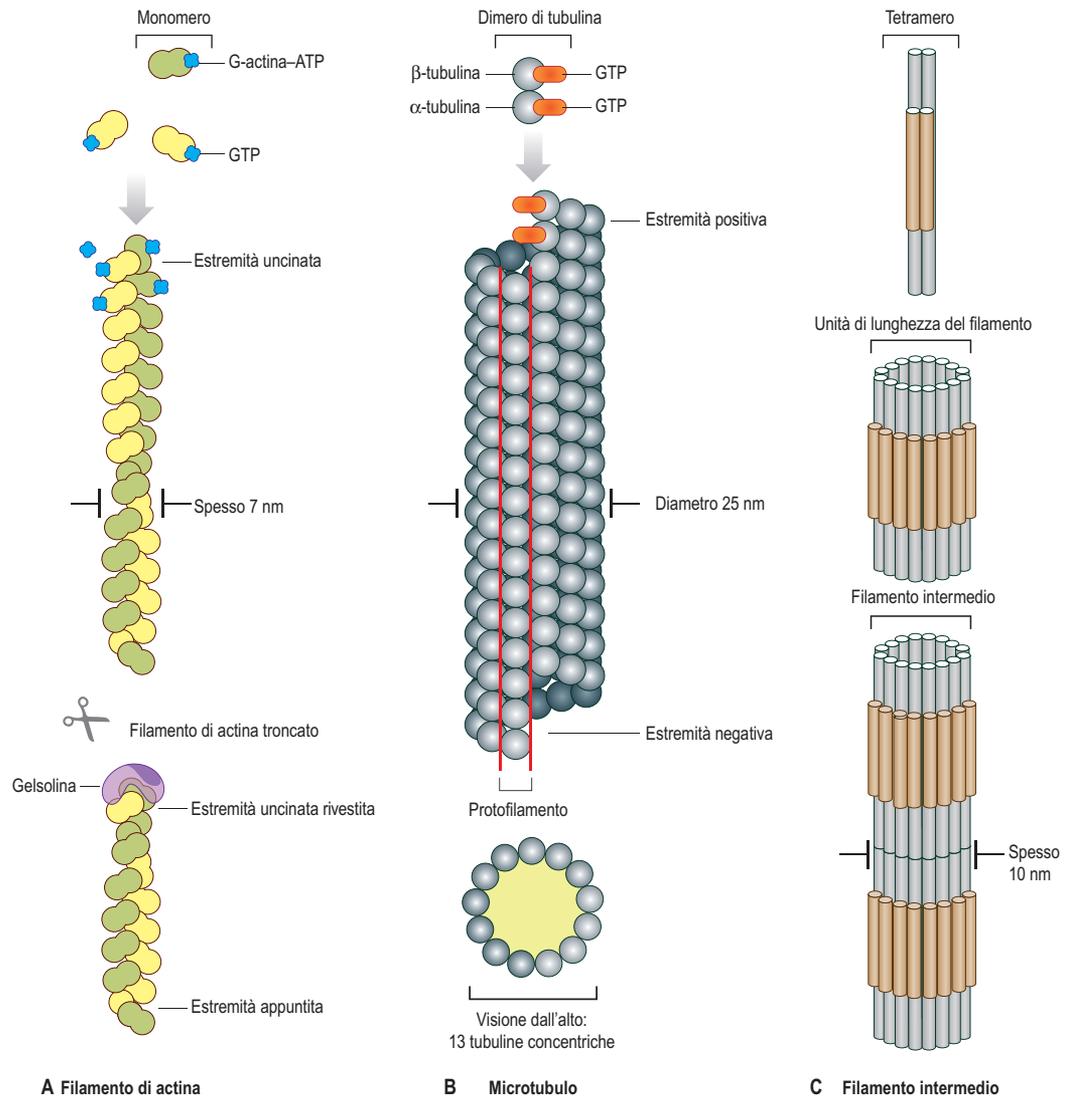
### Filamenti di actina (microfilamenti)

I filamenti di actina sono filamenti flessibili, con uno spessore di 7 nm (Fig. 1.8A). Nella maggior parte dei tipi cellulari, l'actina è la proteina più abbondante e in alcune cellule mobili la sua concentrazione può essere superiore a 200  $\mu$ m (10 mg di proteina per mL di citoplasma). I filamenti sono formati dalla polimerizzazione ATP-dipendente di monomeri di actina (con una massa molecolare di 43 kDa) e hanno un aspetto caratteristico a filo di perle in cui le subunità si dispongono a formare un'elica ristretta con i giri distanziati di 13 subunità (Dominquez 2010). La forma filamentosa polimerizzata è detta F-actina (actina filamentosa) mentre quella non polimerizzata monomerica è detta G-actina (actina globulare). Ogni monomero ha una struttura asimmetrica. Quando i monomeri polimerizzano, conferiscono una polarità definita al filamento: l'estremità positiva, o uncinata, favorisce l'aggiunta di monomeri, mentre quella negativa, o appuntita, ne favorisce il distacco.

Il processo di *treadmilling* consiste nella simultanea polimerizzazione di un filamento di actina a una estremità e depolimerizzazione all'altra estremità per mantenere invariata la sua lunghezza.

Per ulteriori approfondimenti, si veda Bray (2001).

**Fig. 1.8** Aspetti molecolari e strutturali dei componenti del citoscheletro. **A.** Il filamento di actina (F-actina) è una catena polimerica spessa 7 nm, formata da monomeri di G-actina legati all'ATP. La F-actina consta di un'estremità uncinata (positiva), sito di inizio dell'actina, e un'estremità appuntita (negativa), sito di dissociazione della F-actina. La F-actina può essere tagliata e ricoperta in corrispondenza dell'estremità uncinata dalla gelsolina. **B.** Il microtubulo è un polimero di 25 nm di diametro formato da dimeri di  $\alpha$ -tubulina e  $\beta$ -tubulina legate al GTP. Il dimero si assembla all'estremità positiva e si depolimerizza a quella negativa. Una catena lineare di dimeri di  $\alpha$ -tubulina/ $\beta$ -tubulina è detta protofilamento. All'estremità superiore, un microtubulo presenta 13 subunità di tubulina disposte in modo concentrico. **C.** Complessi tetrameric di subunità di filamenti intermedi si associano lateralmente a formare un'unità di lunghezza del filamento comprendente otto tetrameri. Ulteriori unità di lunghezza del filamento si associano longitudinalmente a formare un filamento intermedio maturo spesso 10 nm.



### Proteine leganti l'actina

Un'ampia varietà di proteine leganti l'actina è in grado di modificarne la forma all'interno della cellula. Queste interazioni sono fondamentali per l'organizzazione del citoplasma e per determinare la forma cellulare. L'actina del citoscheletro è organizzata in strette file parallele di filamenti che formano fasci, o in filamenti lassamente intrecciati a formare reticoli (Fig. 1.9A). Le proteine leganti l'actina mantengono uniti i fasci o i reticoli formati dai filamenti di actina. Esse possono essere raggruppate in proteine leganti la G-actina (monomeric) e in proteine che legano la F-actina (polimerica), rivestendola, collegandola e separandola. Le proteine leganti l'actina possono avere più di una funzione.

Le proteine di rivestimento legano le estremità del filamento di actina per stabilizzarlo o per disassemblarlo (si veda Fig. 1.13A).

Le proteine di collegamento o coinvolte nella formazione dei fasci, legano insieme i filamenti di actina in file longitudinali per formare gruppi, fasci o strutture del core. I fasci possono essere fortemente impacchettati nei microvilli e nei filopodi, dove filamenti paralleli sono legati fra loro a formare fasci rigidi orientati nella stessa direzione. Le proteine di collegamento del fascio centrale di actina del microvillo comprendono la fimbrina e la villina.

Altre proteine implicate nella formazione di fasci di actina formano fasci di filamenti più allentati che decorrono in direzioni antiparallele rispetto alle loro estremità positive e negative. Esse comprendono la miosina II, che forma legami trasversali connessi all'attività motrice ATP-dipendente e consente ai filamenti adiacenti di actina di scivolare gli uni sugli altri nel sarcomero del muscolo scheletrico, nonché di cambiare la forma della cellula o (se i fasci di actina sono ancorati alla membrana a entrambe le estremità) di mantenere un certo grado di rigidità attiva. La filamina interconnette i filamenti di actina adiacenti

per formare un reticolo filamentoso lasso simile a gel composto di F-actina orientata in maniera casuale.

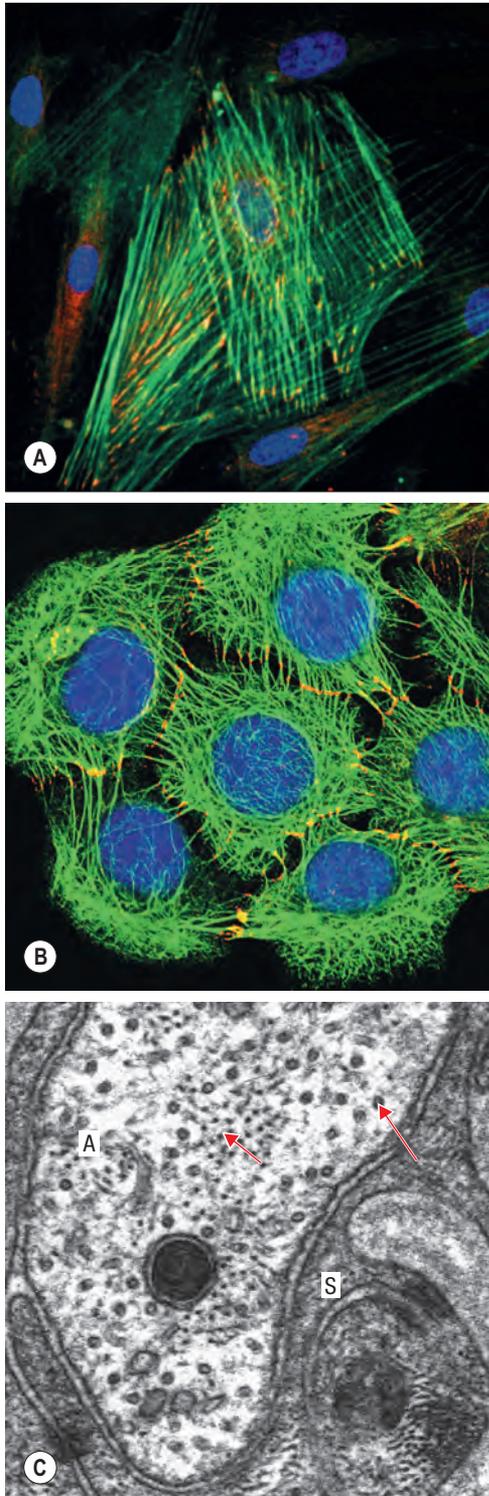
La F-actina può essere ramificata. L'assemblaggio dei reticoli di filamenti ramificati di actina coinvolge un complesso di sette proteine 2/3 correlate all'actina (Arp2/3), simile strutturalmente all'estremità uncinata dell'actina.

Per ulteriori approfondimenti, si veda Rotty et al. (2013).

L'actina ramificata generata dal complesso proteico Arp2/3 si localizza nella porzione più proiettata in avanti delle cellule migranti, nei lamellipodi e nei fagosomi (coinvolti nella captazione per endocitosi e fagocitosi, da parte delle cellule immunitarie, di particelle e patogeni estranei). La formina può allungare filamenti di actina preesistenti rimuovendo le proteine di rivestimento in corrispondenza dell'estremità uncinata.

Altre classi di proteine leganti l'actina collegano l'actina del citoscheletro alla membrana plasmatica, sia direttamente sia indirettamente, attraverso una varietà di proteine associate alla membrana. Queste ultime possono formare collegamenti anche alla matrice extracellulare per mezzo di proteine transmembrana. Tra queste, le proteine più note sono rappresentate dalla famiglia delle molecole spettro-simili, che possono legarsi all'actina o fra loro, o a varie proteine associate alla membrana per creare reti di sostegno sotto la membrana plasmatica. I tetrameri formati dalle catene  $\alpha$  e  $\beta$  della spectrina giacciono sul lato intracellulare della membrana plasmatica degli eritrociti e ne mantengono l'integrità associandosi a brevi filamenti di actina in corrispondenza di ciascuna estremità del tetramero.

Le miosine di classe V (si veda oltre) sono proteine associate al movimento non convenzionali che trasportano carichi (come vescicole e organuli) lungo i filamenti di actina. Le miosine di classe I sono implicate nella dinamica della membrana e nell'organizzazione



**Fig. 1.9** Citoscheletro. **A.** Microfotografia in immunofluorescenza di microfilamenti di  $\alpha$ -actina (verdi) in cellule muscolari lisce delle vie aeree umane in coltura. La vinculina (rossa), una proteina che lega l'actina, è localizzata alle estremità dei fasci di filamenti di actina; i nuclei sono blu. **B.** Microfotografia in immunofluorescenza di filamenti intermedi di cheratina (verdi) in cheratinociti umani in coltura. Le giunzioni desmosomiali sono evidenziate mediante anticorpi rivolti contro la desmoplachina (rossi). I nuclei sono colorati in blu (Hoechst). **C.** Microfotografia elettronica di un nervo umano che mostra i microtubuli (piccole strutture apparentemente cave in sezione trasversale, freccia lunga) nella sezione trasversale di un assonone non mielinizzato (A), avvolto da una cellula di Schwann (S). I filamenti intermedi neuronali (neurofilamenti) mostrano un profilo pieno, elettrondenso, soprattutto in sezione trasversale (freccia corta). (A. Per gentile concessione del Dr. T Nguyen, del Prof. J Ward e del Dr. S.J Hirst, King's College London. B. Per gentile concessione del Prof. Dr. Bart Wagner, Histopathology Department, Sheffield Teaching Hospitals, UK.)

dell'actina in corrispondenza della cortex cellulare, influenzando, pertanto, la migrazione cellulare, l'endocitosi, la pinocitosi e la fagocitosi. La tropomiosina, un'importante proteina regolatrice delle fibre muscolari, è presente anche in cellule non muscolari, dove la sua funzione primaria è probabilmente quella di stabilizzare i filamenti di actina contro la depolimerizzazione.

### **Miosine, le proteine motrici**

La famiglia dei microfilamenti di miosina viene spesso classificata in una categoria distinta di proteine motrici. Le proteine di miosina hanno una testa globulare formata da una catena pesante e una leggera. La catena pesante possiede una coda ad  $\alpha$ -elica di lunghezza variabile. La testa ha un'attività ATPasica e ha la capacità di legarsi ai filamenti di actina, per spostarsi lungo di essi: è questa la base del funzionamento della miosina come proteina motrice. La classe più conosciuta è la miosina II, che si trova nel muscolo e in molte cellule non muscolari. Le sue molecole possiedono due teste e due code, intrecciate a formare un lungo bastoncino. I bastoncini si possono legare fra loro per formare filamenti lunghi e spessi, come quelli che sono stati individuati nelle fibre del muscolo liscio e striato e nelle cellule mioepiteliali. Le molecole di miosina II si possono anche assemblare in gruppi più piccoli, soprattutto dimeri, che possono formare legami trasversali con i singoli filamenti di actina delle fibre di stress e con altre file di F-actina. Lo scorrimento ATP-dipendente della miosina sull'actina è la base della contrazione muscolare e dell'allungamento dei fasci di microfilamenti, come si osserva nella motilità cellulare o nella contrazione dell'anello di actina e miosina intorno al solco di scissione delle cellule in divisione. I sottotipi di miosina II conosciuti sono molti; si assemblano in modo diverso e hanno diverse proprietà dinamiche. Nel muscolo scheletrico, le molecole di miosina formano filamenti bipolari spessi 15 nm. Dal momento che questi filamenti presentano un arrangiamento simmetrico antiparallelo delle proprie subunità, la zona centrale è priva di regioni testa. Nel muscolo liscio, le molecole formano nastri più spessi e appiattiti e sono orientate in direzioni casuali sulle due facce del nastro. Queste disposizioni hanno importanti conseguenze sulle caratteristiche della forza contrattile dei diversi tipi di cellule muscolari.

Tra le molecole correlate c'è la sottofamiglia della miosina I contenente molecole a una sola testa e con code di lunghezza variabile. Le funzioni della miosina I includono il movimento delle membrane nell'endocitosi, la formazione di filopodi nei coni di crescita neuritica, lo scivolamento actina-actina e l'adesione dell'actina alle membrane, come si osserva nei microvilli. Come detto in precedenza, le molecole motrici della famiglia della miosina V sono implicate nella movimentazione dei carichi sui filamenti di actina. Così, per esempio, la miosina V trasporta vescicole lungo le guide di F-actina in modo analogo al trasporto di chinesina e carichi citoplasmatici dineina-correlati lungo i microtubuli. Ciascuna classe di proteine motrici ha proprietà diverse ma, durante gli spostamenti dei carichi, tali proteine spesso operano contemporaneamente in modo coordinato. (Per ulteriori approfondimenti sulle miosine di classe V, si veda Hammer e Sellers 2012).

### **Altri filamenti sottili**

In alcune cellule è presente un gruppo eterogeneo di strutture filamentose con diametri di 2-4 nm. Le due forme maggiormente studiate, la titina e la nebulina, costituiscono circa il 13% delle proteine totali del muscolo scheletrico (Cap. 5). Esse si annoverano fra le più grandi molecole conosciute e il peso delle loro subunità è di circa 10<sup>6</sup>; le molecole native sono lunghe circa 1  $\mu$ m. La loro struttura simile a grani ripetuti conferisce loro proprietà elastiche che sono importanti per il funzionamento effettivo del muscolo e, probabilmente, anche per il funzionamento di altre cellule.

### **Microtubuli**

I microtubuli sono polimeri di tubulina aventi forma di cilindri cavi, relativamente rigidi, con diametro di circa 25 nm e lunghezza variabile (fino a 70  $\mu$ m nei flagelli degli spermatozoi). Sono presenti nella maggior parte dei tipi cellulari e sono particolarmente abbondanti nei neuroni, nei leucociti e nelle piastrine. Sono i costituenti principali del fuso mitotico nelle cellule in divisione e formano anche parte dell'assonema della ciglia, dei flagelli e dei centrioli.

I microtubuli sono formati da dimeri di tubulina e da proteine associate ai microtubuli. Esistono due classi principali di tubulina: l' $\alpha$ - e la  $\beta$ -tubulina. Prima dell'assemblaggio dei microtubuli, le tubuline

sono associate in dimeri con una massa molecolare complessiva di 100 kDa (50 kDa ciascuna). Ogni subunità proteica è larga circa 5 nm ed è disposta secondo l'asse maggiore in file dritte di tubuline  $\alpha$  e  $\beta$  alternate a formare dei protofilamenti (Fig. 1.8B). Tipicamente, 13 protofilamenti (il numero può variare da 11 a 16) si dispongono ad anello per formare la parete di un microtubulo cilindrico cavo (Fig. 1.9C). Ogni fila longitudinale è leggermente disallineata rispetto a quella vicina, cosicché, quando un microtubulo viene osservato lateralmente, appare formato da subunità alternate di tubulina  $\alpha$  e  $\beta$  disposte a spirale. Esiste un equilibrio dinamico tra i dimeri e i microtubuli assemblati: l'asimmetria dei dimeri determina la polarità (le  $\alpha$ -tubuline sono tutte orientate verso l'estremità negativa, le  $\beta$ -tubuline verso l'estremità positiva). La tubulina viene aggiunta preferibilmente all'estremità positiva; l'estremità negativa è a crescita relativamente lenta. I microtubuli aumentano e diminuiscono rapidamente e continuamente, un comportamento conosciuto come instabilità dinamica in cui i tubuli in crescita possono andare incontro a una "catastrofe" passando rapidamente da una netta crescita a una rapida riduzione. Il principale fattore che determina se i microtubuli aumentano o diminuiscono è la velocità dell'idrolisi del GTP. Le tubuline sono proteine leganti il GTP e la loro crescita è accompagnata dall'idrolisi del GTP che regola la dinamica dei tubuli. La crescita dei microtubuli inizia in siti specifici, i centri di organizzazione microtubulare, tra i quali i più conosciuti sono i centrosomi (da cui polimerizza la maggior parte dei microtubuli cellulari) e i corpi basali centrioli-derivati (da cui crescono le ciglia). I centri di organizzazione dei microtubuli comprendono un'isoforma specializzata di tubulina, nota come  $\gamma$ -tubulina, essenziale per la nucleazione (interazione tra tubulina  $\gamma$  e  $\beta$ ) e la polimerizzazione dei microtubuli.

