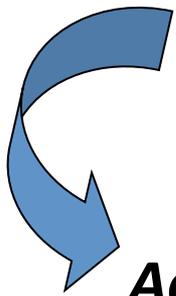


Citoesqueleto

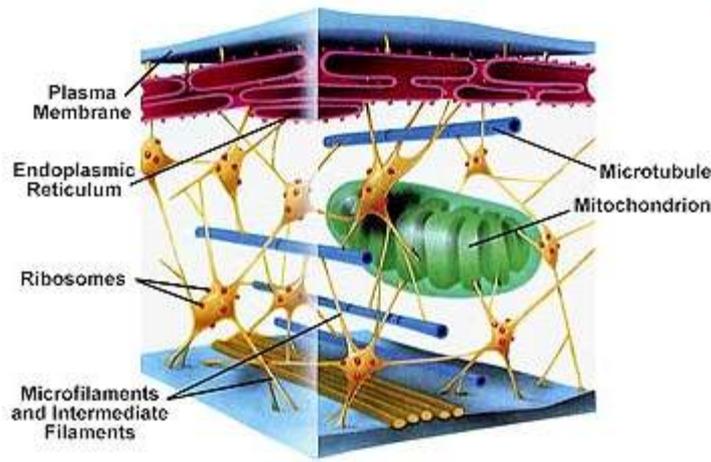
Biologia Molecular e Celular II - 2018

Citoesqueleto

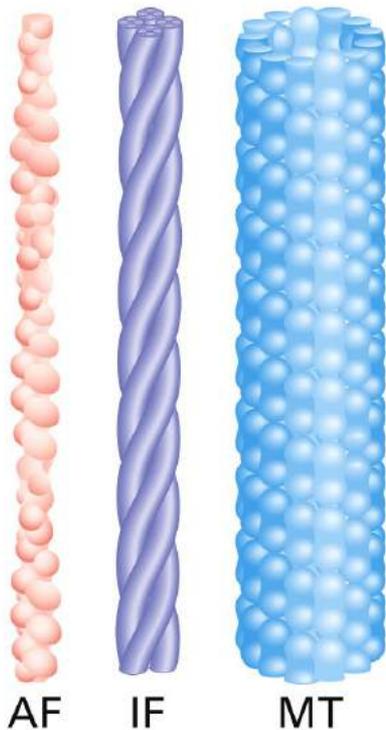
- Organização dos componentes celulares
- Interação mecânica com o ambiente = forma
- Movimentos coordenados
- Direcionamento do trânsito intracelular
- Separação cromossômica na mitose