Diversi farmaci (per esempio la colcemide, la vinblastina, la griseofulvina e il nocodazolo) provocano depolimerizzazione dei microtubuli legando i dimeri solubili di tubulina e quindi spostando l'equilibrio verso lo stato depolimerizzato. La scomposizione dei microtubuli provoca un'ampia varietà di effetti, compresa l'inibizione della divisione cellulare mediante distruzione del fuso mitotico. Al contrario, il farmaco paclitaxel (taxolo) è un inibitore della depolimerizzazione dei microtubuli in quanto li stabilizza e ne promuove un assemblaggio anormale. Sebbene questo possa causare una neuropatia periferica, il paclitaxel è ampiamente utilizzato come agente chemioterapico nel trattamento del cancro della mammella e dell'ovaio.

### Proteine associate ai microtubuli

Alcune proteine che si possono legare alle tubuline assemblate possono essere associate a proprietà strutturali o alla motilità. Una classe importante di proteine associate ai microtubuli (MAP) è costituita da proteine che, legandosi all'estremità positiva dei microtubuli, ne regolano l'instabilità dinamica e le interazioni con altre strutture subcellulari. Le MAP formano ponti trasversali tra microtubuli adiacenti o tra microtubuli e altre strutture come i filamenti intermedi, i mitocondri e la membrana plasmatica. Le proteine associate ai microtubuli che si trovano nei neuroni comprendono: le MAP 1A e 1B, che sono presenti nei dendriti e negli assoni; le MAP 2A e 2B, che si localizzano principalmente nei dendriti; e la proteina tau, che si trova solo negli assoni. La MAP 4 è la principale proteina associata ai microtubuli in molti altri tipi cellulari. Le proteine associate ai microtubuli sono implicate nella formazione dei microtubuli, nel loro mantenimento e nella loro depolimerizzazione e hanno quindi un'importanza considerevole nella morfogenesi cellulare, nella divisione mitotica, nonché nel mantenimento e nella modulazione della forma cellulare.

Le proteine associate ai microtubuli sono coinvolte nei processi di trasporto in cui il movimento avviene sulla superficie microtubulare, per esempio il trasporto di materiali, la curvatura di ciglia e flagelli, e alcuni movimenti dei fusi mitotici. Esse includono una grande famiglia di proteine motrici, tra cui le meglio conosciute sono le dineine e le chinesine. Un'altra proteina, la dinamina, è coinvolta nell'endocitosi. Le proteine del cinetocoro si assemblano al centromero cromosomico durante la mitosi e la meiosi e si legano (legando così i cromosomi) ai microtubuli del fuso. Alcune delle proteine del cinetocoro sono responsabili dei movimenti cromosomici nell'anafase della mitosi e della meiosi.

Tutte queste proteine associate ai microtubuli si legano ai microtubuli e scorrono attivamente lungo le loro superfici oppure promuovono la polimerizzazione o la depolimerizzazione dei microtubuli. Le chinesine e le dineine si possono legare alle membrane come quelle delle vescicole di trasporto e contemporaneamente promuoverne il

trasporto lungo i microtubuli per distanze considerevoli, consentendo così la distribuzione selettiva dei materiali nella cellula. Tali movimenti avvengono in entrambe le direzioni lungo i microtubuli. La motilità chinesina-dipendente avviene di solito verso l'estremità positiva dei microtubuli, per esempio dal corpo cellulare verso i terminali assonici nei neuroni, e lontano dal centrosoma nelle altre cellule. I movimenti correlati alla dineina avvengono invece nella direzione opposta, quindi verso l'estremità negativa dei microtubuli. Il trasporto di materiali lungo i microtubuli è il meccanismo attraverso cui i neurotrasmettitori vengono veicolati lungo gli assoni all'interno dei precursori delle vescicole sinaptiche verso le sinapsi neuronali (trasporto assonale anterograde, mediato da chinesine) e le vescicole legate a membrane vengono riportate al soma neuronale per essere riciclate (trasporto assonale retrogrado, mediato dalle dineine).

Le dineine formano anche le braccia dei microtubuli periferici nelle ciglia e nei flagelli, dove formano ponti trasversali di raccordo dinamici con le coppie di microtubuli adiacenti. Quando queste dineine legate provano a muoversi, le forze di torsione risultanti fanno sì che i microtubuli dell'assonema si pieghino, generando i movimenti ritmici delle ciglia e dei flagelli. Le chinesine costituiscono una grande e diversificata famiglia di ATPasi correlate alla stimolazione dei microtubuli. Alcune chinesine movimentano materiali, altre favoriscono la depolimerizzazione dei microtubuli, mentre altre ancora si connettono ai microtubuli del fuso mitotico per allontanare i due centrioli durante la profase mitotica. Per ulteriori approfondimenti, si veda Bay (2001).

### Centrioli, centrosomi e corpi basali

I centrioli sono formazioni cilindriche di 0,2  $\mu$ m di diametro e 0,4  $\mu$ m di lunghezza (Fig. 1.10). Sono costituiti da nove triplette di microtubuli, disposte circolarmente, collegate da un certo numero di altre proteine. In tutte le cellule animali vi sono almeno due centrioli, che permettono la divisione mitotica (gli ovociti, che vanno incontro a meiosi, anziché a mitosi, sono privi di centrioli). Per ulteriori approfondimenti su struttura e assemblaggio dei centrioli, si veda Gönczy (2012). I centrioli si trovano generalmente vicini, disposti ad angolo retto o, più tipicamente, secondo un'angolatura obliqua (una disposizione spesso definita diplosoma), a livello del centrosoma, una regione densamente filamentosa del citoplasma situata al centro della cellula.



**Fig. 1.10** Coppia di centrioli duplicata in un campione di carcinoma umano. Ogni coppia di centrioli consiste in una struttura madre e una struttura figlia, orientate approssimativamente ad angolo retto in modo tale che una sia sezionata trasversalmente (T) e l'altra longitudinalmente (L). I centrioli sezionati trasversalmente si vedono come anelli di triplette di microtubuli (freccia). (Per gentile concessione del Dr. Bart Wagner, Histopathology Department, Sheffield Teaching Hospitals, UK.)

Il centrosoma è il principale centro di organizzazione microtubulare della maggior parte delle cellule: è la sede in cui vengono formati i nuovi microtubuli e in cui è generato il fuso mitotico durante la divisione cellulare.

La biogenesi del centriolo è un processo complesso (Fig. 1.11). All'inizio della fase S (fase di replicazione del DNA) del ciclo cellulare (si veda oltre), si forma un nuovo centriolo figlio ad angolo retto rispetto a ciascun centriolo parentale. Ogni coppia formata dal centriolo preesistente e dal centriolo neoformato costituisce un polo del futuro fuso mitotico e il centriolo figlio diventa completamente maturo solo quando le cellule figlie si apprestano a entrare nella mitosi successiva. I centrosomi, essendo centri di organizzazione microtubulare, giacciono al centro di una rete di microtubuli, ognuno dei quali ha la propria estremità negativa prossima al centrosoma.

Il centro di organizzazione microtubulare contiene complessi di  $\gamma$ -tubulina che, durante il processo di nucleazione, promuovono la polimerizzazione dei microtubuli all'estremità negativa dei microtubuli stessi. I corpi basali sono centri di organizzazione microtubulare strettamente correlati ai centrioli, tanto che si pensa che derivino da essi. Sono localizzati alla base delle ciglia e dei flagelli, che essi ancorano alla superficie cellulare. Le coppie di microtubuli esterni dell'assonema di ciglia e flagelli originano da due microtubuli di ciascuna tripletta del corpo basale.

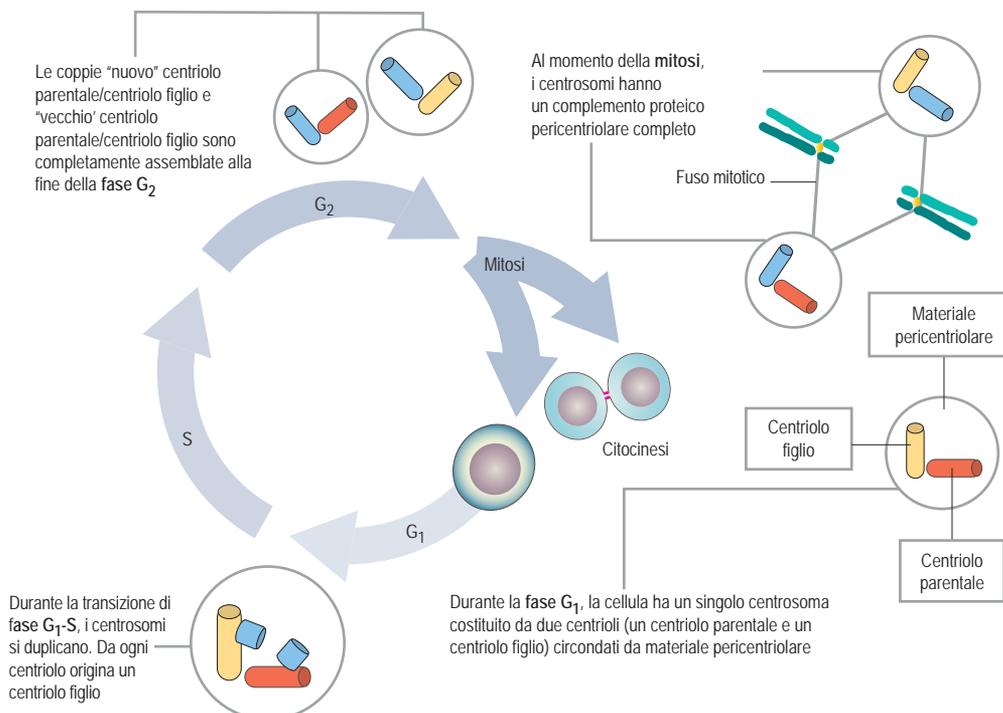
### Filamenti intermedi

I filamenti intermedi sono spessi circa 10 nm e sono formati da gruppi eterogenei di proteine filamentose. Contrariamente ai filamenti di actina e ai microtubuli che sono formati da proteine globulari assemblate, capaci di legare dei nucleotidi e di attivare l'idrolisi, i filamenti intermedi sono formati da monomeri filamentosi privi di attività enzimatica. Le proteine dei filamenti intermedi si aggregano a formare filamenti lineari in un processo in tre fasi. In primo luogo, un paio di subunità proteiche del filamento intermedio, ciascuna costituita da un dominio centrale bastoncellare ad  $\alpha$ -elica di circa 310 aminoacidi affiancato da domini testa-coda non ad  $\alpha$ -elica di dimensioni variabili, forma un dimero in cui i domini bastoncellari centrali ad  $\alpha$ -elica sono paralleli e avvolti l'uno all'altro. La variabilità delle subunità proteiche dei filamenti intermedi risiede nella lunghezza e nella sequenza aminoacidica dei domini testa-coda, che si ritiene siano implicati nella regolazione delle interazioni dei filamenti intermedi con altre proteine. In secondo luogo, si forma un'unità tetramerica a partire da due dimeri antiparalleli avvolti e semi-falsati. Infine, otto tetrameri si associano lateralmente a formare un'unità di lunghezza del filamento (ULF, Unit Length Filament), spesso 16

nm. Le singole ULF si uniscono con le estremità terminali a formare brevi filamenti che continuano a crescere longitudinalmente congiungendosi ad altre ULF e ad altri filamenti già esistenti (Figg. 1.8C e 1.9B). L'allungamento del filamento è seguito da una compattazione all'interno che porta a un filamento intermedio di 30 nm di spessore. La stretta associazione di dimeri, tetrameri e ULF conferisce ai filamenti intermedi notevole forza di tensione e notevole resistenza a forze di stiramento, compressione, torsione e piegamento. Contrariamente ai filamenti di actina e ai microtubuli, i filamenti intermedi non hanno polarità (a causa dell'allineamento antiparallelo dei tetrameri costitutivi) e non si legano ai nucleotidi (come la G-actina e i dimeri di tubulina). Inoltre, le ULF si connettono alle estremità terminali (in contrasto con la F-actina polarizzata e con i microtubuli, che hanno un'estremità, quella positiva, che si accresce più rapidamente dell'altra, negativa). Per ulteriori approfondimenti, si veda Herrmann et al. (2007).

I filamenti intermedi si osservano in diversi tipi cellulari e sono spesso presenti in gran numero, per fornire stabilità strutturale ove necessario (si vedano le Figg. 1.9B e 1.9C) o per fare da impalcatura per l'attacco di altre strutture. Essi formano un'ampia rete nel citoplasma che si estende dall'area perinucleare con una disposizione "a gabbia" alla superficie cellulare. Filamenti intermedi di classi molecolari diverse sono caratteristici di particolari tessuti o stadi maturativi e sono, pertanto, importanti indici delle origini delle cellule e del loro grado di differenziazione, oltre ad avere molta rilevanza in istopatologia.

Le proteine dei filamenti intermedi sono state classificate in cinque tipi diversi, in base alla loro struttura primaria e all'espressione tessuto-specifica. Delle diverse classi di filamenti intermedi, le cheratine (citocheratina) si trovano negli epitelii, in cui i filamenti di cheratina sono sempre composti in uguale rapporto da cheratine di tipo I (acide) e di tipo II (basiche o neutre), a formare eteropolimeri. Si conoscono circa 20 tipi sia per le proteine di cheratina acida sia basica/neutra. Per ulteriori approfondimenti sulle cheratine negli epitelii normali e patologici, si veda Pan et al. (2012). A livello dell'epidermide, l'espressione degli eteropolimeri di cheratina varia a mano a mano che i cheratinociti maturano durante la loro transizione dagli strati basali a quelli superficiali. È noto che anomalie genetiche delle cheratine interferiscono con la stabilità meccanica degli epitelii. Per esempio, la malattia epidermolisi bollosa semplice è causata dalla lisi delle cellule epidermiche basali e dalla formazione di bolle cutanee in seguito a traumi meccanici. Difetti dei geni che codificano per le cheratine 5 e 14 determinano instabilità del citoscheletro che porta a fragilità delle cellule basali epidermiche. Quando sono interessate le cheratine 1 e 10, le cellule dello strato spinoso dell'epidermide si lisano e ciò determina la caratteristica



**Fig. 1.11** Una coppia centriolare è costituita da un centriolo parentale e un centriolo figlio che si duplicano una sola volta a ogni ciclo cellulare in preparazione alla divisione della cellula. Ogni centriolo genera un centriolo figlio e, di conseguenza, sono presenti due nuovi centrioli figli. Il centriolo figlio precedente diventa il "nuovo" centriolo parentale, mentre il centriolo parentale precedente rimane come "vecchio" centriolo parentale. Pertanto, il "vecchio" centriolo parentale rimane connesso a uno dei nuovi centrioli figli, mentre il "nuovo" centriolo parentale rimane legato all'altro nuovo centriolo figlio. (Per gentile concessione di Kierszenbaum AL, Tres LL Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology, 5th ed. Elsevier. Copyright 2019.)

formazione di bolle intraepidermiche nell'ipercheratosi epidermolitica. Per ulteriori approfondimenti, si veda Porter e Lane (2003).

Le proteine dei filamenti intermedi di tipo III, che comprendono vimentina, desmina, proteina gliale fibrillare acida e periferina, formano omopolimeri di filamenti intermedi. La vimentina è espressa in cellule del tessuto connettivo derivate dal mesenchima e in alcune cellule ectodermiche durante le fasi iniziali dello sviluppo; le desmine sono espresse nelle cellule muscolari; le proteine gliali fibrillari acide nelle cellule gliali; e la periferina negli assoni periferici. I filamenti intermedi tipo IV comprendono neurofilamenti, nestina, sincoilina e  $\alpha$ -internesina. I neurofilamenti (NF) formano la componente più importante del citoscheletro dei neuroni, specie negli assoni (si veda Fig. 1.9C), in cui rappresentano la proteina più espressa. Essi sono eteropolimeri di basso (NF-L), medio (NF-M) e alto (NF-H) peso molecolare (la forma NF-L è spesso presente in associazione con la forma NF-M o con la forma NF-H). L'accumulo anomalo di neurofilamenti (grovigli di neurofibrille) è un aspetto caratteristico di varie patologie neurologiche. La nestina rappresenta una proteina dei neurofilamenti che si trova nei filamenti intermedi specificamente delle cellule staminali neuroectodermiche. Il gruppo dei filamenti intermedi di tipo V comprende le lamine nucleari A, B1 e B2 che rivestono la superficie interna della membrana nucleare di tutte le cellule nucleate. La lamina C è una variante dovuta a *splicing* della lamina A. Le lamine formano un'impalcatura meccanica per il nucleo e fungono da siti di legame per varie proteine che organizzano la cromatina alla periferia del nucleo. Sono proteine inusuali in quanto formano una rete irregolare di filamenti che si collegano tra loro, piuttosto che fasci lineari. Per ulteriori approfondimenti, si veda Burke e Stewart (2013).

## Nucleo

Il nucleo (si vedano Figg. 1.1 e 1.2) è, in generale, la più grande struttura intracellulare e, di solito, ha una forma sferica o ellissoidale, con un diametro di 3-10  $\mu\text{m}$ . Le colorazioni istologiche convenzionali, come ematossilina o blu di toluidina, evidenziano le componenti acide (gruppi fosfato) dell'acido desossiribonucleico (DNA) e dell'acido ribonucleico (RNA) nelle cellule e nelle sezioni di tessuto. Le molecole di DNA ed RNA sono dette basofile per l'affinità di legame dei loro gruppi fosfato carichi negativamente per i coloranti basici come l'ematossilina. Una colorazione specifica per il DNA è la reazione di Feulgen.

### Involucro nucleare

Il nucleo è circondato dall'involucro nucleare che consiste in una membrana nucleare interna (INM, Inner Nuclear Membrane) e una membrana nucleare esterna (ONM, Outer Nuclear Membrane), separate da uno spazio perinucleare di 40-50 nm che è attraversato dai complessi proteici dei pori nucleari (NPC, Nuclear Pore Complex). Lo spazio perinucleare si continua con il lume del reticolo endoplasmatico. L'ONM ha molteplici connessioni con il reticolo endoplasmatico, con il quale condivide le proprie componenti proteiche di membrana. L'INM contiene specifiche proteine integrali di membrana (recettore della lamina B ed emerina, che forniscono entrambi siti di legame per le proteine leganti la cromatina). Una mutazione del gene che codifica per l'emierina, causa la distrofia muscolare legata al cromosoma X di Emery-Dreifuss (EDMD, Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy), caratterizzata da distrofia muscolare e cardiomiopatia.

La lamina nucleare, una densa rete proteica dello spessore di 15-20 nm, si associa alla superficie interna dell'INM. Le componenti principali della lamina nucleare sono le lamine, le proteine dei filamenti intermedi di tipo V distinte nelle classi di tipo A e di tipo B.

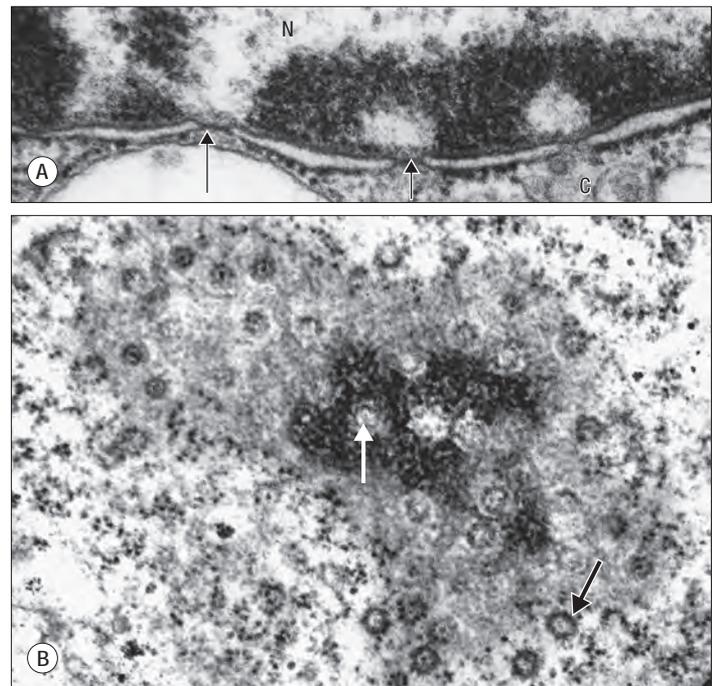
La lamina nucleare rinforza l'involucro nucleare da un punto di vista meccanico, condiziona la forma del nucleo e offre un sito di legame per varie proteine che ancorano la cromatina al citoscheletro. La lamina nucleare A, con più di 350 mutazioni, è la proteina con il più alto numero di mutazioni correlata a patologie nell'uomo. Queste sono dette laminopatie e sono caratterizzate da anomalie strutturali del nucleo che ne determinano l'indebolimento strutturale portando a danni di tipo meccanico. Le mutazioni della lamina A determinano un range sorprendentemente ampio di malattie, dalla progeria a varie distrofie tra cui la forma autosomica dominante dell'EDMD. La forma farnesilata tronca della lamina A, nota come progerina, determina difetti della proliferazione cellulare e danni al DNA delle cellule staminali mesenchimali e delle cellule muscolari lisce dei vasi. I pazienti

affetti presentano malattie cardiovascolari e muoiono in giovane età. I topi privi della lamina B1 e della lamina B2 sopravvivono fino alla nascita; comunque lo sviluppo neuronale è compromesso in assenza della lamina B1 o della lamina B2. La sovraespressione della lamina B1 si associa a una leucodistrofia autosomica dominante, caratterizzata da demielinizzazione graduale del sistema nervoso centrale. Per ulteriori approfondimenti sulle lamine e sulle laminopatie, si vedano Worman (2012) e Burke e Stewart (2013).

La cromatina condensata (eterocromatina) tende ad aggregarsi alla membrana nucleare durante l'interfase. Alla fine della profase mitotica o meiotica (si veda oltre), i filamenti di lamina si disaggregano per fosforilazione, provocando la dissoluzione in vescicole delle membrane nucleari e la loro dispersione nel reticolo endoplasmatico. Durante le fasi finali della mitosi (la telofase), le proteine della periferia nucleare, tra cui anche le lamine, si associano alla superficie dei cromosomi, costituendo siti di ancoraggio per le vescicole di membrana. La fusione di queste vescicole ricostituisce il compartimento nucleare, compresa la lamina nucleare, in seguito alla sua defosforilazione. Per ulteriori approfondimenti circa il nucleoscheletro, si veda Simon e Wilson (2011).

Il trasporto di molecole tra il nucleo e il citoplasma avviene per mezzo di pori nucleari specializzati che perforano la membrana nucleare (Fig. 1.12A). Questi funzionano come filtri molecolari direzionali altamente selettivi che permettono a proteine come gli istoni e le proteine regolatrici dei geni (che sono sintetizzate nel citoplasma ma svolgono la propria azione nel nucleo) di entrare nel nucleo, e permettono alle molecole che sono sintetizzate nel nucleo ma destinate al citoplasma (per esempio le subunità ribosomiali, gli RNA transfer e gli RNA messaggeri) di lasciare il nucleo.

Dal punto di vista ultrastrutturale, i pori nucleari appaiono come strutture discoidali con un diametro esterno di 130 nm e un poro interno con un diametro effettivo per la diffusione di 9 nm (Fig. 1.12B).



**Fig. 1.12 A.** Involucro nucleare con i pori nucleari (frecce) in sezione trasversale, che mostra la continuità tra gli strati fosfolipidici interno ed esterno dell'involucro su entrambi i lati del poro. La sottile "membrana" che sembra attraversare il poro è formata da proteine del complesso del poro. Si noti che la cromatina è meno condensata nella regione dei pori nucleari. Abbreviazioni: N, nucleo; C, citoplasma. **B.** Pori nucleari visti "di fronte" come strutture sferiche (frecce) in una sezione tangenziale attraverso l'involucro nucleare. L'aspetto della membrana nucleare presenta una diversa densità elettronica quando il piano di sezione passa attraverso regioni diverse della doppia membrana curva, che è interrotta a intervalli dai pori che attraversano l'involucro (si veda anche Fig. 1.1). Il citoplasma circostante contenente i ribosomi è meno elettrondenso. Tessuti umani. (Per gentile concessione del Dr. Bart Wagner, Histopathology Department, Sheffield Teaching Hospitals, UK.)

La membrana nucleare di una cellula attiva presenta fino a 4.000 pori. Il complesso del poro nucleare ha una simmetria ottagonale ed è formato dall'assemblaggio di più di 50 proteine, le nucleoporine. Le membrane nucleari interna ed esterna si fondono intorno al complesso del poro (si veda Fig. 1.12A). I pori nucleari sono liberamente permeabili a piccole molecole, ioni e proteine fino a 17 kDa. Per ulteriori approfondimenti circa la composizione dei complessi dei pori nucleari, si veda Raices e D'Angelo (2012). La maggior parte delle proteine che entrano nel nucleo forma complessi con specifiche proteine recettoriali di trasporto conosciute come importine. Le importine vanno avanti e indietro tra il nucleo e il citoplasma. Per consentire il legame dei materiali da trasportare, le importine necessitano di una corta sequenza di aminoacidi conosciuta come sequenza di localizzazione nucleare (NLS, Nuclear Localization Sequence) e tale legame può essere diretto o mediato da una proteina adattatrice. Le interazioni dell'importina con le componenti del poro nucleare determinano il suo movimento insieme con il suo carico, attraverso il poro, mediante un processo energia-indipendente. Un ciclo complementare agisce per esportare proteine e molecole di RNA dal nucleo al citoplasma utilizzando recettori di trasporto conosciuti come esportine.

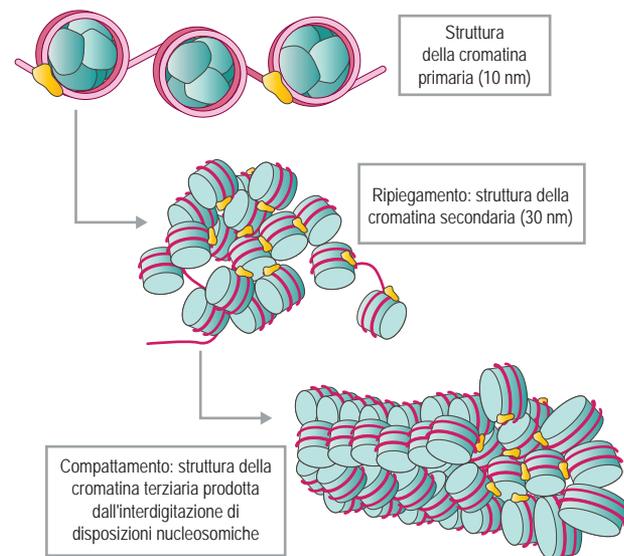
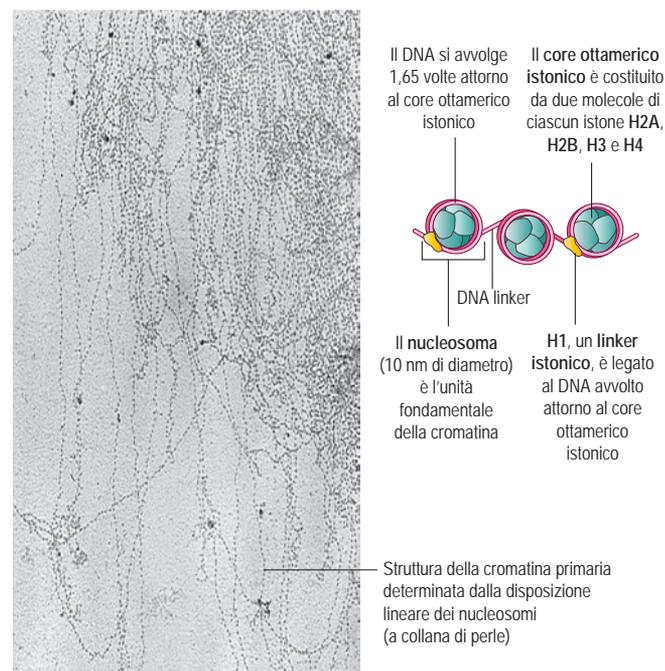
Una piccola GTPasi, detta proteina nucleare Ras-correlata (Ran), regola l'importazione e l'esportazione di proteine attraverso l'involucro nucleare.

Per ulteriori approfondimenti circa la via della Ran e delle esportine/importine, si vedano Clarke e Zhang (2008) e Raices e D'Angelo (2012).

### Cromatina

All'interno del nucleo, il DNA è organizzato in un complesso DNA-proteine conosciuto come cromatina. Le proteine che costituiscono la cromatina sono gli istoni e le proteine non-istoniche. Le proteine non-istoniche sono un gruppo estremamente eterogeneo che include proteine strutturali, DNA e RNA polimerasi e proteine regolatrici dei geni. Gli istoni sono il gruppo più abbondante di proteine della cromatina e sono i principali responsabili dell'avvolgimento del DNA cromosomico nel suo livello primario di organizzazione, il nucleosoma. Esistono quattro proteine istoniche del core: H2A, H2B, H3 e H4 che variano in termini di sequenza aminoacidica e di modificazioni post-traduzionali (tra cui acetilazione, metilazione e fosforilazione). Tali proteine si combinano in rapporti uguali a formare un compatto core (o nucleo centrale) nucleosomico ottamerico. Un quinto istone, H1, è coinvolto nell'ulteriore compattazione della cromatina (Fig. 1.13). La molecola di DNA (una per cromosoma) si avvolge due volte intorno a ogni core del nucleosoma, impiegando fino a 145-147 coppie di basi. Questo tipo di avvolgimento fa sì che il DNA venga organizzato a formare una fibra di cromatina di 10 nm di diametro, la quale assume l'aspetto di un filo di perle (come si può vedere al microscopio elettronico), in cui ogni perla è separata dalle altre da una lunghezza variabile di DNA, in genere estesa per circa 35 coppie di nucleotidi. La regione core del nucleosoma, insieme a una delle regioni linker, costituisce il nucleosoma propriamente detto, che tipicamente è lungo 200 coppie di nucleotidi. La cromatina, tuttavia, raramente esiste in questa forma semplice ed è in genere avvolta in una fibra spessa 30 nm, comprendente un solo istone H1 per nucleosoma, che interagisce sia con il DNA sia con le proteine per compattare maggiormente il nucleosoma. Di solito, le fibre spesse 30 nm sono ulteriormente arrotolate o ripiegate in domini più grandi. Si pensa che i singoli domini vadano incontro a despiralizzazione (decondensazione) ed estensione durante la trascrizione attiva. In una tipica interfase del nucleo, l'eucromatina (una regione nucleare che appare pallida in sezioni tissutali colorate in modo appropriato o relativamente elettronegativa nelle microfotografie al microscopio elettronico; si veda Fig. 1.2) è probabilmente formata soprattutto da fibre di 30 nm e anse e contiene geni trascrizionalmente attivi. Le cellule trascrizionalmente attive, come la maggior parte dei neuroni, possiedono nuclei che sono prevalentemente eucromatinici. Per ulteriori approfondimenti sul nucleosoma e sulla struttura della cromatina, si veda Luger et al. (2012).

L'eterocromatina (regioni nucleari che appaiono scure in sezioni tissutali colorate in modo appropriato o elettronegative nelle microfotografie al microscopio elettronico) si localizza caratteristicamente soprattutto in corrispondenza della periferia del nucleo, tranne che sopra i pori nucleari (si veda Fig. 1.12A) e vicino al nucleolo (si veda Fig. 1.2). Si tratta di una forma di cromatina relativamente compatta, in cui le proteine istoniche presentano una serie specifica di



**Fig. 1.13** Il nucleosoma è l'unità fondamentale della cromatina ed è formato da DNA avvolto attorno a un core istonico. Ogni nucleosoma contiene due molecole di ogni istone H2A, H2B, H3 e H4. La variabilità degli istoni ha un effetto sulla condensazione della fibra di cromatina e sull'interazione dei nucleosomi con proteine non istoniche. I nucleosomi connessi in modo lineare da un breve segmento di DNA (DNA linker) formano la struttura primaria della cromatina. L'interazione lato a lato della struttura della cromatina primaria (micrografia elettronica, a sinistra) determina un secondo ordine di ripiegamento. L'interazione tra fibre di cromatina secondaria con formazione di strutture terziarie è responsabile dello stato compatto della cromatina che si osserva nel cromosoma condensato metafaseico e nell'eterocromatina. (Da Kierszenbaum AL, Tres LL Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology, 5th ed. Elsevier. Copyright 2019.)

modificazioni post-traduzionali, tra cui la metilazione di particolari residui, risultando in una facilitazione del legame di specifiche proteine associate all'eterocromatina. L'eterocromatina include regioni di DNA non codificanti, come le regioni del centromero, che sono conosciute come eterocromatina costitutiva. Il DNA diviene trascrizionalmente inattivo in alcune cellule, a mano a mano che queste si differenziano durante lo sviluppo o la maturazione cellulare, ed entra a far parte dell'eterocromatina; esso è conosciuto come eterocromatina facoltativa. Il cromosoma X inattivo nelle donne è un esempio di eterocromatina

facoltativa e può essere identificato al microscopio ottico come il corpuscolo di Barr intensamente colorato, spesso localizzato alla periferia nucleare o in corrispondenza di un'estensione a bacchetta di tamburo di un lobo nucleare di un leucocita neutrofilo maturo plurilobato.

Nelle cellule trascrizionalmente inattive, la cromatina si trova soprattutto (fino al 90% del totale) nella forma condensata, eterocromatinica. Esempi di cellule di questo tipo sono i leucociti neutrofilici maturi (in cui la cromatina condensata è presente in un nucleo plurilobulare, intensamente colorato) e i nuclei altamente condensati degli eritroblasti ortocromatici (stadio maturativo avanzato dei precursori degli eritrociti). Nella maggior parte delle cellule mature si trovano entrambe le forme, il che indica che solo una parte del DNA è in corso di trascrizione. Ne sono un esempio particolare le plasmacellule derivate dai linfociti B, in cui la maggior parte della cromatina è in stato condensato ed è disposta in masse regolari intorno al perimetro del nucleo, determinando il cosiddetto nucleo "a quadrante di orologio" (si vedano Figg. 4.6 e 4.12). Sebbene in queste cellule vi sia un'intensa attività di trascrizione, gran parte della sintesi proteica riguarda un solo tipo di immunoglobulina e quindi un'elevata percentuale del genoma è in forma inattiva.

Durante la mitosi, la cromatina è ulteriormente riorganizzata e condensata per formare i cromosomi estremamente rimpiccioliti caratteristici della metafase. Questo accorciamento è raggiunto mediante un ulteriore impacchettamento della cromatina. I cromosomi condensati sono stabilizzati da complessi proteici conosciuti come condensine. Il ripiegamento progressivo del DNA cromosomico per interazione con proteine specifiche può ridurre il DNA cromosomico, lungo 5 cm, di 10.000 volte, fino alla lunghezza di 5  $\mu$ m nel cromosoma in mitosi.

### Cromosomi e telomeri

Il DNA nucleare delle cellule eucariote è organizzato in unità lineari chiamate cromosomi. Il DNA di una cellula umana diploide normale contiene  $6 \times 10^9$  coppie di nucleotidi organizzate a formare 46 cromosomi (44 cromosomi autosomici e 2 cromosomi sessuali). Il più grande cromosoma umano (il numero 1) contiene  $2,5 \times 10^8$  coppie di nucleotidi, mentre il più piccolo (il cromosoma Y) ne contiene  $5 \times 10^7$  coppie.

Ogni molecola di DNA cromosomico contiene un certo numero di sequenze nucleotidiche specializzate che sono responsabili della sua conservazione. Una è la regione centromerica del DNA. Durante la mitosi, una struttura discoide composta da una serie complessa di proteine, il cinetocoro, forma una substruttura della regione centromerica del DNA cui si attaccano i microtubuli del fuso. Un'altra regione, il telomero, delimita l'estremità terminale di ciascuna molecola di DNA cromosomico. I telomeri consistono di centinaia di ripetizioni della

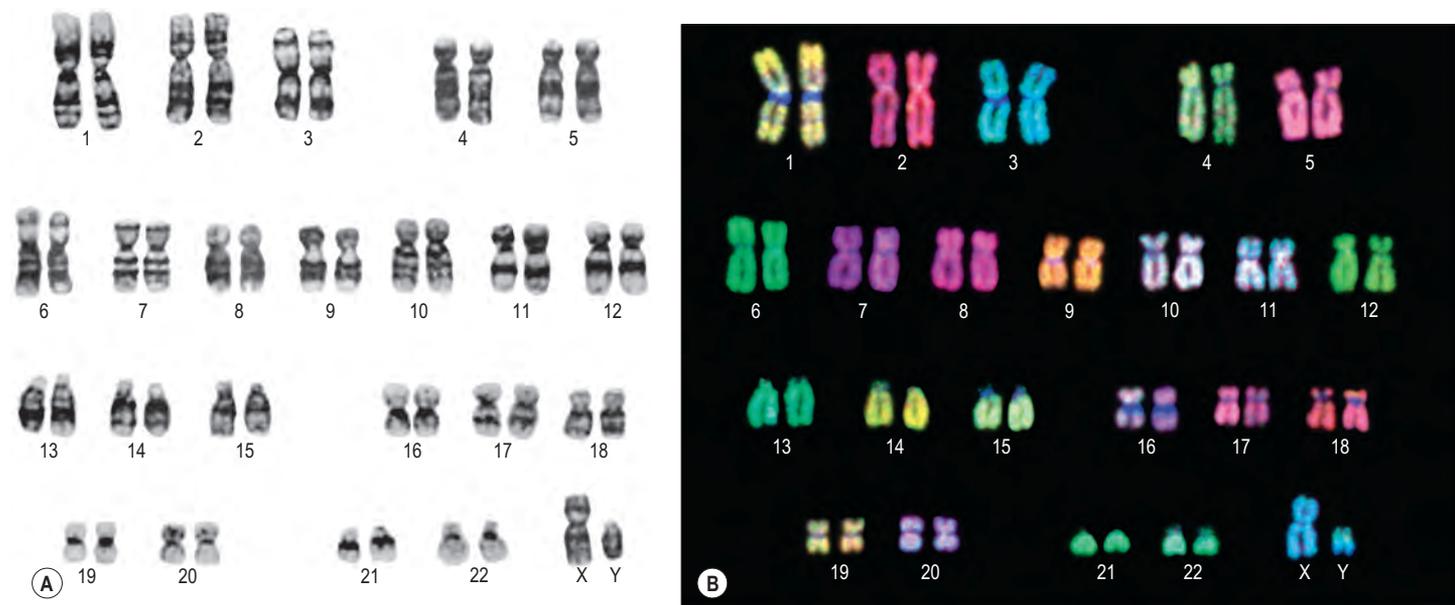
sequenza nucleotidica (TTAGGG)<sub>n</sub>. Le estremità dei cromosomi non possono essere replicate dalla stessa DNA polimerasi che replica il resto del cromosoma e sono conservate da uno specifico enzima chiamato telomerasi che contiene una subunità di RNA che funziona come stampo per allungare le unità ripetute di TTAGGG. Per ulteriori approfondimenti sul reclutamento della telomerasi per i telomeri, si veda Nandakumar e Cech (2013). Pertanto, la telomerasi è un tipo specializzato di polimerasi detta trascrittasi inversa che retrotrascrive sequenze di RNA in DNA. Il numero di ripetizioni in tandem nella sequenza di DNA telomerico è variabile. Sembra che il telomero si accorci a mano a mano che la cellula si divide, in quanto l'attività telomerasica è ridotta o assente nelle cellule differenziate con una durata di vita limitata. Nei mammiferi, la telomerasi è attiva nella linea cellulare germinale e nelle cellule staminali, ma la sua espressione nelle cellule somatiche può determinare o favorire il cancro. La mancata preservazione dei telomeri nelle cellule in attiva proliferazione, ne determina la riduzione finché le cellule smettono di dividersi, una condizione nota come senescenza replicativa. Per ulteriori approfondimenti sui telomeri e sul danno progressivo al DNA, si veda Sahin e DePinho (2012).