Ações dependentes do citoesqueleto



Componentes do citoesqueleto: *filamentos proteicos*

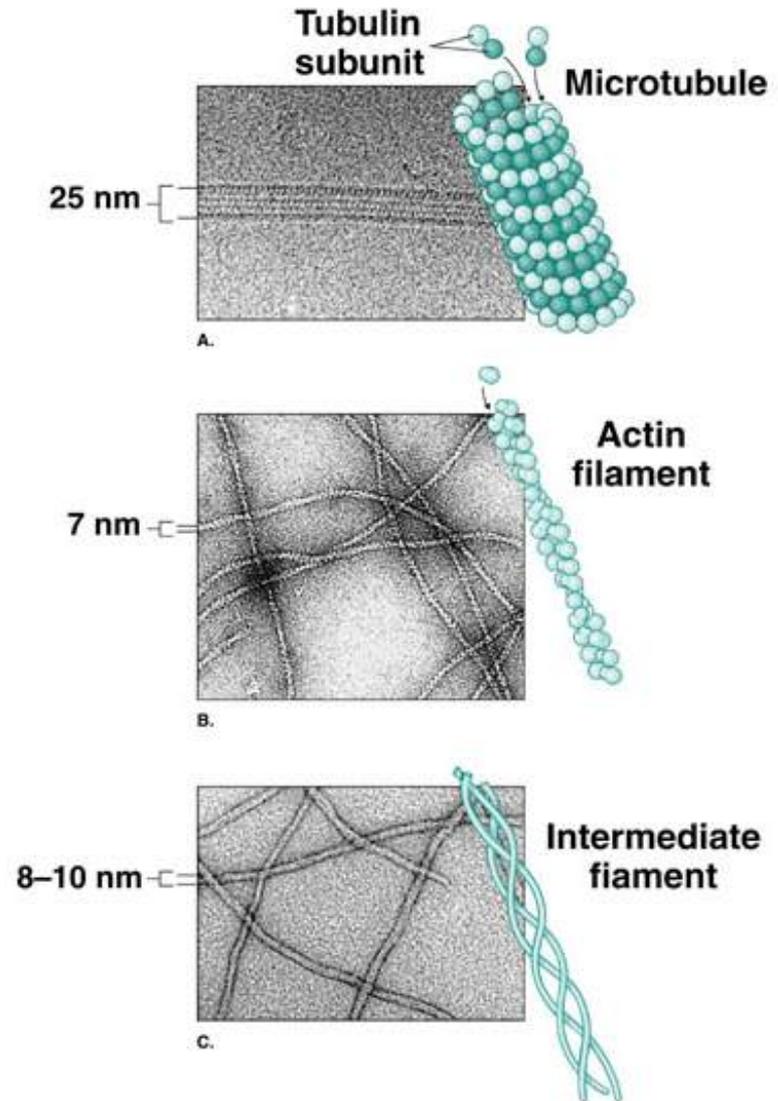


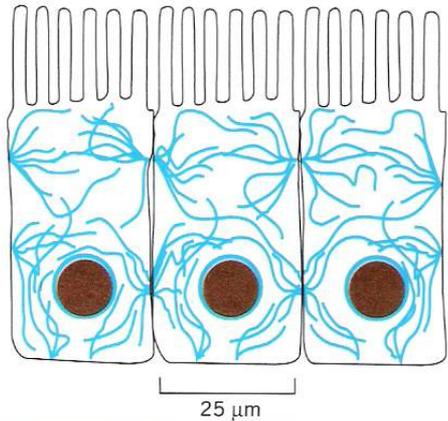
MT = microtúbulos

IF = filamentos intermediários

AF = filamentos de actina

Tobin/Dusheck, Asking About Life, 2/e
Figure 4.16

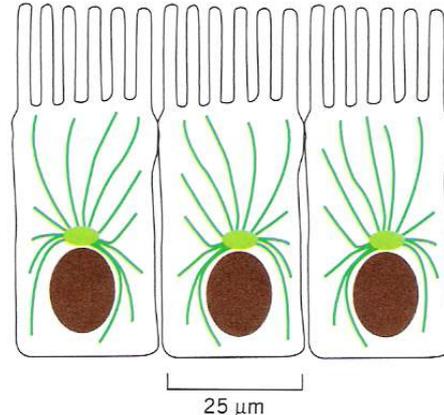




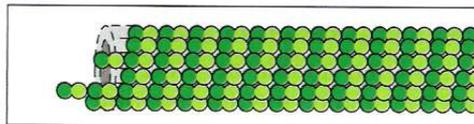
FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS



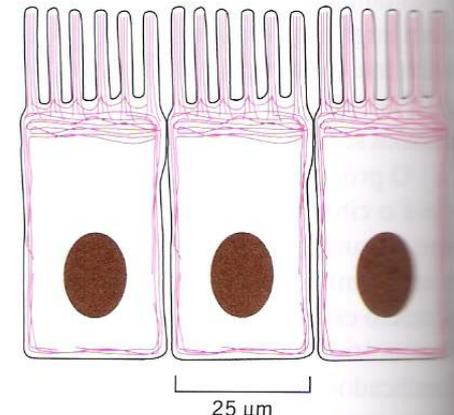
25 nm



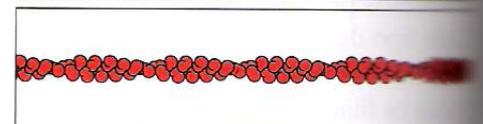
MICROTÚBULOS



25 nm



FILAMENTOS DE ACTINA



25 nm

Distribuição dos filamentos do citoesqueleto em células eucarióticas epiteliais do intestino

Filamentos do Citoesqueleto: características

- Formados por subunidades pequenas;
 - permitem associação e distribuição rápidas
- Mantidos por interações fracas;
- Associam-se com proteínas acessórias
 - estas regulam sua distribuição espacial e comportamento dinâmico.