Il ruolo dei telomeri nell'invecchiamento e nella senescenza cellulare è discusso ulteriormente al termine del presente capitolo.

### Cariotipi: classificazione dei cromosomi umani

Un certo numero di anomalie genetiche può essere direttamente collegato al pattern cromosomico. La caratterizzazione o cariotipizzazione del numero e della struttura dei cromosomi riveste, quindi, una considerevole importanza diagnostica. Gli aspetti tipici dei singoli cromosomi possono essere osservati più facilmente durante la metafase, sebbene durante la profase si possano condurre analisi più dettagliate.

Linfociti ottenuti da campioni di sangue, o cellule prelevate da altri tessuti, sono utilizzati come fonte di cromosomi. Lo studio del pattern cromosomico fetale generalmente viene eseguito su campioni di liquido amniotico contenente cellule fetali prelevati dall'utero mediante amniocentesi, oppure su piccole porzioni di villi coriali prelevati dalla placenta. Independentemente dalla loro origine, le cellule sono coltivate in vitro e indotte a dividersi mediante un trattamento con agenti che promuovono la divisione cellulare. La mitosi viene poi interrotta in metafase mediante inibitori del fuso. I cromosomi vengono dapprima dispersi provocando il rigonfiamento cellulare in una soluzione ipotonica, quindi le cellule sono sottoposte a blanda fissazione, rotte meccanicamente e i cromosomi sono distesi su un vetrino. Diverse modalità di colorazione consentono l'identificazione dei singoli cromosomi in base alle dimensioni, alla forma e alla distribuzione della colorazione (Fig. 1.14). Le tecniche generali mostrano gli aspetti più evidenti, per



**Fig. 1.14** Cromosomi maschili normali, disposti in base al cariotipo. **A.** Preparazione con bandeggio G. **B.** Preparazione colorata con ibridazione in situ a fluorescenza per identificare ciascun cromosoma. (Per gentile concessione del Dr. Denise Sheer, Cancer Research UK.)

TABELLA 1.1 Principali classi di cromosomi

Gruppo	Aspetti
1-3 (A)	Grandi cromosomi metacentrici
4-5 (B)	Grandi cromosomi submetacentrici
6-12 + X (C)	Metacentrici di media dimensione
13-15 (D)	Acrocentrici di media dimensione con satelliti
16-18 (E)	Metacentrici più corti (16) o submetacentrici (17,18)
19-20 (F)	Metacentrici più corti
21-22 + Y (G)	Acrocentrici corti; 21, 22 con satelliti, Y senza satelliti

esempio la lunghezza dei bracci cromosomici e la posizione dei restringimenti. Le tecniche di bandeggio evidenziano diversi pattern di colorazione, caratteristici per ogni tipo cromosomico. La colorazione con sostanze fluorescenti, come le mostarde di chinacrina e i composti correlati, produce bande Q, mentre la colorazione con metodo di Giemsa (dopo un trattamento che denatura parzialmente la cromatina) dà bande G (si veda Fig. 1.14A). Altri metodi meno utilizzati includono: la colorazione di Giemsa inversa, in cui le aree chiare e scure sono invertite (bande R); la colorazione dell'eterocromatina costitutiva con sali di argento (bandeggio C); e il bandeggio T per colorare le estremità (telomeri) dei cromosomi. Nel complesso, questi metodi consentono la classificazione dei cromosomi in coppie di autosomi numerate, in base alle dimensioni, in ordine decrescente da 1 a 22, più i cromosomi sessuali.

Un compendio delle classi principali di cromosomi è riportato nella **Tabella 1.1**.

I progressi metodologici nelle tecniche di bandeggio hanno migliorato il riconoscimento di pattern cromosomici abnormi. Questi comprendono la traslocazione reciproca tra i cromosomi 9 e 22, quest'ultimo caratteristicamente corto è noto come cromosoma Philadelphia (Ph<sup>1</sup>); si tratta di un tratto distintivo della leucemia mieloide cronica e di alcuni casi di leucemia linfoblastica acuta.

L'uso dell'ibridazione in situ con sonde fluorescenti di DNA specifiche per ogni cromosoma (si veda Fig. 1.14B) consente l'identificazione di anomalie anche molto lievi.

### Nucleolo

I nucleoli rappresentano la caratteristica preminente del nucleo in interfase (si veda Fig. 1.2). Essi sono la sede della maggior parte della sintesi dell'RNA ribosomiale (rRNA) e dell'assemblaggio delle subunità ribosomiali. I nucleoli si organizzano alla fine della mitosi e comprendono cluster ripetuti di DNA ribosomiale (rDNA) e molecole attivamente coinvolte nella formazione delle subunità ribosomiali. La fase iniziale dell'assemblaggio di una subunità ribosomiale consiste nella trascrizione dei geni dell'rDNA a opera della RNA polimerasi I. I geni dell'rDNA, arrangiati in sequenze ripetute in tandem dette regioni organizzative nucleolari (NOR, Nucleolar Organizing Regions), sono localizzati su cromosomi acrocentrici. Nell'uomo esistono cinque coppie di cromosomi acrocentrici. Il trascritto iniziale dell'rRNA precursore 47S viene clivato a formare gli rRNA maturi 28S, 18S e 5,8S, assemblati con l'rRNA 5S (sintetizzato dall'RNA polimerasi III al di fuori del nucleolo) e accoppiati a piccole ribonucleoproteine nucleolari e ad altre proteine non ribosomiali per formare le subunità preribosomiali 60S (contenenti rRNA 28S, rRNA 5,8S e rRNA 5S) e 40S (contenenti rRNA 18S). Queste vengono successivamente esportate nel citoplasma attraverso i pori nucleari come subunità ribosomiali mature. Nell'uomo sono state identificate circa 726 proteine nucleolari tramite purificazione proteica e spettrometria di massa. Per ulteriori approfondimenti sulle funzioni nucleolari, si veda Boisvert et al. (2007).

La biogenesi dei ribosomi avviene in subregioni distinte del nucleolo, visualizzate al microscopio elettronico. Tre subregioni nucleolari sono i centri fibrillari (FC, Fibrillar Centre), le componenti fibrillari dense (DFC, Dense Fibrillar Component) e le componenti granulari (GC, Granular Component). La trascrizione delle sequenze ripetute di rDNA ha luogo al confine tra FC e DFC; i pool di RNA polimerasi I risiedono nelle regioni FC; la processazione dei trascritti e l'accoppiamento a piccole ribonucleoproteine nucleolari ha luogo nelle DFC; e l'assemblaggio delle subunità ribosomiali viene completato nelle regioni GC.

Il nucleolo si disassembla quando le cellule entrano in mitosi e la trascrizione si disattiva. Esso si riforma dopo la riorganizzazione dell'involucro nucleare in telofase, nell'ambito di un processo associato all'inizio della trascrizione nei centri organizzativi nucleolari su ciascun cromosoma specifico, e diviene funzionale durante la fase G<sub>1</sub> del ciclo cellulare. Un pool adeguato di subunità ribosomiali, durante la crescita e la divisione delle cellule, richiede un'attività nucleolare stabile per supportare la sintesi proteica. Molte DNA elicasi, un gruppo conservato di enzimi che srotolano il DNA, si accumulano nel nucleolo in particolari condizioni, come la sindrome di Bloom (una malattia autosomica recessiva caratterizzata da deficit di crescita, immunodeficienza e predisposizione al cancro) e la sindrome di Werner (una condizione autosomica recessiva caratterizzata dalla comparsa precoce di varie patologie associate all'invecchiamento).

## DIVISIONE CELLULARE E CICLO CELLULARE

Durante lo sviluppo prenatale, la maggior parte delle cellule va incontro a ripetute divisioni (**Video 1.1**) a mano a mano che il corpo cresce in dimensioni e in complessità. Nel maturare, le cellule si differenziano strutturalmente e funzionalmente. Alcune, come i neuroni, perdono la capacità di dividersi. Altre possono persistere per tutta la vita dell'individuo come cellule progenitrici capaci di replicarsi, come, per esempio, le cellule del tessuto emopoietico del midollo osseo. Molte cellule progenitrici si dividono raramente, ma danno origine a cellule figlie che vanno incontro a cicli ripetuti di divisioni mitotiche in quanto cellule proliferanti (o transitorie). Le loro divisioni possono avvenire in rapida successione, come avviene nelle linee cellulari a breve durata di vita, con un turnover e un tempo di sostituzione altrettanto rapidi. Le cellule transitorie proliferanti sono tutte destinate a differenziarsi e, alla fine, a morire ed essere rimpiazzate, diversamente da quanto accade per la popolazione di cellule progenitrici, che si autorinnova.

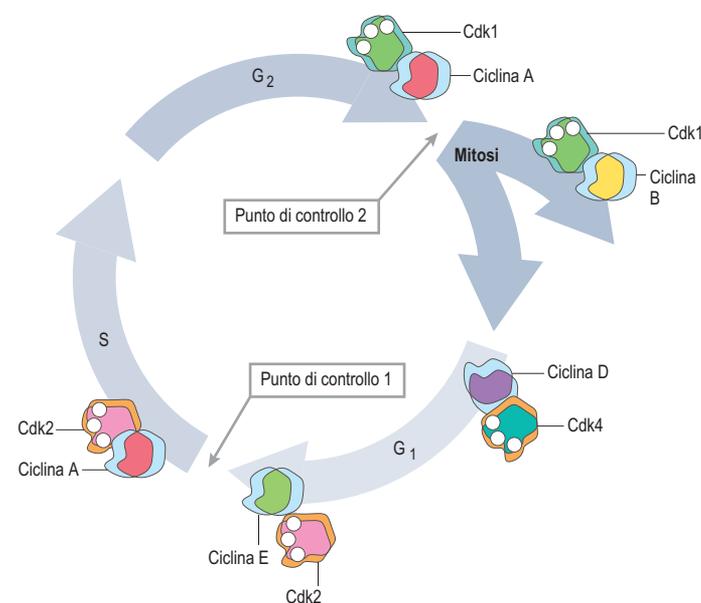
Le modalità e la velocità della divisione cellulare nei tessuti sono molto variabili. In molti epiteli, come le cripte tra i villi intestinali, la sostituzione di cellule danneggiate o invecchiate mediante la divisione di cellule progenitrici può essere rapida. La velocità della divisione cellulare può variare anche in base alle necessità, come avviene nella guarigione delle ferite cutanee, in cui la proliferazione cellulare aumenta fino a raggiungere un picco e quindi ritorna ai livelli normali. La velocità della divisione cellulare è strettamente associata alle necessità legate alla crescita e al processo di sostituzione cellulare. Laddove questo accoppiamento sia difettoso, i tessuti possono cessare di crescere o di rimpiazzare le proprie cellule oppure possono andare incontro a crescita eccessiva, producendo neoplasie.

Il ciclo cellulare è una sequenza ordinata di eventi che termina con la crescita e la divisione della cellula per produrre due cellule figlie. Generalmente dura almeno 12 ore, ma nella maggior parte dei tessuti adulti può essere molto più lungo, ed è suddiviso in quattro fasi distinte, che sono conosciute come G<sub>1</sub> (gap 1, prima pausa), S (sintesi del DNA), G<sub>2</sub> (gap 2, seconda pausa) e M (mitosi). La combinazione delle fasi G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> è conosciuta come interfase. La fase M è la fase mitotica. G<sub>1</sub> è il periodo in cui la cellula risponde ai fattori di crescita che la inducono a iniziare un nuovo ciclo cellulare; una volta avviata, questa fase è irreversibile. Essa è anche la fase in cui viene attivata la maggior parte dei meccanismi molecolari necessari per completare un nuovo ciclo cellulare. I centrosomi si duplicano durante la fase S di preparazione alla mitosi. Le cellule che sono ancora capaci di proliferare, ma che non si stanno più dividendo, entrano in una fase chiamata G<sub>0</sub> e sono dette quiescenti nonostante possano essere fisiologicamente molto attive. I fattori di crescita possono stimolare le cellule quiescenti a lasciare la fase G<sub>0</sub> e a rientrare nel ciclo cellulare, mentre le proteine codificate da alcuni geni oncosoppressori (per esempio il gene mutato nel retinoblastoma, *Rb*) bloccano il ciclo cellulare in G<sub>1</sub>. La sintesi del DNA (replicazione del genoma) avviene durante la fase S, al termine della quale il DNA contenuto nella cellula risulta duplicato. Durante la fase G<sub>2</sub>, la cellula si prepara per la divisione; questo periodo termina con l'inizio dell'addensamento cromatinico dei cromosomi e la rottura dell'involucro nucleare. I tempi richiesti dalle fasi S, G<sub>2</sub> e M sono simili per la maggior parte dei tipi cellulari e durano rispettivamente 6-8, 2-4 e 1-2 ore. La durata della fase G<sub>1</sub> presenta, invece, notevoli variazioni, oscillando da meno di 2 ore nelle cellule a rapida divisione a più di 100 ore all'interno dello stesso tessuto.

Una cellula entra nelle diverse fasi del ciclo cellulare con il controllo di proteine del citoplasma: cicline e chinasi ciclico-dipendenti (Cdk, Cyclin-dependent kinases; Fig. 1.15). Le cicline comprendono cicline  $G_1$  (ciclina D), cicline della fase S (ciclina E e A) e cicline mitotiche (ciclina B). Le Cdk, proteinchinasi attivate dal legame di una subunità di ciclina, comprendono la  $G_1$  Cdk (Cdk4), una Cdk della fase S (Cdk2) e una Cdk della fase M (Cdk1). La progressione del ciclo cellulare è regolata in parte da cambiamenti dell'attività delle Cdk. Ciascuna fase del ciclo cellulare è caratterizzata dall'attività di una o più coppie Cdk-ciclina. I passaggi tra le fasi del ciclo cellulare sono indotti dalla proteolisi altamente specifica a opera del proteasoma 26S delle cicline e di altre componenti chiave.

Per fare un esempio, il passaggio da  $G_2$  alla mitosi è indotto dall'attivazione della Cdk1 a opera delle cicline a essa associate, le cicline tipo A e B; le variazioni caratteristiche della struttura cellulare che si verificano quando la cellula entra in mitosi, sono dovute soprattutto alla fosforilazione di proteine da parte dei complessi attivi Cdk1-ciclina A e Cdk1-ciclina B. Le cellule escono dalla mitosi quando una ubiquitina ligasi E3, il complesso promuovente l'anafase, anche detto ciclosoma (APC/C), contrassegna le cicline per la distruzione. Inoltre, l'APC/C induce la degradazione della ciclina mitotica B e la distruzione delle coesine, consentendo ai cromatidi fratelli di dividersi.

Nel ciclo cellulare vi sono importanti checkpoint (si veda Fig. 1.21). Il checkpoint 1 comporta il legame delle cicline  $G_1$  con le loro rispettive Cdk per segnalare alla cellula di prepararsi alla sintesi di DNA. Il fattore promuovente la fase S (SPF, S-phase Promoting Factor; ciclina A legata alla Cdk2) entra nel nucleo per stimolare la sintesi del DNA. Il checkpoint 2 richiede che il fattore promuovente la fase M (ciclina mitotica B legata alla Cdk1 della fase M) stimoli l'assemblaggio del fuso mitotico, la rottura dell'involucro nucleare, l'arresto della trascrizione genica e la condensazione dei cromosomi. Durante la metafase della mitosi, il fattore promuovente la fase M attiva l'APC/C che determina la distruzione delle coesine, i complessi proteici che mantengono uniti tra loro i cromatidi fratelli. Quindi, in anafase, i cromatidi separati si muovono ai poli opposti del fuso. Infine, le cicline B sono distrutte in



**Fig. 1.15** Il ciclo cellulare consiste di un'interfase (fase  $G_1$ , fase S e fase  $G_2$ ), seguita dalla mitosi. Il complesso ciclina D/Cdk4 si assembla all'inizio di  $G_1$ ; il complesso ciclina E/Cdk2 si assembla verso la fine di  $G_1$ , quando la cellula si sta preparando ad attraversare il checkpoint 1 per l'inizio della sintesi del DNA (durante la fase S). Il complesso ciclina A/Cdk2 si assembla quando inizia la sintesi del DNA. Il completamento di  $G_2$  è indicato dall'avvenuto assemblaggio del complesso ciclina A/Cdk1. Una cellula attraversa il checkpoint 2 per iniziare la mitosi quando si assembla il complesso ciclina B/Cdk1. Il complesso ciclina D/Cdk4 è degradato dal proteasoma 26S e un complesso assemblato ciclina D/Cdk4 indica l'inizio della fase  $G_1$  del nuovo ciclo cellulare. Per i dettagli, si veda il testo. (Da Kierszenbaum AL, Tres LL. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology. 5th ed.; Elsevier, Mosby. Copyright 2019.)

seguito al loro legame con l'ubiquitina, che le espone alla distruzione a opera del proteasoma 26S. Con l'inizio della fase  $G_1$ , le cicline D, legate al Cdk4, iniziano la preparazione del nuovo ciclo cellulare.

Il checkpoint 2 agisce da controllo di qualità ritardando la progressione del ciclo cellulare quando il DNA è stato danneggiato da radiazioni o da mutageni chimici. Le cellule con difetti dei checkpoint, come la perdita della proteina p53 che rappresenta un importante fattore di controllo negativo della divisione cellulare in tutte le cellule, sono frequentemente coinvolte nello sviluppo di neoplasie maligne. Un esempio è la sindrome di Li Fraumeni in cui il gene difettoso *p53* determina un'elevata frequenza del cancro nei soggetti affetti. Nelle cellule, la proteina p53 si lega al DNA e stimola un altro gene a produrre la proteina p21 che interagisce con la Cdk2 per prevenire l'attività promotrice della fase S. Quando la p53 mutante non può più legarsi al DNA per stimolare la produzione di p21 volta a interrompere la sintesi del DNA, le cellule acquisiscono i caratteri propri delle cellule tumorali. Il gene *p53* è un esempio di gene oncosoppressore. Per ulteriori approfondimenti sulle mutazioni di *p53* e il cancro, si veda Muller e Vousden (2013).

## Mitosi e meiosi

La mitosi è il processo che porta alla distribuzione di copie identiche del genoma della cellula parentale alle due cellule figlie somatiche. Nella meiosi, le divisioni immediatamente precedenti alla produzione finale dei gameti dimezzano il numero dei cromosomi al numero aploide, di modo che con la fecondazione venga ristabilito il numero diploide. La meiosi include inoltre una fase in cui si ha lo scambio di materiale genetico tra i due cromosomi omologhi. Ciò consente un riarrangiamento dei geni, il che significa che le cellule figlie differiscono dalla cellula parentale sia nell'esatta sequenza genica sia nel loro stato aploide. La mitosi e la meiosi sono simili sotto molti aspetti e si differenziano soprattutto per il comportamento dei cromosomi durante le fasi precoci della divisione cellulare. Nella meiosi si hanno due divisioni in successione, senza una fase S intermedia. La meiosi I è diversa dalla mitosi, mentre la meiosi II è più simile alla mitosi.

### Mitosi

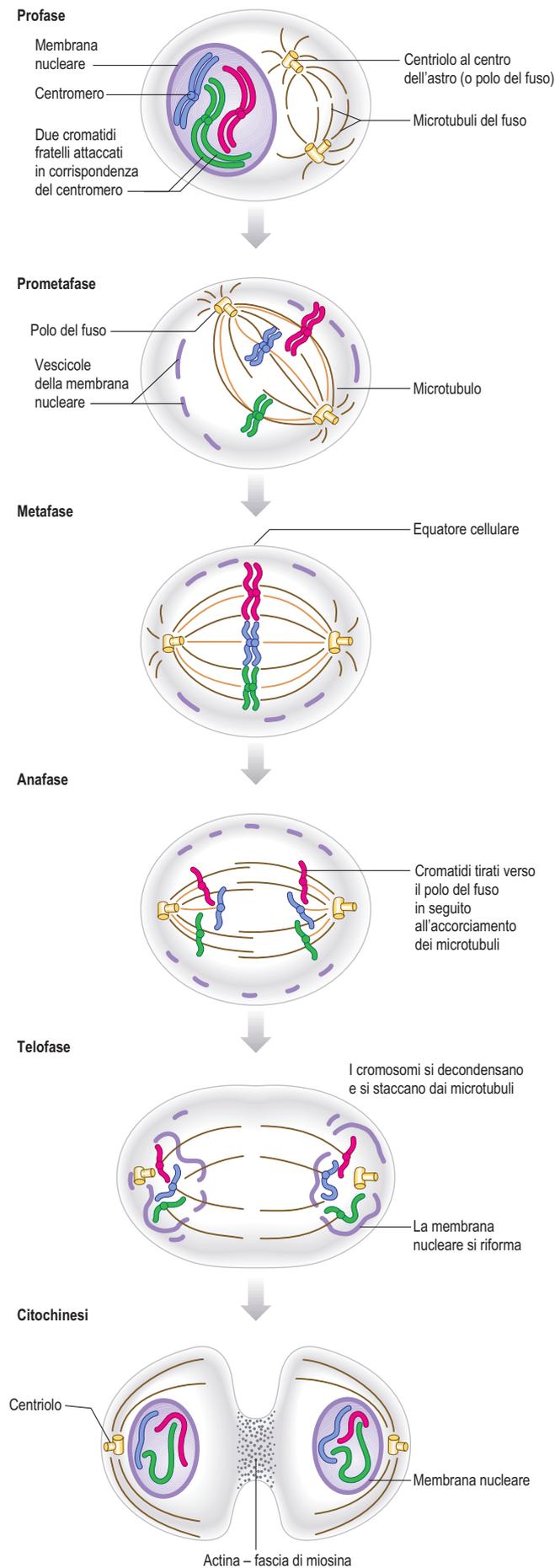
Durante la fase S dell'interfase del ciclo cellulare viene sintetizzato nuovo DNA. Questo significa che la quantità di DNA nelle cellule diploidi è raddoppiata e si ottiene una quantità tetraploide rispetto all'inizio della mitosi, sebbene il numero dei cromosomi sia ancora diploide. Durante la mitosi, questa quantità viene divisa tra le due cellule figlie, cosicché la quantità di DNA e il numero dei cromosomi sono diploidi in entrambe le cellule. I cambiamenti cellulari che permettono questa distribuzione sono convenzionalmente suddivisi in quattro fasi chiamate profase, metafase, anafase e telofase (Fig. 1.16 e 1.17; si veda Video 1.1).

### Profase

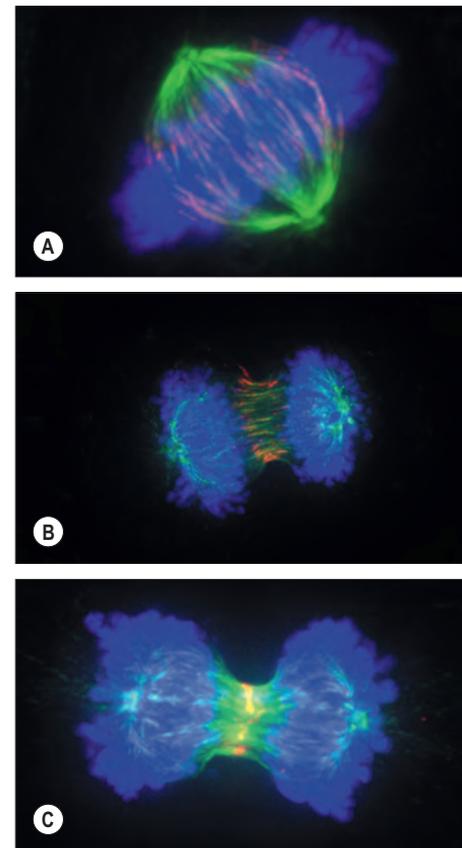
Durante la profase, i filamenti di cromatina, che si sono molto distesi durante l'interfase, si accorciano, si ispessiscono e si evidenziano come cromosomi riconoscibili. Ogni cromosoma è formato dai cromatidi duplicati (i prodotti della replicazione del DNA) uniti a livello dei centromeri. Fuori dal nucleo, le due coppie di centrioli iniziano a separarsi e si muovono verso i poli opposti della cellula. Tra le due coppie vengono assemblati microtubuli paralleli per creare il fuso mitotico, mentre altri si irradiano a formare i microtubuli astrali, che vanno a formare i poli del fuso o centro mitotico. A mano a mano che la profase prosegue, i nucleoli scompaiono e l'involucro nucleare si disintegra all'improvviso per rilasciare i cromosomi, un evento che segna la fine della profase.

### Prometafase-metafase

Quando l'involucro nucleare scompare, i microtubuli del fuso si estendono nella regione centrale della cellula, attaccandosi ai cromosomi che di conseguenza si muovono verso l'equatore del fuso (prometafase). Il fuso è formato dai microtubuli del cinetocoro attaccati al cinetocoro, una struttura multiproteica assemblata in corrispondenza della regione centromerica del DNA, e dai microtubuli polari che non si legano ai cromosomi ma si sovrappongono tra loro al centro della cellula. Il raggruppamento dei cromosomi all'equatore del fuso è detto piastra metafase o equatoriale. I cromosomi, attaccati ai loro centromeri, sembrano essere disposti ad anello se osservati da entrambi i poli



**Fig. 1.16** Le fasi della mitosi, incluse la comparsa e la distribuzione dei cromosomi.



**Fig. 1.17** Immagini in immunofluorescenza degli stadi della mitosi in cellule di carcinoma umano in coltura. **A.** Metafase, con i microtubuli del fuso (verde), le proteine stabilizzanti i microtubuli (HURP; rosso) e il DNA cromosomico (blu). **B.** Anafase, con i microtubuli del fuso (verde), il fuso centrale (Aurora-B chinasi, rosso) e i cromosomi segregati (blu). **C.** Anafase tardiva, con i microtubuli del fuso (verde), il fuso centrale (Plk1 chinasi, rosso, che appare giallo dove co-localizza con le proteine del microtubulo) e i cromosomi segregati (blu). (Per gentile concessione del Dr. Herman Silljé, Max-Planck-Institute für Biochemie, Martinsried, Germany.)

della cellula, oppure sembrano giacere con disposizione lineare attraverso questo piano se osservati da sopra. I movimenti citoplasmatici durante la tarda metafase portano a una distribuzione approssimativamente uguale dei mitocondri e delle altre strutture cellulari nella periferia cellulare.

### Anafase

Alla fine della metafase ogni cromosoma consiste in una coppia di cromatidi fratelli attaccati ai poli opposti del fuso mediante fasci di microtubuli associati al cinetocoro. L'anafase inizia con il clivaggio proteolitico, a opera dell'enzima separasi, di subunità chiave formate da complessi proteici conosciuti come coesine. Questi tengono insieme i cromatidi fratelli replicati consentendo loro di resistere alla separazione anche quando esposti alle forze di trazione esercitate dai microtubuli. Il clivaggio proteolitico determina la perdita della coesione tra i cromatidi fratelli, che si muovono quindi verso i poli opposti del fuso a mano a mano che i fasci di microtubuli attaccati ai cinetocori si accorciano e si muovono verso i poli. Al termine dell'anafase, i cromatidi fratelli sono raggruppati a entrambe le estremità della cellula, ed entrambi i gruppi sono in numero diploide. Inizia quindi un'invaginazione a livello dell'equatore della cellula che andrà approfondendosi durante la telofase come solco di scissione.

### Telofase

Durante la telofase si riforma l'involucro nucleare, iniziando con l'associazione di vescicole costituite da membrane sulla superficie dei cromosomi. Più tardi, dopo che le vescicole si sono fuse e l'involucro nucleare si è completato, la cromatina cromosomica diviene meno addensata e si riformano i nucleoli. Contemporaneamente, la divisione

## CELLULE, TESSUTI E SISTEMI

del citoplasma, che in genere inizia nell'anafase precoce, continua finché non si separano le nuove cellule, ognuna con il proprio nucleo. Il fuso residuo a questo punto si dissolve. Mentre il solco di scissione è attivo, una banda o cintura periferica di actina e miosina compare nella zona di restringimento; la contrazione di questa banda è responsabile della formazione del solco.

Qualche volta si può avere un fallimento nella disgiunzione dei cromatidi, cosicché i cromatidi fratelli si portano allo stesso polo. Delle due nuove cellule, una sarà dotata di un numero maggiore l'altra di un numero minore di cromosomi rispetto al numero diploide. L'esposizione alle radiazioni ionizzanti favorisce la non-disgiunzione e può, mediante danno cromosomico, inibire completamente la mitosi. Un sintomo tipico dell'esposizione a radiazioni è l'incapacità degli epitelii a rapida moltiplicazione di rimpiazzare le proprie cellule, con conseguente ulcerazione della cute e delle mucose. La mitosi può essere interrotta anche da agenti chimici, in particolare vinblastina, paclitaxel (taxolo) e loro derivati. Questi composti provocano la disaggregazione dei microtubuli del fuso oppure interferiscono con le loro dinamiche per cui la mitosi si arresta in metafase.

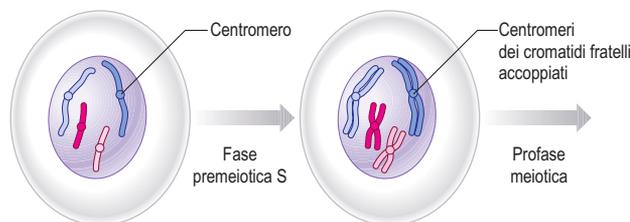
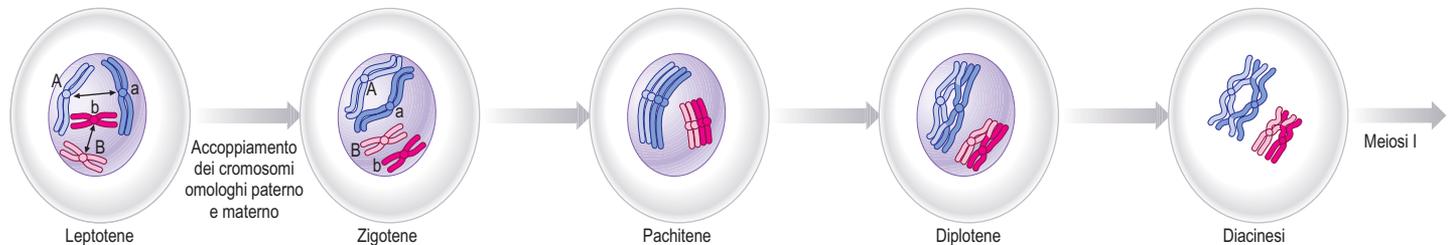
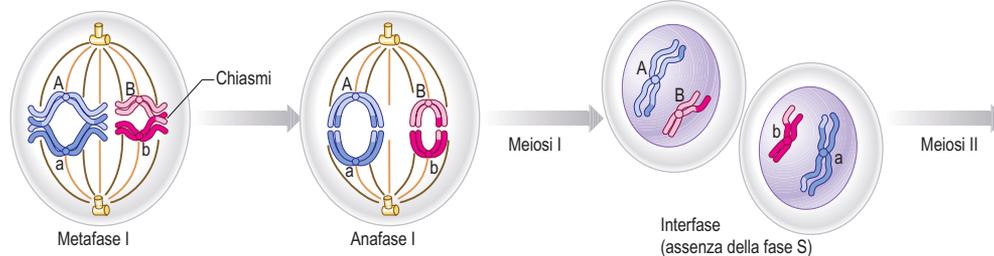
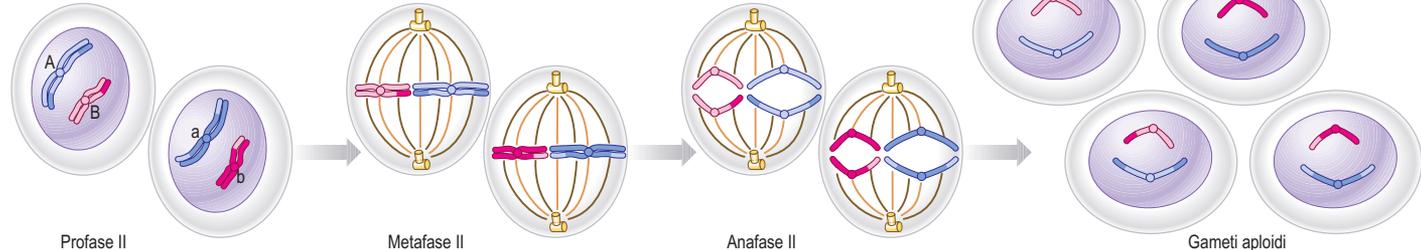
**Meiosi**

Durante la meiosi si hanno due divisioni cellulari consecutive: meiosi I e II (Fig. 1.18). I dettagli di questo processo sono diversi, a livello cellulare, per le linee maschili e femminili.

**Meiosi I****Profase I**

La profase meiotica I è una fase lunga e complessa che differisce molto dalla profase mitotica ed è abitualmente suddivisa in cinque sottofasi, chiamate leptotene, zigotene, pachitene, diplotene e diacinesi. Vi sono tre aspetti caratteristici della profase meiotica maschile che non si osservano nella profase mitotica: l'appaiamento, o sinapsi, dei cromosomi omologhi di origine paterna e materna a formare strutture bivalenti; l'organizzazione dei nucleoli da parte dei bivalenti autosomici; e la sintesi significativa di RNA non ribosomiale a opera dei bivalenti autosomici (in contrasto con l'inattività trascrizionale della coppia cromosomica XY) (Tres 2005). Nella femmina, la profase meiotica I inizia durante la gonadogenesi fetale, si arresta allo stadio di diplotene e riprende con la pubertà. Nel maschio la meiosi inizia alla pubertà.

**Stadio di leptotene** Durante il leptotene, i cromosomi omologhi (le copie materna e paterna dello stesso cromosoma), replicati nella precedente fase S e ognuno dei quali consiste di cromatidi fratelli uniti a livello del centromero (si veda sopra), si dispongono nel nucleo uno vicino all'altro e inizia il processo di ricombinazione genica. Dal punto di vista citologico, i cromosomi iniziano a addensarsi, apparendo come filamenti singoli che sono attaccati all'involucro nucleare mediante i loro telomeri. Spesso mostrano granulazioni caratteristiche per tutta la loro lunghezza.

**A Eventi che precedono la meiosi****B Profase meiotica****C Meiosi I****D Meiosi II**

**Fig. 1.18** Le fasi della meiosi, rappresentate mediante due coppie di omologhi materni e paterni (colori scuri e chiari). Sono evidenziati i cambiamenti del DNA e dei cromosomi complementari e lo scambio di informazioni genetiche tra gli omologhi.

**Stadio di zigotene** Durante lo zigotene, i cromosomi omologhi iniziano l'appaiamento o sinapsi, nel quale si associano strettamente fra loro. L'appaiamento può iniziare vicino ai telomeri, alla superficie interna della membrana nucleare, e durante questa fase i telomeri spesso si raggruppano da un lato del nucleo (uno stadio conosciuto con il nome di stadio del bouquet perché i cromosomi assomigliano a un mazzo di fiori). Le coppie di omologhi che si sono appaiate, dette anche bivalenti, sono legate insieme da un nastro tripartito, il complesso sinaptonemico, formato da due elementi densi laterali e da un elemento centrale lineare meno denso.

Anche i cromosomi sessuali cominciano ad appaiarsi durante lo zigotene. Nei maschi, che hanno differenti cromosomi X e Y, l'appaiamento avviene in una regione della sequenza condivisa di DNA, conosciuta come regione pseudoautosomica. Il bivalente XY assume una particolare struttura addensata detta vescicola sessuale, che si associa successivamente durante lo stadio di pachitene a masse nucleolari migratorie che si formano nei bivalenti autosomici.

Il comportamento dei cromosomi nella meiosi è strettamente connesso con il processo di ricombinazione genica. Questa inizia durante il leptotene, quando i cromosomi omologhi dapprima si dispongono a distanza l'uno dall'altro. L'appaiamento o sinapsi stabilizzata dal complesso sinaptonemico facilita la ricombinazione, quando i siti di scambio genetico vengono trasformati in strutture specializzate conosciute come chiasmi. Questi sono siti di scambio (*crossing over*) topologici che tengono insieme i cromosomi omologhi.

**Stadio di pachitene** Quando le sinapsi sono complete per tutti i cromosomi, si dice che la cellula è entrata in pachitene. Ogni bivalente sembra una spessa struttura singola, ma in realtà si tratta di due coppie di cromatidi fratelli tenuti insieme dal complesso sinaptonemico. A questo punto, la ricombinazione genica tra due cromatidi, uno derivato dal padre e uno derivato dalla madre, è completata e i siti dove essa è avvenuta (di solito uno per ogni braccio cromosomico) appaiono come noduli di ricombinazione al centro del complesso sinaptonemico.

**Stadio di diplotene** Durante il diplotene, il complesso sinaptonemico si scompone e le coppie di cromosomi omologhi, ora molto accorciate, si separano tranne che nei punti dove è avvenuto lo scambio (chiasmi). Questo processo è detto disgiunzione. Tra ogni coppia di cromosomi omologhi si forma almeno un chiasma che scambia sequenze materne e paterne, ma ne sono stati osservati fino a cinque. Nelle ovaie, gli oociti primari entrano nel diplotene a partire dal quinto mese di vita intrauterina e rimangono in questo stadio fino al periodo che precede l'ovulazione (fino ai 50 anni di età).

**Diacinesi** La diacinesi è la prometafase della prima divisione meiotica. I cromosomi, ancora sotto forma di bivalenti, diventano ancora più corti e più spessi, si attaccano gradualmente al fuso mitotico e si allineano alla piastra metafase. Negli oociti, il fuso si forma senza i cromosomi. Dapprima i microtubuli si raggruppano e vengono stabilizzati vicino ai cromosomi, poi l'azione di alcune molecole motrici li ordina in un fuso bipolare. Sorprendentemente, questo fuso è un meccanismo di divisione cromosomica tanto efficace quanto quello delle cellule mitotiche provvisto di centrosomi ai due poli.

### Metafase I

La metafase I assomiglia alla metafase mitotica, tranne per il fatto che i cromosomi attaccati ai microtubuli del fuso sono bivalenti e non singoli. Essi si dispongono in modo che le coppie di omologhi vadano a occupare il piano equatoriale del fuso. I centromeri di ogni coppia di cromatidi fratelli funzionano come una singola unità, rivolgendosi verso un solo polo del fuso. I cromosomi omologhi sono trascinati verso i poli opposti del fuso, ma rimangono accoppiati tramite i chiasmi a livello della regione mediana del fuso. Errori nella segregazione dei cromosomi (non-disgiunzioni) portano alla produzione di una progenie aneuploide. La maggior parte degli embrioni umani aneuploidi non è vitale ed è questa la causa principale di perdita del feto (aborto spontaneo), in particolare durante il primo trimestre di gravidanza. La forma più comune di progenie aneuploide vitale nell'uomo è la sindrome di Down (trisomia del cromosoma 21), la cui prevalenza va incontro a un drammatico incremento con l'aumentare dell'età materna.

### Anafase e telofase I

L'anafase I della meiosi inizia con la perdita della coesione tra i bracci di cromatidi fratelli, più di quanto accada nella mitosi. Poiché il posizionamento delle coppie di bivalenti è casuale, anche l'assortimento dei cromosomi materni e paterni in ogni nucleo in telofase è casuale. I centromeri fratelli, e quindi i cromatidi, non si separano durante l'anafase I.

Durante la meiosi I, la divisione del citoplasma avviene attraverso meccanismi specializzati. Nelle femmine, la divisione è molto asimmetrica, in quanto produce una cellula uovo e una piccola cellula conosciuta con il nome di corpuscolo polare. Nei maschi, il processo porta alla produzione di spermatozoi che rimangono connessi per mezzo di piccoli ponti citoplasmatici.