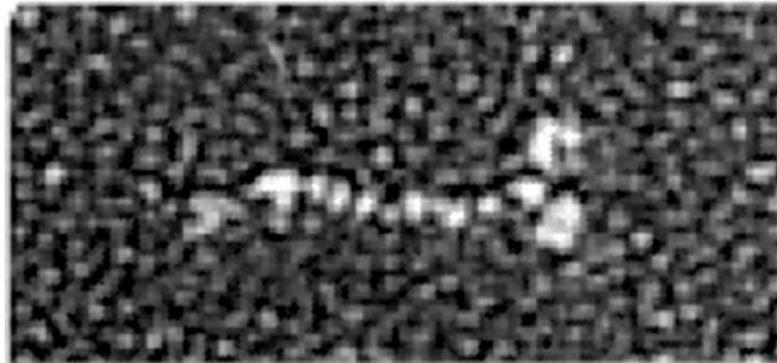
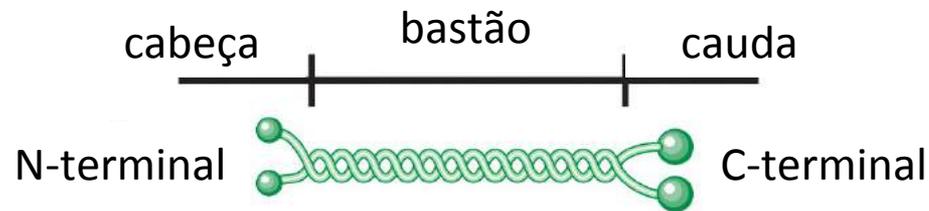
Filamentos intermediários

- “intermediários” em referência ao diâmetro; não polarizados;
- Encontrados no **citoplasma** em céls. de alguns animais (vertebrados, moluscos e nematódeos) e **lâmina nuclear** em eucariotos em geral (metazoários), **não aparecem em fungos e plantas.**

No genoma humano são codificados por mais de 70 genes diferentes

Estrutura das proteínas que formam os filamentos intermediários

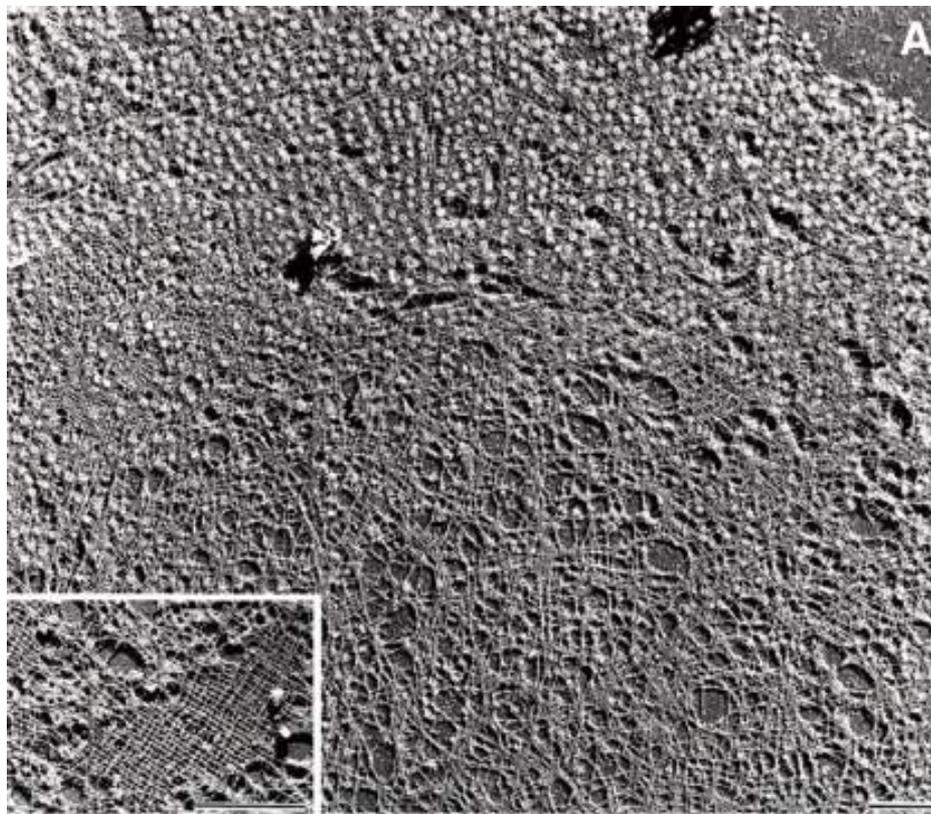
Definem-se pela presença de um domínio central conservado, flanqueado por domínios N e C-terminais variáveis.



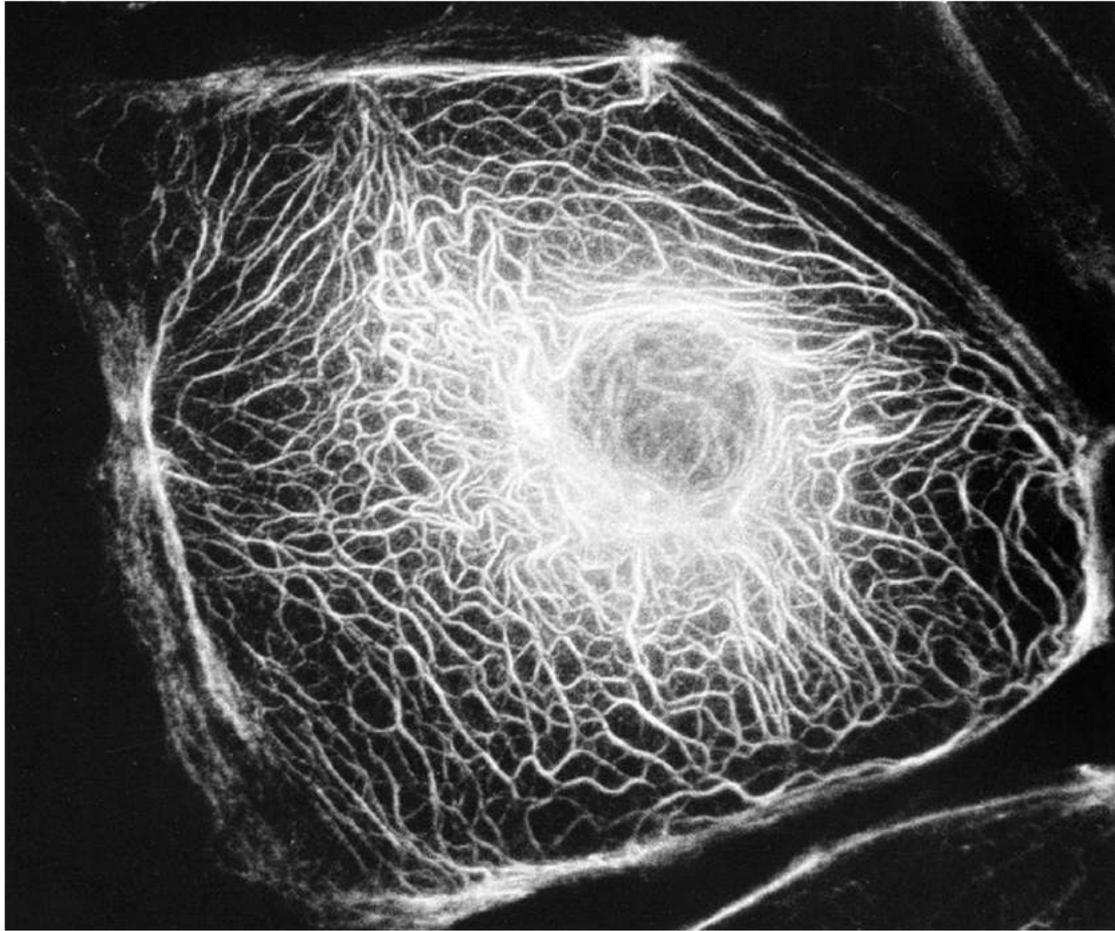
Dímero de filamento intermediário com caudas globulares e domínio central α -hélice **conservado**.

Filamentos intermediários

- No citoplasma: dão **resistência mecânica** à tensão; Estendem-se à periferia da cél., ancorando junções cél-cél.;
- Formam a ***lâmina nuclear***: rede que reveste a membrana interna do núcleo, ancorando cromossomos e poros nucleares.