### Meiosi II

La meiosi II inizia dopo un breve intervallo durante il quale non si ha sintesi di DNA. I centromeri dei cromatidi fratelli rimangono accoppiati, ma ruotano cosicché ognuno si rivolge verso un polo opposto del fuso. L'inizio dell'anafase II è innescato dalla perdita della coesione tra i centromeri, come avviene nella mitosi. Questa seconda divisione è più simile alla mitosi, in quanto i cromatidi si separano durante l'anafase, ma, a differenza della mitosi, i cromatidi separati sono geneticamente diversi (sono il risultato della ricombinazione genica). A questo punto si verifica anche la divisione del citoplasma e, in questo modo, nel maschio, si ottengono quattro cellule aploidi, connesse tra loro mediante ponti citoplasmatici, come risultato delle meiosi I e II.

## POLARIZZAZIONE DELLA CELLULA E DOMINI CELLULARI

Gli epitelii sono organizzati in lamine o in strutture ghiandolari con una composizione del microambiente con cui confinano molto diversa sui due lati. Le cellule che li costituiscono trasferiscono attivamente macromolecole e ioni da una parte all'altra delle due superfici e presentano pertanto una polarizzazione strutturale e funzionale. Le cellule polarizzate, soprattutto quelle degli epitelii, sono generalmente suddivise in domini che riflettono le funzioni che vengono svolte all'interno della cellula stessa. La superficie libera, per esempio rivolta verso il lume dell'intestino o delle vie aeree, è la superficie apicale, e il citoplasma a essa adiacente costituisce il dominio apicale della cellula, a livello del quale la cellula si interfaccia con uno specifico compartimento corporeo (o, nel caso dell'epidermide, con il mondo esterno). La superficie apicale è pertanto specializzata ad agire come una barriera, limitando il passaggio di sostanze da questo compartimento verso il resto del corpo. Specifiche componenti vengono selettivamente assorbite dal compartimento esterno o trasferite verso di esso mediante i processi attivi di trasporto attivo ed endocitosi, se lo spostamento avviene verso l'interno, oppure di esocitosi e secrezione, se questo avviene verso l'esterno. La superficie apicale è spesso ricoperta di microvilli, piccole estroflessioni della superficie cellulare che aumentano l'area della superficie stessa e quindi migliorano soprattutto i processi di assorbimento.

La superficie della cellula opposta a quella apicale è la superficie basale; il citoplasma a essa associato è il dominio cellulare basolaterale. In un epitelio monostratificato, questa superficie è in contatto con la lamina basale. Le altre superfici della cellula sono note con il nome di superfici cellulari laterali: le superfici laterali e quella basale svolgono spesso funzioni simili e il loro dominio cellulare condiviso è detto dominio basolaterale. Le cellule trasportano attivamente alcune sostanze, come le sostanze nutritive dal lume intestinale o le secrezioni endocrine, attraverso la loro superficie basale (o basolaterale) verso l'adiacente tessuto connettivo e i capillari che decorrono nella sua matrice. I gas apolari disciolti (ossigeno e anidride carbonica) diffondono liberamente tra la cellula e il torrente ematico attraverso la superficie basolaterale. Le superfici apicale e basolaterale sono separate da stretti dispositivi di giunzione intercellulari, le giunzioni serrate, che impediscono il passaggio attraverso lo spazio tra cellule adiacenti anche di ioni di piccole dimensioni, mantenendo così le differenze esistenti tra gli ambienti che si trovano ai due lati dell'epitelio.

## Proiezioni cellulari di superficie

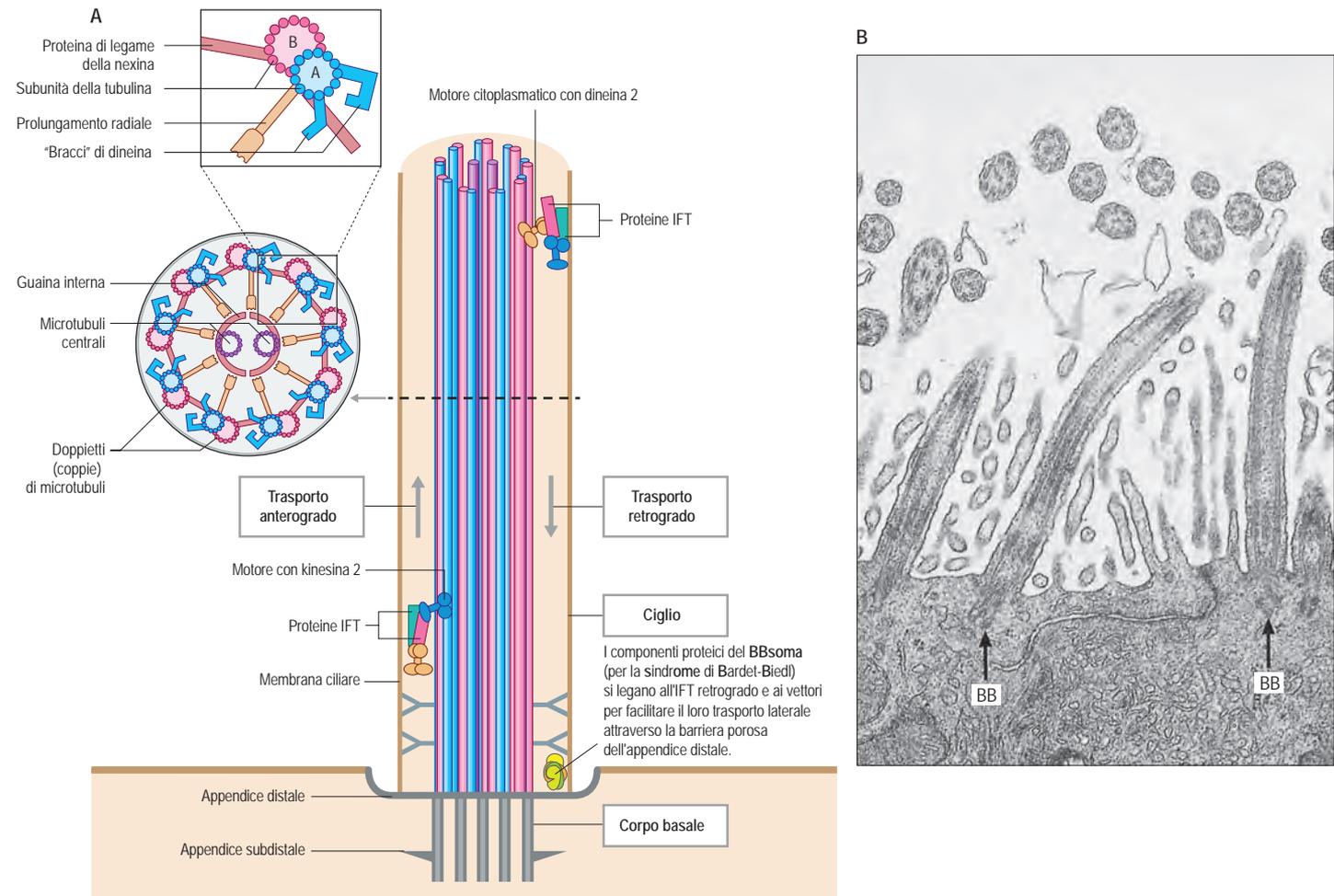
Le superfici di molti diversi tipi cellulari presentano strutture specializzate che si proiettano oltre le superfici stesse. Queste proiezioni possono permettere il movimento della cellula stessa (flagelli) o dei fluidi attraverso la superficie apicale della cellula (ciglia), oppure possono aumentare l'area della superficie disponibile per l'assorbimento (microvilli). Anche le invaginazioni della membrana plasmatica basolaterale aumentano l'area per il trasporto attraverso questa superficie della cellula. Nella maggior parte delle cellule epiteliali che non si dividono, il corpo basale derivato dal centriolo dà origine a un ciglio primario non mobile che svolge un importante ruolo meccanosensitivo.

### Ciglia e flagelli

Le ciglia e i flagelli sono estroflessioni della superficie cellulare, mobili e simili a capelli. Essi creano correnti nei fluidi circostanti, rendono

possibili movimenti della cellula a cui sono attaccati, o entrambi. Vi sono due categorie di ciglia: ciglia singole primarie non mobili e ciglia multiple mobili. Le ciglia primarie sono immobili ma possono rilevare segnali fisici e chimici. Le ciglia mobili sono presenti in gran numero sui domini apicali degli epitelii del tratto respiratorio superiore e del dotto ooforo, e pulsano con un movimento simile a un'onda per indurre il movimento dei fluidi. Le ciglia possono essere presenti, in forma modificata, alle estremità dendritiche delle cellule recettoriali olfattive, delle cellule capellate vestibolari (chinociglia) e dei bastoncelli e dei coni fotorecettoriali della retina. I flagelli hanno come funzione primaria la locomozione cellulare. Si trovano in eucarioti unicellulari e negli spermatozoi, che posseggono ciascuno un flagello lungo 70  $\mu\text{m}$ .

Un ciglio o un flagello presenta un fusto centrale (di 0,25  $\mu\text{m}$  di diametro) che forma la maggior parte della sua lunghezza, una punta affusolata e un corpo basale alla sua base, situato nel citoplasma della cellula (Fig. 1.19). Tranne che alla base, l'intera struttura ciliare è



**Fig. 1.19** **A.** Struttura di un ciglio rappresentata in sezione trasversale (a sinistra) e longitudinale (a destra). A e B sono le subfibre delle coppie periferiche di microtubuli (si veda il testo); il corpo basale è strutturalmente simile a un centriolo, ma con triplette di microtubuli. Il ciglio è formato e mantenuto dal trasporto di molecole di tubulina lungo l'assonema, mediato da proteine del sistema di trasporto intraflagellare (IFT). Il traffico IFT dalla base del ciglio all'apice (trasporto anterogrado; verso l'estremità positiva del microtubulo) è mediato dalla proteina motrice chinesina-2 che mobilizza i complessi proteici dell'IFT. La proteina motrice dineina-2 citoplasmatica partecipa al trasporto retrogrado (verso l'estremità negativa del microtubulo; base del ciglio). Le proteine IFT formano una piattaforma per il trasporto di materiali tra la base e l'apice del ciglio. Le proteine della via di *signalling* Hedgehog partecipano al trasporto intraciliare e intraflagellare (non mostrato). Un'alterazione della proteina motrice chinesina-2 o delle proteine IFT determina il blocco della formazione delle ciglia. Le proteine del corpo basale influenzano il traffico ciliare: comprendono componenti del BBSoma, così chiamato a causa della sua associazione con la sindrome di Bardet-Biedl (BBS). Le proteine del BBSoma, legate alle proteine ciliari, ne facilitano il passaggio attraverso l'appendice distale. Tutte le ciglia mobili e immobili si estendono a partire da un corpo basale, costituito da una tripletta di microtubuli e dalle appendici distali e subdistali. Le appendici distali (chiamate anche fibre di transizione) e strutture a forma di Y ancorano e connettono il corpo basale alla membrana ciliare. **B.** Regione apicale delle cellule epiteliali respiratorie, mostrante le parti prossimali di tre ciglia sezionate longitudinalmente, ancorate nel citoplasma mediante corpi basali (BB, Basal Bodies). Altre ciglia si proiettano fuori del piano di sezione e sono tagliate trasversalmente, presentando la disposizione "9+2" dei microtubuli. (A. Per gentile concessione di Kierszenbaum AL, Tres LL Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology, 5th ed. Elsevier, Saunders. Copyright 2019. B. Tratto con permesso da Young B, Heath JW. Wheater's Functional Histology. 4th ed.: Elsevier, Churchill Livingstone; Copyright 2000.)

ricoperta dalla membrana plasmatica. La parte centrale del ciglio è l'assonema, un cilindro di nove coppie di microtubuli che circonda una coppia centrale di microtubuli (si veda Fig. 1.19). La ciliogenesi delle ciglia primarie e delle ciglia mobili comporta diversi passaggi intermedi distinti. Un corpo basale centriolo-derivato migra dal dominio cellulare apicale, e le coppie di microtubuli dell'assonema emergono dalla sua regione distale (zona di transizione). L'allungamento continuo del ciglio richiede l'importazione e il trasporto intraciliare di dimeri di tubulina all'estremità distale, tramite le proteine motrici bidirezionali del complesso di trasporto intraflagellare (IFT). La lunghezza costante delle ciglia è mantenuta in un equilibrio stazionario dal turnover della tubulina e dall'aggiunta di nuovi dimeri di tubulina all'apice del ciglio.

Molte strutture filamentose si associano alla coppia di 9+2 di microtubuli dell'assonema nel fusto del ciglio o flagello. Esse includono fibre dirette radialmente provenienti dalle coppie più esterne di microtubuli che si dirigono all'interno verso la coppia centrale, circondati da una guaina interna (si veda Fig. 1.19). Le coppie più esterne di microtubuli presentano due file tangenziali di dineina, attaccate alla subfibra completa A della coppia (costituita da 13 protofilamenti), che si rivolgono alla subfibra incompleta B della coppia adiacente (costituita da 10-11 protofilamenti). Le coppie adiacenti sono anche collegate da sottili filamenti di nexina. Le tectine sono impalcature filamentose proteiche che estendono lungo i microtubuli dell'assonema.

Nelle ciglia mobili, schiere di dineina con attività ATPasica causano il movimento delle coppie più esterne di microtubuli l'una dopo l'altra, che si traduce in un movimento di flessione su vasta scala. I microtubuli non modificano la propria lunghezza. I movimenti delle ciglia e dei flagelli sono in gran parte simili. Oltre all'assonema, i flagelli degli spermatozoi hanno delle dense fibre più esterne e una guaina fibrosa che circonda l'assonema. I flagelli si muovono con rapida ondulazione, che si propaga dall'estremità attaccata a quella libera. Negli spermatozoi dell'uomo, questo movimento comprende anche una componente elicoidale. Nelle ciglia, il movimento ritmico è planare ma asimmetrico. Nel movimento utile, il ciglio rimane rigido eccetto che alla sua base, dove si piega a produrre un movimento simile a quello dei remi. Segue un movimento riflesso durante il quale la curvatura si estende dalla base alla punta, riportando il ciglio alla sua posizione iniziale per il ciclo successivo. L'attività dei gruppi di ciglia, in genere, è coordinata, per cui la curvatura di uno di essi è seguita rapidamente dalla curvatura del successivo e così via, con la formazione di un moto a onde protrate caratterizzate da sincronia metacronale (oscillazione sincronizzata chiamata onda metacronale) che si propagano lungo la stessa direzione per essere efficaci. Il movimento delle ciglia è importante per l'eliminazione del muco dalle vie aeree, lo spostamento degli oociti lungo i dotti oofori e la circolazione del liquido cerebrospinale nei ventricoli cerebrali. Nel bottone embrionale in via di sviluppo, il flusso generato dalle ciglia è essenziale per la creazione dell'asimmetria viscerale sinistra-destra (schema di sviluppo). Le ciglia hanno anche una funzione sensitiva, determinata dalla presenza di proteine recettoriali e canali proteici sulla membrana ciliare; in questo modo le ciglia primarie nei dotti collettori del tubulo renale sentono il flusso urinario e regolano anche la morfogenesi duttale. Le ciglia sono importanti per la trasmissione dei segnali secondo un *hedgehog pathway* (modalità a riccio), un meccanismo implicato nell'organizzazione dello schema corporeo, nell'organogenesi e nella genesi tumorale dei vertebrati. Per ulteriori approfondimenti sulla trasmissione dei segnali con *hedge-hog pathway* e sulle ciglia primarie, si veda Briscoe e Théron (2013).

Esiste un gruppo di patologie genetiche in cui le ciglia battono in modo non efficace o non battono del tutto, per esempio nella sindrome delle ciglia immobili di Kartagener. Le ciglia colpite presentano disfunzioni o assenza delle braccia di dineina. I maschi sono tipicamente sterili per la mancanza di motilità degli spermatozoi e il 50% presenta il tubo digerente disposto in modo speculare rispetto alla norma (*situs inversus*), ciò è dovuto al fatto che esso ruota in direzione opposta durante le fasi precoci dello sviluppo. I difetti di motilità delle ciglia alterano la clearance del muco nelle vie aeree, comportando sinusite cronica e bronchiectasie. I difetti sensitivi delle ciglia comportano sindrome del rene policistico, anosmia e degenerazione retinica.

### Meccanismi di trasporto intraflagellare e intraciliare

Oltre alle proteine motrici coinvolte nel trasporto anterogrado e retrogrado, l'assemblaggio e il mantenimento delle ciglia e dei flagelli coinvolge la partecipazione di complessi proteici macromolecolari non

delimitati da membrana chiamati particelle IFT, localizzati lungo i microtubuli polarizzati dell'assonema al di sotto delle membrane ciliari e flagellari (si veda Scholey 2008). Le particelle IFT sono costituite da due sub-complessi proteici: IFT-A (necessario per il trasporto retrogrado di materiali dall'apice dell'assonema al corpo cellulare per il successivo turnover) e IFT-B (che partecipa al trasporto anterogrado intraciliare/intraflagellare dal corpo cellulare all'apice dell'assonema, una tappa essenziale per l'assemblaggio e il mantenimento di ciglia e flagelli). Il movimento delle proteine IFT lungo i microtubuli è catalizzato dalle proteine motrici chinesina-2 (verso l'apice ciliare; direzione anterograda) e dineina-2 citoplasmatica (verso il corpo cellulare; direzione retrograda). Un carico può contenere componenti dell'assonema, proteine della membrana ciliare/flagellare (tra cui il BBSoma, nome derivato dalla sindrome di Bardet-Biedl, una ciliopatia caratterizzata da obesità/retinopatia) e proteine ciliari di trasduzione del segnale. Per ulteriori approfondimenti sul BBSoma, si vedano Jin e Nachury (2009) e Ye et al. (2018). Per ulteriori approfondimenti sulla ciliogenesi si veda Baldari e Rosenbaum (2010), mentre per l'IFT si veda Hao e Scholey (2009).

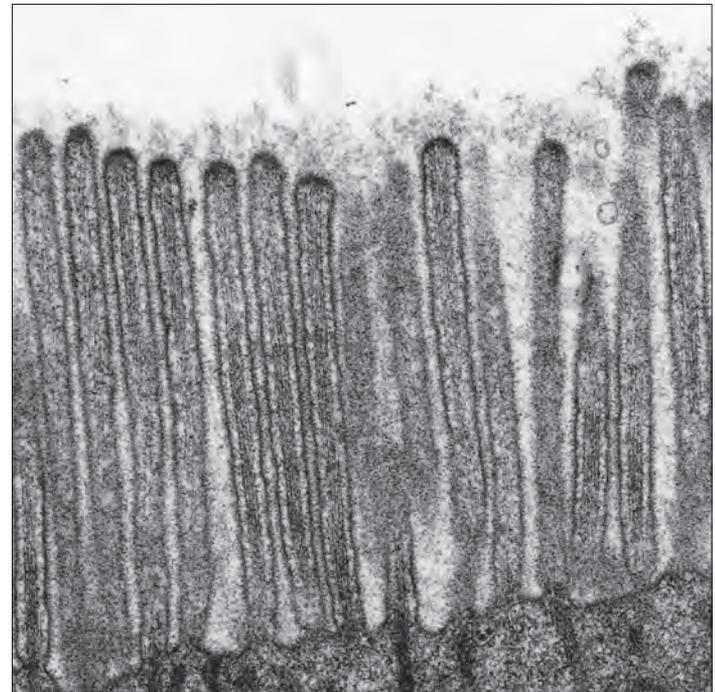
Il trasporto del BBSoma nelle ciglia si verifica in associazione con particelle IFT-B anterograde e particelle IFT-A retrograde.

### Microvilli

I microvilli sono estroflessioni digitiformi della superficie cellulare, in genere aventi un diametro di 0,1  $\mu\text{m}$  e una lunghezza fino a 2  $\mu\text{m}$  (Fig. 1.20).

Quando organizzati in serie regolari e parallele, come si verifica a livello delle superfici assorbenti degli enterociti epiteliali dell'intestino tenue e delle cellule epiteliali del tubulo contorto prossimale del nefrone nei reni, i microvilli acquisiscono un aspetto lanuginoso simile a quello delle setole di un pennello (a livello di microscopia ottica si parla di orletto a spazzola o orletto striato).