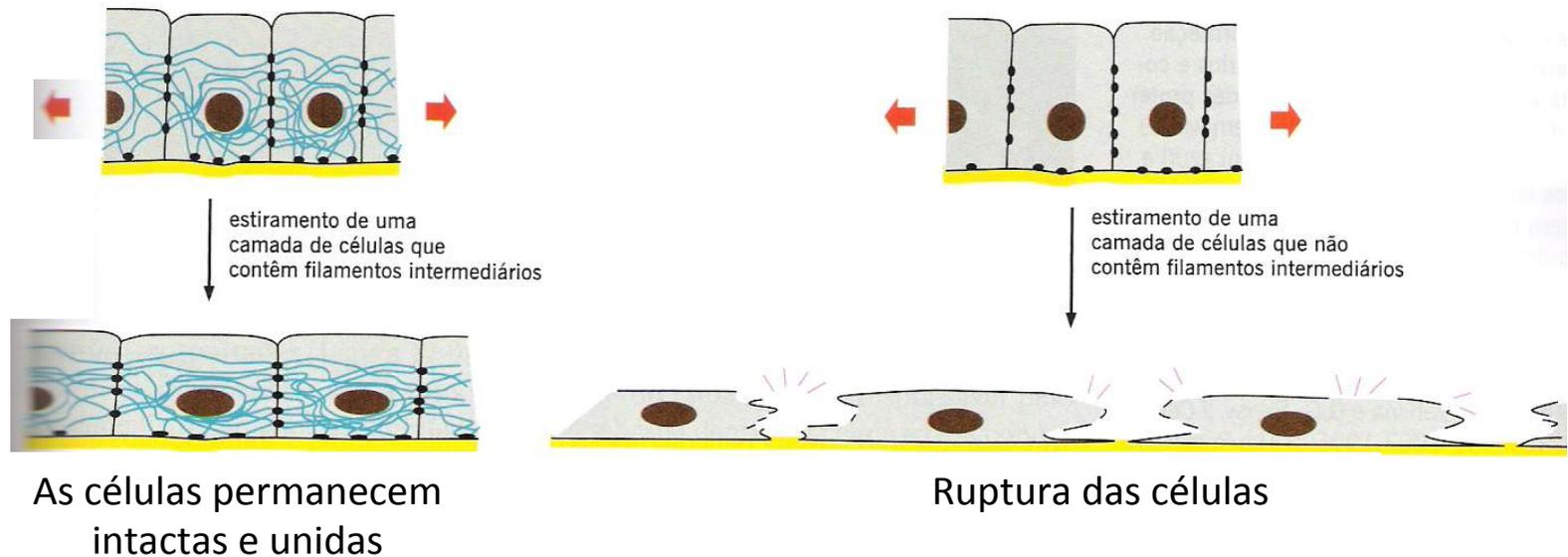
The **nuclear lamins** form a meshwork of filaments within the lamina. (A) **Spread nuclear envelope from *Xenopus* oocytes** after detergent extraction and preparation for transmission electron microscopy by freeze-drying/unidirectional metal shadowing. The micrograph shows the nuclear lamina meshwork partially studded with nuclear pore complexes. (Inset) Higher-magnification view of a particularly well-preserved area clearly shows the near-tetragonal lamina meshwork. Bars, 1 μm . Reprinted from Stuurman et al. (1998)



Micrografia de fluorescência de uma célula de fibroblasto corada para evidenciar filamentos intermediários de queratina