Sono ricoperti dalla membrana plasmatica e sostenuti internamente da fasci strettamente impacchettati di filamenti di actina legati fra loro dalle proteine che raggruppano in fasci l'actina, la fascina e la fimbrina. Altri ponti formati da miosina I e calmodulina connettono i fasci di



**Fig. 1.20** Microvilli sezionati longitudinalmente nell'orletto a spazzola di una cellula intestinale assorbente in un campione bioptico del duodeno umano. I filamenti di actina riempiono le parti centrali dei villi e si inseriscono nei citoplasmi apicali. Un evidente glicocalice (formato dai domini extracellulari delle glicoproteine della membrana plasmatica) appare come un rivestimento disomogeneo sulle estremità dei microvilli e tra i microvilli stessi; esso comprende enzimi implicati nella fase finale della digestione. (Per gentile concessione del Dr. Bart Wagner, Histopathology Department, Sheffield Teaching Hospitals, UK.)

filamenti alla membrana plasmatica. All'apice di ogni microvillo, le estremità libere di ogni microfilamento sono inserite in una massa densa che include la proteina villina. I fasci di filamenti di actina dei microvilli sono inseriti nel citoplasma apicale in un reticolo di filamenti di actina che corrono in senso trasversale e che sono stabilizzati dalla spettina a formare una trama terminale, sotto la quale si trovano i filamenti intermedi di cheratina. La trama è ancorata lateralmente alle giunzioni serrate\* (*tight junction*) e alla *zonula adherens* del complesso di giunzioni della porzione apicale dell'epitelio. La miosina II e la tropomiosina sono presenti anche nella trama terminale, il che può spiegarne l'attività contrattile.

I microvilli incrementano notevolmente l'area della superficie cellulare (fino a 40 volte), in particolare a livello dei siti di assorbimento attivo. Nell'intestino tenue, essi possiedono un rivestimento cellulare molto spesso o glicocalice, che riflette la presenza di glicoproteine integrali di membrana, tra cui gli enzimi connessi alla digestione e all'assorbimento. Anche i microvilli irregolari, detti filopodi, si ritrovano sulla superficie di molti tipi cellulari, in particolare dei macrofagi liberi e dei fibroblasti, dove possono essere associati alla fagocitosi e alla motilità cellulare. Per ulteriori approfondimenti sul citoscheletro dei microvilli, si veda Brown e McKnight (2010).

I microvilli lunghi e regolari sono detti stereociglia, un termine improprio, in quanto non sono mobili e sono privi di microtubuli. Una denominazione appropriata è stereovilli. Essi si trovano sulle cellule recettoriali cocleari e vestibolari, dove agiscono come trasduttori di stimoli sensoriali, nonché nell'epitelio assorbente dell'epididimo.

## Giunzioni intercellulari

La regione basolaterale della membrana plasmatica delle cellule epiteliali stabilisce rapporti giunzionali con le cellule adiacenti e con le componenti strutturali della matrice extracellulare. Le giunzioni intercellulari sono resistenti e dinamiche e prevengono la dissociazione dei tessuti nei loro componenti cellulari. Negli adulti, l'epidermide si oppone alle forze deformanti tramite l'interazione di due componenti delle giunzioni intercellulari, il citoscheletro giunzionale e le molecole di adesione cellulare (Fig. 1.21). La determinazione e il mantenimento della polarità cellulare in uno strato epiteliale, dipende da due strati apicali circolari, le giunzioni serrate e le *zonulae adherentes*, che decorrono parallelamente tra loro e si associano alla F-actina. Questi due strati controllano la permeabilità epiteliale e determinano la polarità delle cellule epiteliali. Il dominio cellulare apicale si trova sopra questi due strati, mentre il dominio cellulare basolaterale si trova sotto. I desmosomi (*maculae adherentes*), rappresentano una terza classe di meccanismi di adesione intercellulare di tipo spot-simile. Contrariamente alle giunzioni serrate e alle *zonulae adherentes*, i desmosomi non formano fasce, legandosi invece ai filamenti intermedi. Gli emidesmosomi, che ancorano le cellule epiteliali alla lamina basale, si legano anch'essi ai filamenti intermedi. Le *gap junction* sono peculiari: esse consentono una connessione diretta tra cellule adiacenti e non si legano al citoscheletro. Saranno dapprima considerati gli aspetti molecolari delle molecole di adesione cellulare, facendo riferimento successivamente al citoscheletro giunzionale per definire gli aspetti specifici strutturali e molecolari delle diverse giunzioni intercellulari.

### Molecole di adesione cellulare

Le molecole di adesione cellulare sono glicoproteine, transmembrana o ancorate alla membrana, che formano dei ponti nello spazio intercellulare, a partenza dalle membrane, per creare dei punti di adesione. Esistono numerosi sottogruppi molecolari che possono essere distinti innanzitutto in base alla loro dipendenza o meno dal calcio per la loro funzione. Le molecole di adesione cellulare calcio-dipendenti comprendono le caderine e le selectine. Le molecole di adesione calcio-indipendenti comprendono la superfamiglia simil-immunoglobulinica delle molecole di adesione cellulare (Ig-CAM) formata a sua volta da nectine e integrine, le sole molecole di adesione cellulare che constano di due subunità (subunità  $\alpha$  e  $\beta$ ).

### Molecole di adesione cellulare calcio-dipendenti: caderine e selectine

Le caderine sono glicoproteine transmembrana a passo singolo con cinque domini esterni altamente glicosilati che legano il calcio e un

dominio intracellulare che lega la catenina citoplasmatica. Le caderine sono proteine intracellulari che legano le caderine alla F-actina nella *zonula adherens*. Il segmento extracellulare delle caderine partecipa alle *trans*-interazioni omofiliche (tra cellule uguali) calcio-dipendenti in cui una molecola di caderina su una cellula si lega a una molecola identica di caderina su una cellula adiacente. Dopo il legame, le caderine si raggruppano lateralmente (*cis*-interazione) alle giunzioni intercellulari, a formare una struttura simile a una cerniera che rende stabile la giunzione serrata tra le cellule.

Diversi tipi cellulari possiedono differenti proteine che appartengono alla famiglia delle caderine, per esempio le caderine N nel tessuto nervoso, le caderine E negli epiteli, le caderine P nella placenta. Altri due membri della famiglia delle caderine sono le desmogleine e le desmocolline. Le caderine sono presenti nella *macula adherens* e nei desmosomi, ma non nelle giunzioni serrate, né negli emidesmosomi (si veda oltre). Le alterazioni dell'espressione delle caderine nell'epidermide determinano condizioni patologiche come bolle e ulcerazioni. Per ulteriori approfondimenti sulle caderine e sul citoscheletro loro associato, si veda Brieher e Yap (2013).

Analogamente alle caderine, le selectine sono calcio-dipendenti. Contrariamente alle caderine, tuttavia, le selectine non stabiliscono *trans*-interazioni omofiliche. Esse, invece, si legano a carboidrati e appartengono al gruppo delle lectine. Ciascuna selectina ha un dominio extracellulare per il riconoscimento dei carboidrati (CRD, Carbohydrate Recognition Domain), con affinità di legame per un oligosaccaride specifico legato a una proteina o a un lipide. La configurazione molecolare e l'affinità di legame del CRD alle porzioni glucidiche è calcio-dipendente. Le selectine partecipano alla distribuzione (*homing*) dei leucociti circolanti nei tessuti tramite la fuoriuscita dai vasi attraverso l'endotelio. Per ulteriori approfondimenti circa il significato e il meccanismo del rientro in sede (*homing*), si veda Girard et al. (2012).

I tre principali tipi di selectina sono la L-selectina (per i linfociti), la E-selectina (per le cellule endoteliali) e la P-selectina (per le piastrine).

### Molecole di adesione cellulare calcio-indipendenti: Ig-CAM, nectine e integrine

Le Ig-CAM sono glicoproteine della superficie cellulare con un dominio extracellulare caratterizzato da un numero variabile di anse simil-immunoglobuliniche. La maggior parte delle Ig-CAM ha un dominio transmembrana; altre aderiscono alla superficie cellulare mediante un sistema di ancoraggio rappresentato dal glicosilfosfatidil inositolo (GPI). Come le caderine, le Ig-CAM stabiliscono interazioni omofiliche contribuendo all'adesione cellula-cellula, sebbene con modalità calcio-indipendenti. L'estremità citoplasmatica delle Ig-CAM interagisce anche con componenti del citoscheletro come F-actina, anchirine e spettina. Le Ig-CAM possono legare direttamente o indirettamente recettori per fattori di crescita e controllarne l'internalizzazione.

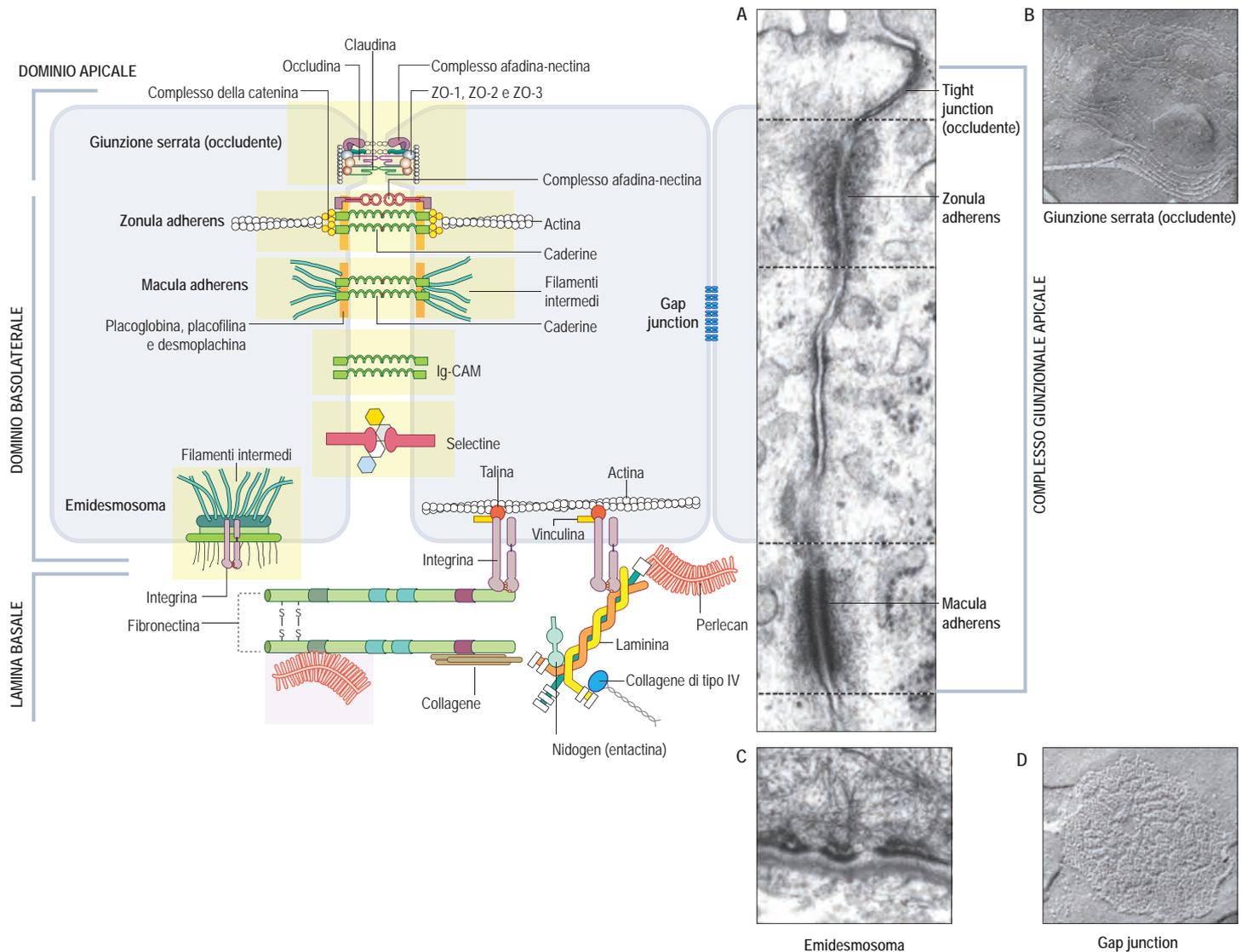
Diversi tipi sono espressi nei diversi tessuti. Le molecole di adesione delle cellule neurali (N-CAM) si ritrovano su vari tipi cellulari ma sono espresse soprattutto da cellule neurali. Le molecole di adesione intercellulare (ICAM) sono espresse sulle cellule endoteliali dei vasi. Il legame della molecola di adesione cellulare è prevalentemente omofilo, sebbene talora di tipo eterofilo, come per esempio nel caso della molecola di adesione intercellulare vascolare (VCAM), che può legarsi alle integrine.

Le nectine e le molecole nectino-simili (Nectin-like molecules) sono membri della superfamiglia delle Ig-CAM (per ulteriori approfondimenti sulle nectine e sulle Necl, si veda Takai et al. 2008). Esse hanno un dominio extracellulare con tre anse immunoglobuline-simili, un segmento transmembrana e una coda citoplasmatica. Le nectine e le Necl comprendono, rispettivamente, quattro e cinque membri. Questi sono presenti nelle giunzioni serrate a fascia e nella *zonula adherens*.

Il complesso nectina-afadina inizia la formazione di una *zonula adherens*; dopo che sono avvenuti i contatti cellula-cellula tra cellule adiacenti, vengono reclutate le caderine in questi siti di contatto. L'afadina e l' $\alpha$ -catenina interagiscono tra loro e anche con la F-actina attraverso proteine adattatrici.

Le integrine mediano le interazioni cellula-matrice extracellulare e cellula-cellula, e integrano segnali extracellulari con il citoscheletro e con vie cellulari di trasmissione dei segnali. Le integrine, potendo essere attivate da proteine che si legano ai loro domini extra- o intracellulari, possono agire in modo bidirezionale, trasmettendo informazioni dall'esterno all'interno della cellula (segnali provenienti dall'ambiente

\*In altri Capitoli si farà riferimento a queste strutture con il termine inglese *tight junction*.



**Fig. 1.21** Giunzioni intercellulari: il complesso giunzionale apicale e altre specializzazioni giunzionali, con indicazione delle componenti proteiche di ciascuna giunzione e della lamina basale. Una rete anastomotica di contatti tra membrane cellulari adiacenti forma una giunzione serrata occludente. La membrana plasmatica basale è ancorata alla lamina basale in corrispondenza di un emidesmosoma. In una *gap junction*, numerosi canali (pori facenti parte del connesone) sono raggruppati a formare una regione giunzionale simile a una placca tra membrane plasmatiche adiacenti. **(A)** e **(C)** sono microfotografie elettroniche a trasmissione; **(B)** e **(D)** sono preparati con la tecnica del *freeze fracture*. **A.** Un complesso giunzionale apicale. **B.** Una giunzione serrata. **C.** Un emidesmosoma. **D.** Una *gap junction*. (B. Per gentile concessione del Dr. Andrew Kent, King's College London. D. Per gentile concessione del Prof. Dieter Hüsler, University of Stuttgart. A. e C. Da tessuto umano, per gentile concessione del Dr. Bart Wagner, Histopathology Department, Sheffield Teaching Hospitals, UK. Figura adattata con permesso da Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. 3rd ed.: Elsevier, Mosby. Copyright 2011.)

extracellulare) oppure dall'interno all'esterno della cellula (segnali provenienti dall'ambiente intracellulare). La famiglia delle integrine comprende subunità  $\alpha$  e subunità  $\beta$  che formano eterodimeri transmembrana. La sequenza aminoacidica arginina-glicina-acido aspartico, o sequenza RGD, sui ligandi bersaglio (come fibronectina, laminina e altre proteine della matrice extracellulare), ha affinità di legame per il sito legante posizionato all'estremità extracellulare delle integrine. Per ulteriori approfondimenti sulle proprietà delle integrine e dei loro ligandi, si veda Barczyk et al. (2010).

### Giunzioni intercellulari specializzate

Le giunzioni intercellulari specializzate rappresentano il carattere distintivo di tutti i tessuti epiteliali. Ne esistono due categorie principali: le giunzioni simmetriche e le giunzioni asimmetriche. Le giunzioni simmetriche possono essere suddivise in tre tipi: giunzioni serrate (anche note come giunzioni occludenti o *zonulae occludentes*); giunzioni aderenti (o di ancoraggio) (che comprendono *zonulae adherentes* o

desmosomi a fascia [*belt desmosomes*], e *maculae adherentes* o desmosomi a macchia [*spot desmosomes*]); e giunzioni comunicanti, rappresentate dalla *gap junction*. Le giunzioni serrate e le giunzioni aderenti sono componenti del complesso giunzionale apicale. Gli emidesmosomi sono giunzioni asimmetriche (si veda Fig. 1.21).

### Giunzioni serrate (giunzioni occludenti, *zonulae occludentes*)

Le giunzioni serrate sono la componente più apicale del complesso giunzionale apicale. Le funzioni principali delle giunzioni serrate sono la regolazione della permeabilità paracellulare dello strato epiteliale e la formazione di una barriera alla diffusione intramembrana apicale-basolaterale, il carattere distintivo della polarità della cellula epiteliale. Le giunzioni serrate formano una fascia continua (*zonula*) intorno al perimetro cellulare, in prossimità del dominio apicale delle cellule epiteliali e sono connesse all'actina del citoscheletro. In corrispondenza delle giunzioni serrate, le membrane cellulari delle cellule adiacenti rimangono in stretto contatto, per cui lo spazio tra esse è annullato.

L'osservazione con il microscopio elettronico di preparati ottenuti con la tecnica del *freeze fracture*, evidenzia che il contatto tra queste membrane corrisponde a filamenti proteici ramificati e anastomotici ad azione sigillante, situati sulla superficie P (protoplasmatica) del doppio strato lipidico (Figg. 1.21A-B). Una giunzione serrata consta di numerose proteine: occludine e claudine, membri della famiglia delle proteine tetraspanine, dotate di quattro domini transmembrana, due anse e due code citoplasmatiche (occludine e tetraspanine sono le molecole utilizzate per la formazione dei filamenti ramificati e anastomotici che si osservano nei preparati ottenuti con la tecnica del *freeze fracture*); il complesso afadina-nectina e le molecole di adesione giunzionale (JAM, Junctional Adhesion Molecules), che formano ciascuna *cis*-omodimeri e che interagiscono tra loro tramite i loro domini extracellulari formando *trans*-omodimeri (le nectine e le JAM sono membri della superfamiglia delle immunoglobuline e la componente afadina del complesso afadina-nectina interagisce con la F-actina); e le proteine della *zonula occludens* citoplasmatica 1, 2 e 3 (ZO-1, ZO-2 e ZO-3). La proteina ZO-1 si associa all'afadina e al dominio intracellulare delle JAM. Tutte e tre le proteine ZO facilitano l'interazione reciproca di occludine, claudine e JAM con la F-actina. I difetti della permeabilità paracellulare al magnesio e del suo riassorbimento renale si verificano in caso di mutazioni a carico della claudina 16 e della claudina 19 (perdita renale del magnesio). Per ulteriori approfondimenti sulle claudine, si veda Escudero-Esparza et al. (2011). Per ulteriori approfondimenti sulle JAM, si veda Bazzoni (2003).

### Giunzioni aderenti

Contrariamente alle giunzioni serrate, le *zonulae adherentes* e le *maculae adherentes* sono caratterizzate dalla presenza, lungo i lati citoplasmatici della membrana cellulare delle cellule epiteliali adiacenti, di placche dense simmetriche, connesse tra loro, attraverso gli spazi intercellulari, tramite le caderine. Esse differiscono in quanto la F-actina si associa alle placche delle *zonulae adherentes* e i filamenti intermedi si connettono alle placche delle *maculae adherentes*.

### Zonula adherens (desmosoma a fascia)

Una *zonula adherens* è una zona di adesione continua, simile a una fascia, parallela e situata proprio alla base di una giunzione serrata, nonché disposta tutto intorno al perimetro apicale delle cellule epiteliali. Le molecole di adesione cellulare calcio-dipendenti (membri delle famiglie caderiniche della desmogleina e della desmocollina) sono le componenti fondamentali di una *zonula adherens*.

Oltre al complesso caderina-catenina, una *zonula adherens* ospita anche il complesso afadina-nectina.