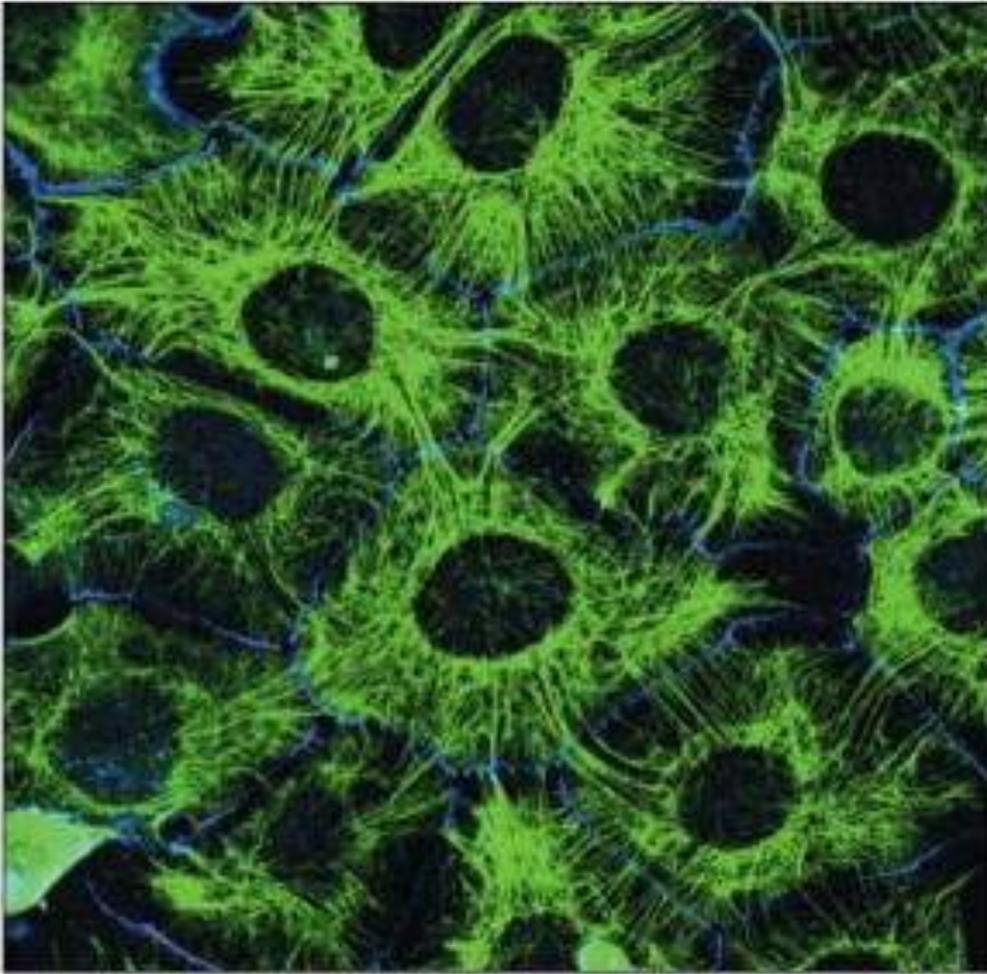
Filamentos intermediários

Particularmente presentes no citosol de células que sofrem **estresse mecânico**



Camada de células epiteliais sendo distendida

Filamentos de queratina em células epiteliais



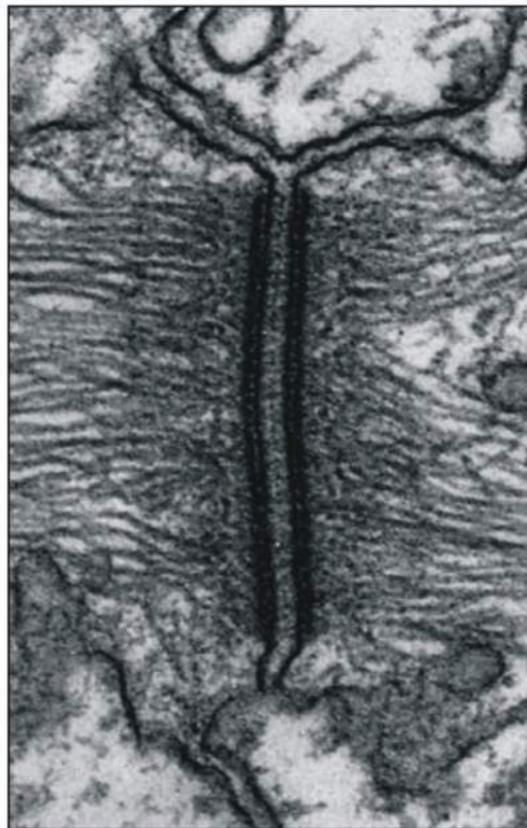
10 μm

Micrografia de imunofluorescência de uma rede de filamentos de queratina (verde) em células epiteliais em cultura.

Os filamentos em cada célula estão indiretamente conectados as células vizinhas pelos desmossomos.