Una componente specifica della *zonula adherens* è una placca citoplasmatica densa, adesa al lato citoplasmatico della membrana cellulare. Essa è formata dalle proteine desmoplachina, placofilina e placoglobina (quest'ultima nota anche come  $\gamma$ -catenina). Una placca simile è presente nella *macula adherens* o desmosoma a macchia, *spot desmosome* (si veda oltre).

### Fascia adherens

Una *fascia adherens* è simile a una *zonula adherens*, ma è meno estesa e forma una striscia o una placca di adesione, per esempio tra le cellule muscolari lisce, nei dischi intercalari delle cellule muscolari cardiache, e tra cellule gliali e neuroni. Le giunzioni coinvolgono caderine legate indirettamente a filamenti di actina sul lato interno della membrana.

### Desmosomi (maculae adherentes)

I desmosomi sono piccole aree di connessione intercellulare particolarmente forte, a forma di placca. Nelle cellule epiteliali possono essere localizzati sotto giunzioni serrate e *zonulae adherentes* a fascia, formando insieme a queste il complesso giunzionale apicale (si veda Fig. 1.21A). Lo spazio intercellulare misura circa 25 nm; è riempito di materiale filamentoso elettrondenso (le caderine intercellulari), disposto trasversalmente rispetto allo spazio stesso, ed è anche caratterizzato da una serie di bande densamente colorate (le placche citoplasmatiche dense) che decorrono parallelamente alle superfici cellulari. L'adesione è mediata da caderine calcio-dipendenti, desmogleine e desmocolline. All'interno delle cellule, su ciascun lato, ogni placca citoplasmatica densa si trova sotto la membrana cellulare ed è formata dalle proteine placofilina, desmoplachina e placoglobina ( $\gamma$ -catenina), nelle quali sono inserite le estremità dei filamenti intermedi. Il tipo di filamenti

intermedi dipende dal tipo cellulare, per esempio le cheratine si osservano negli epitelii e i filamenti di desmina nelle fibre muscolari cardiache. I desmosomi formano punti di legame forte, simili a saldature, fra cellule sottoposte a stress meccanici, per esempio nello strato spinoso dell'epidermide, dove infatti i desmosomi sono estremamente grandi e numerosi.

### Emidesmosomi

Gli emidesmosomi sono giunzioni aderenti asimmetriche che si trovano tra il versante basale delle cellule epiteliali e la lamina basale a esso associata. Quest'ultima è una componente della membrana basale e contiene laminina, un ligando dell'integrina. L'altra componente della membrana basale è la lamina reticolare, uno strato contenente collagene prodotto dai fibroblasti e fibronectina, un altro ligando dell'integrina. Gli emidesmosomi assomigliano a un desmosoma monolateralizzato, ancorato da un lato alla membrana cellulare e dall'altro alla lamina basale e alle fibrille collagene adiacenti (si veda Fig. 1.21C). La placca ha proteine distinte che non si osservano nelle placche della *zonula adherens* o della *macula adherens*: antigene 1 del pemfigoide bolloso (BPAG1, Bullous Pemphigoid AntiGen 1), un membro della famiglia delle plachine, e antigene 2 del pemfigoide bolloso (BPAG2, Bullous Pemphigoid AntiGen 2), che possiede un dominio extracellulare di collagene. BPAG1 e BPAG2 sono stati inizialmente osservati in pazienti con pemfigoide bolloso, una malattia bollosa autoimmunitaria. Sul versante citoplasmatico della placca densa vi è una piastra meno densa in cui sono inseriti filamenti di cheratina, che qui interagiscono con la proteina plectina associata all'integrina  $\alpha 6 \beta 4$ . Gli emidesmosomi utilizzano integrine e filamenti di ancoraggio (laminina-5) come molecole di adesione ancorate alla lamina basale, mentre i desmosomi utilizzano le caderine.

### Placche di adesione focale

Strutture di adesione meno finemente strutturate, con organizzazioni similari, si osservano tra molti altri tipi cellulari e la matrice circostante, per esempio tra cellule muscolari lisce e le fibrille della matrice e tra le estremità delle cellule muscolari scheletriche e le fibre tendinee. Le più piccole, le adesioni puntiformi, assomigliano a placche focali di adesione, che sono aree locali di adesione tra cellule e matrice extracellulare. Esse sono localizzate tipicamente alle estremità dei fasci di actina o in loro prossimità (fibre di stress), ancorate tramite proteine intermedie ai domini citoplasmatici delle integrine. A loro volta, queste sono attaccate, in corrispondenza delle loro estremità esterne, al collagene o ad altre strutture filamentose della matrice extracellulare. Le placche, in genere, hanno vita breve; la loro formazione e la loro conseguente distruzione rappresentano un aspetto della motilità delle cellule migranti. Per ulteriori approfondimenti sulle adesioni focali, si veda Geiger et al. (2009).

### Gap junction (giunzioni comunicanti)

Le *gap junction* assomigliano, in sezione trasversale, alle giunzioni serrate, ma i due doppi strati lipidici opposti sono separati da uno spazio apparente di 3 nm, attraversato a ponte da un gruppo di canali trans-membrana (i connessioni). Ciascun connesone è formato da un anello di sei proteine dette connesine, le cui superfici esterne incontrano quelle delle cellule adiacenti nella zona centrale. Un piccolo poro centrale connette una cellula a quella vicina (si veda Fig. 1.21D). Insieme più ampi di molte migliaia di canali sono spesso organizzati in schiere esagonali. Le *gap junction* si ritrovano tra numerose cellule, tra cui epatociti e cardiomiociti.

## INVECCHIAMENTO, SENESCENZA CELLULARE, CANCRO E APOPTOSI

L'invecchiamento è un aspetto universale degli organismi viventi, definito come un declino graduale nel tempo delle funzioni cellulari e tissutali che spesso, ma non sempre, riduce la longevità di un individuo. I caratteri distintivi dell'invecchiamento sono presentati nella rassegna di Kubben e Misteli (2017).

La senescenza cellulare è definita come un arresto irreversibile della proliferazione cellulare quando le cellule presentano un danno nel DNA telomero e a una riduzione dei segnali mitogeni. Contrariamente alle cellule arrestate in modo reversibile nello stato di quiescenza  $G_0$  del ciclo

cellulare, l'arresto della crescita proprio della senescenza è irreversibile; le cellule in questa condizione non possono essere stimolate a proliferare da stimoli noti e non possono essere indotte a rientrare nel ciclo cellulare con meccanismi fisiologici. Per ulteriori approfondimenti su senescenza e ciclo cellulare, si veda Chandler e Peters (2013). Le cellule senescenti possono causare o favorire malattie degenerative. Nell'uomo, in età avanzata la senescenza cellulare determina patologie caratteristiche, come aterosclerosi che determina ictus, osteoporosi, degenerazione maculare, insufficienza cardiorespiratoria e renale, e malattie neurodegenerative come la malattia di Alzheimer e la malattia di Parkinson.

Le cellule senescenti vanno incontro a cambiamenti dell'espressione genica, che determinano la secrezione di citochine proinfiammatorie, fattori di crescita e proteasi, attività che nel complesso definiscono un fenotipo secretorio associato alla senescenza in grado di indurre angiogenesi, risposte infiammatorie, proliferazione e differenziazione di cellule staminali, e che può anche determinare resistenza alla chemioterapia del cancro. Le cellule senescenti possono essere identificate istochimicamente per la loro espressione di  $\beta$ -galattosidasi associata alla senescenza, un marcatore lisosomiale che è sovraespresso in queste cellule, o della proteina oncosoppressoria p16<sup>INK4a</sup>, che promuove la formazione di cromatina associata alla senescenza. Per ulteriori approfondimenti su invecchiamento, senescenza cellulare e cancro, si veda Campisi (2013).

La senescenza cellulare può essere causata da alterazioni delle vie di trasmissione dei segnali metabolici, derivanti da mitogeni o fattori proliferativi, e dall'attivazione di oncosoppressori, associate ad accorciamento dei telomeri e a danno genomico. Per ulteriori approfondimenti, si vedano Sahin e DePinho (2012) e Kubben e Misteli (2017).

La senescenza cellulare blocca l'oncogenesi in quanto la proliferazione cellulare è necessaria per lo sviluppo del cancro. Comunque, le cellule senescenti possono stimolare la proliferazione e la progressione verso la malignità di cellule adiacenti premaligne tramite il rilascio di stimoli oncogeni inducenti senescenza. Le cellule cancerose devono essere portatrici di mutazioni per prevenire la senescenza telomerica-dipendente e oncogene-indotta, come nelle vie della proteina p53 e della proteina p16 del retinoblastoma. Per ulteriori approfondimenti sulla patogenesi dell'invecchiamento prematuro e delle malattie associate all'invecchiamento, si veda Kubben e Misteli (2017).

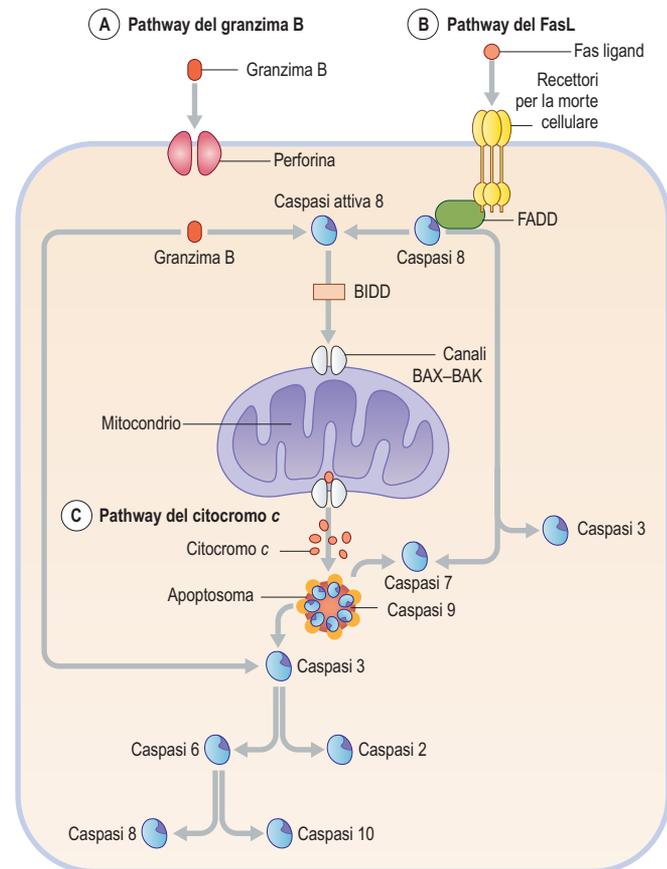
## Apoptosi

Le cellule muoiono in conseguenza sia del danno tissutale (necrosi) sia dell'attivazione interna di un programma "suicida" (apoptosi) in risposta a segnali intrinseci o estrinseci. L'apoptosi (morte cellulare programmata) può essere definita come la distruzione controllata di costituenti cellulari e l'assunzione dei frammenti cellulari apoptotici da parte di altre cellule per prevenire risposte immunitarie. Alcune cellule senescenti diventano resistenti ai segnali di morte cellulare, cioè sono resistenti all'apoptosi. In effetti, la senescenza blocca la crescita di cellule danneggiate o sotto stress, mentre l'apoptosi le elimina rapidamente. L'apoptosi è un meccanismo centrale nel controllo dello sviluppo di organismi multicellulari. Durante la morfogenesi, essa media attività come la separazione delle dita durante lo sviluppo e svolge un ruolo importante nella regolazione del numero di neuroni del sistema nervoso (la maggior parte dei neuroni muore durante lo sviluppo). L'apoptosi assicura anche l'eliminazione di cellule T inappropriate o inefficaci, nel timo durante la selezione clonale.

I cambiamenti morfologici che si hanno nelle cellule necrotiche sono molto diversi da quelli che si riscontrano nelle cellule apoptotiche. Le cellule necrotiche si rigonfiano e quindi si rompono e i detriti che ne derivano possono indurre una risposta infiammatoria. Le cellule apoptotiche si contraggono, i loro nuclei e cromosomi vanno incontro a frammentazione, formando i corpi apoptotici, e le loro membrane plasmatiche presentano cambiamenti conformazionali che funzionano come un segnale per i fagociti locali. Le cellule morte vengono rimosse rapidamente e, poiché il loro contenuto intracellulare non è rilasciato nell'ambiente extracellulare, si evitano le reazioni infiammatorie; inoltre, i frammenti apoptotici stimolano i macrofagi a rilasciare citochine antinfiammatorie.

L'apoptosi e la proliferazione cellulare sono strettamente collegate; molti regolatori del ciclo cellulare possono influenzare sia la divisione cellulare sia l'apoptosi. I segnali che innescano l'apoptosi includono l'allontanamento di fattori trofici o l'esposizione a stimoli proliferativi

inappropriati. Sono state evidenziate tre modalità principali di induzione dell'apoptosi (Fig. 1.22). Due, la via del Fas ligand (FasL) e la via del granzima B, sono estrinseche, mentre una, la via mitocondriale, è intrinseca. La via del FasL comporta il legame del FasL a recettori per la morte cellulare presenti sulla membrana plasmatica e il reclutamento di proteine adattatrici, come la proteina FADD (Fas-Associated Death-Domain), seguito dal reclutamento e dall'attivazione della caspasi 8. La via del granzima B implica la formazione di un canale nella membrana cellulare, la perforina, che consente al granzima B caspasi-simile di entrare nella cellula. La via intrinseca mitocondriale comporta il rilascio di citocromo *c* (dallo spazio interposto tra le membrane mitocondriali interna ed esterna) nel citosol. Le vie estrinseche e la via intrinseca cooperano alla successiva attivazione di una famiglia di proteasi iniziatrici/effettrici note come caspasi (proteasi cisteina acido aspartico specifiche), presenti nelle cellule normali come precursori enzimatici inattivi o zimogeni. L'attivazione delle caspasi 3, 6 e 7 media l'apoptosi avviando



**Fig. 1.22** Attivazione della via delle caspasi durante l'apoptosi. **A.** La via estrinseca del granzima B attiva la caspasi 8 e la caspasi 3 in seguito all'ingresso del granzima B attraverso la perforina, una proteina che forma un poro nella membrana plasmatica. Questa via si osserva nelle cellule T citotossiche o nelle cellule natural killer per l'immissione della proteasi granzima B nella cellula bersaglio. **B.** La via estrinseca del Fas ligand (FasL) è innescata dal legame di FasL ai cluster di recettori transmembrana per la morte cellulare, i quali reclutano proteine adattatrici come la proteina FADD (Fas-Associated Death-Domain) in corrispondenza del loro dominio intracellulare. Questa proteina, a sua volta, recluta e aggrega molecole di caspasi 8, che diventano attivate. La caspasi 8 attivata attiva la caspasi 7 e la caspasi 3. **C.** La via intrinseca del citocromo *c* è innescata quando il granzima B, o la caspasi 8 attivata, determina il clivaggio proteolitico della proteina BIDD (BH3-Interacting Domain Death agonist), che entra nel mitocondrio tramite il canale proteico BAX-BAK (BCL-2 Associated X protein-BCL-2 Antagonist Killer), situato sulla membrana mitocondriale esterna, causando il rilascio di citocromo *c*. Il citocromo *c* favorisce l'assemblaggio dell'apoptosoma, formato da sette molecole di APAF1 (Apoptosis Protease-Activating Factor-1) e sette molecole di caspasi 9, il quale a sua volta attiva la caspasi 3 e la caspasi 7. Infine, l'attivazione proteolitica a cascata di caspasi 6, caspasi 2, caspasi 8 e caspasi 10 determina la distruzione cellulare.

una cascata di processi degenerativi a carico dei costituenti principali del citoscheletro cellulare, determinando la formazione di estroflessioni di membrana (*blebbing*), un aspetto distintivo dell'apoptosi causato dalla confluenza di frammenti citoplasmatici e nucleari nei corpi apoptotici in via di formazione. L'azione litica delle caspasi inattiva molti sistemi che normalmente promuovono la riparazione dei danni e che sostengono la vitalità cellulare, e attiva un certo numero di proteine che promuovono la morte e la disaggregazione della cellula. Per ulteriori approfondimenti sull'apoptosi, si veda Taylor et al. (2008).

### Meccanismi proteolitici intracellulari

La degradazione intracellulare di organuli e proteine residue o malripiegate può essere mediata dalla via dell'autofagia, dalla via dell'ubiquitina-proteasoma e dalla via di *signalling* della mitofagia. La via dell'autofagia coinvolge il sequestro di componenti citoplasmatiche all'interno di autofagosomi. È probabile che una disfunzione progressiva dei meccanismi di autofagia porti a invecchiamento della cellula. La via dell'ubiquitina-proteasoma utilizza una struttura catalitica composta da diverse subunità, definita proteasoma 26S, che riconosce le proteine ubiquitinate destinate alla degradazione. Questa via è responsabile della degradazione di proteine che hanno già svolto la loro funzione specifica (per esempio, cicline specifiche durante il ciclo cellulare) o di proteine che si sono ripiegate in modo non corretto a causa di una traduzione difettosa o perché codificate da geni difettosi. La via di *signalling* della mitofagia elimina specificamente i mitocondri danneggiati al fine di mantenere la normale funzione delle cellule.

La via dell'apoptosi è coinvolta nel turnover dell'intera cellula. Mentre l'apoptosi e la via dell'ubiquitina-proteasoma hanno luogo nel citosol, l'autofagia si verifica entro un compartimento sigillato, l'autofagosoma, con l'intervento dei lisosomi. La presenza di difetti nella funzione mitocondriale è responsabile di reazioni di stress ossidativo e di specifici disturbi neurodegenerativi, come alcune forme familiari della malattia di Parkinson.



**VIDEO** sul sito [www.studenti33.it/gray42](http://www.studenti33.it/gray42)

**Video 1.1** Mitosi in una cellula con cromosomi e microtubuli fluorescenti.

### Riferimenti chiave

Bray D 2001 Cell Movements. New York: Garland.

*A comprehensive presentation of the structural and molecular features of the cytoskeleton, including its properties and behaviour in cell and organelle movement in living cells.*

Burke B, Stewart CL 2013 The nuclear lamins: flexibility in function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:13–24.

*An up-to-date, detailed description of the nuclear lamina and its major components, lamins, members of the intermediate filament protein family.*

Chinnery PE, Hudson G 2013 Mitochondrial genetics. *Br Med Bull* 106:135–59.

*A detailed survey of the involvement of mitochondrial DNA (mtDNA) defects in human disease, with a specific focus on the mechanisms controlling mtDNA inheritance.*

Girard JP, Moussion C, Förster R 2012 HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 12:762–73.

*A comprehensive description of the continuous trafficking of immune cells across the vascular endothelium (homing) engaging cell adhesion molecules.*

Kierszenbaum AL, Tres LL 2019 Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology. Philadelphia: Elsevier.

*An integrated visual view of histology, cell biology and basic pathology focused on structure and function, including human pathological examples from a molecular viewpoint.*

Kubben N, Misteli T 2017 Shared molecular and cellular mechanisms of premature ageing and ageing-associated diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18:595–609.

*A review of recent advances in the pathogenesis of ageing, defined by a gradual loss of physiological integrity leading to major human pathological conditions. Defects in genetic, epigenetic and metabolic pathways; mitochondrial and protein homeostasis; cell cycle; and stem cell-regenerative capacity are considered.*

Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J, et al 2016 Cell Biology. Philadelphia: Elsevier.

*A detailed and comprehensive account of structural and molecular aspects of cell biology, including abnormalities related to human disease.*

Porter RM, Lane EB 2003 Phenotypes, genotypes and their contribution to understanding keratin function. *Trends Genet* 19:278–85.

*A correlation of human epithelial pathological conditions with mouse mutant studies focused on keratin diversity required for cells to attune to mechanical and biochemical signalling.*

Saftig P, Klumperman J 2009 Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:623–35.

*The participation of lysosomes in the degradation of extracellular material internalized by endocytosis and lysosomal sorting pathways, reviewed within the context of human diseases resulting from defective lysosomal biogenesis.*

Ye F, Nager AR, Nachury MV 2018 BBSome trains remove activated GPCRs from cilia by enabling passage through the transition zone. *J Cell Biol* 217:1847–68.

*The active transport of proteins inside cilia, designated intraflagellar transport (IFT), is powered by microtubule motors moving along axonemal microtubules and by proteins selected for ciliary exit.*