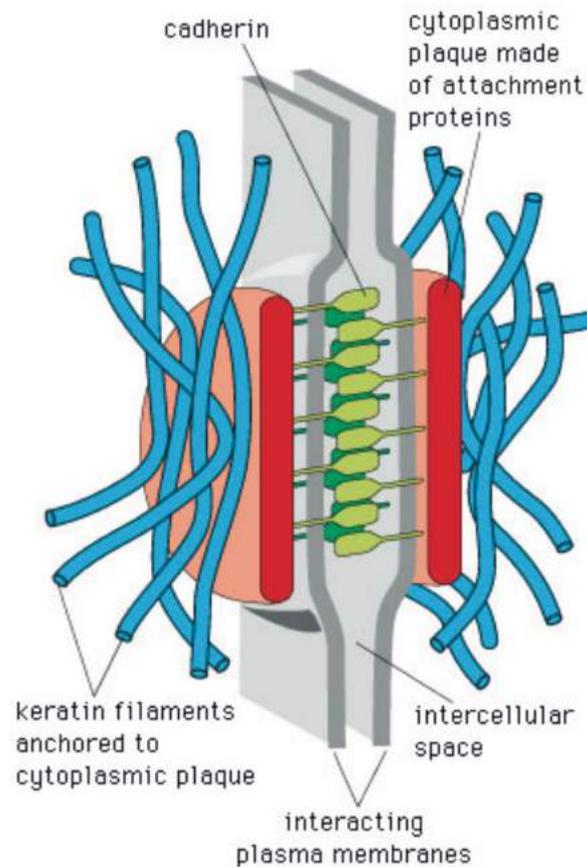
Alberts B. et al. *Molecular Biology of the Cell*.

Desmosomo: uma junção de ancoramento da célula



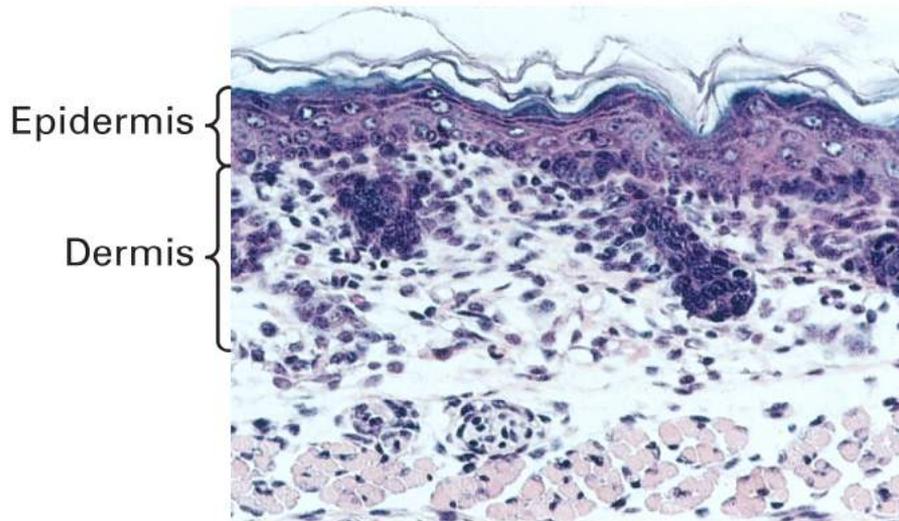
(A)

0.1 μm

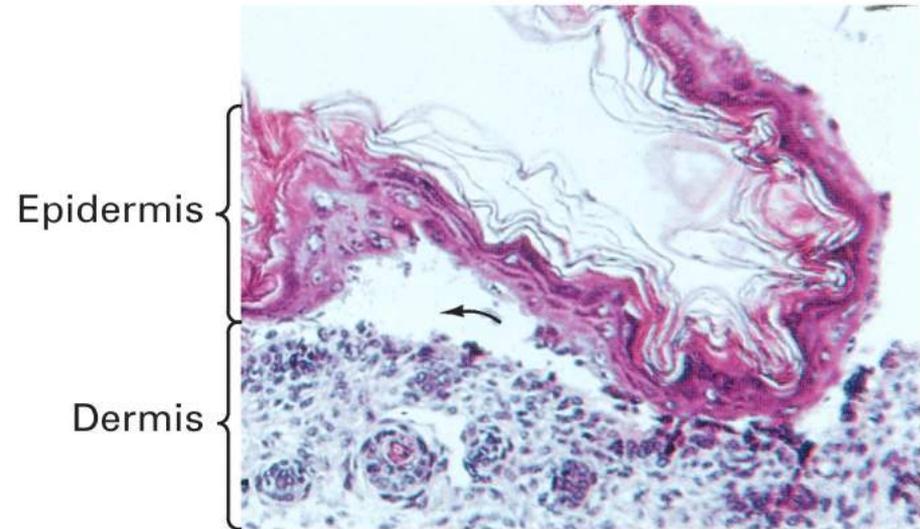


(B)

Gene mutante para **queratina K14** leva a formação de bolhas em camundongos



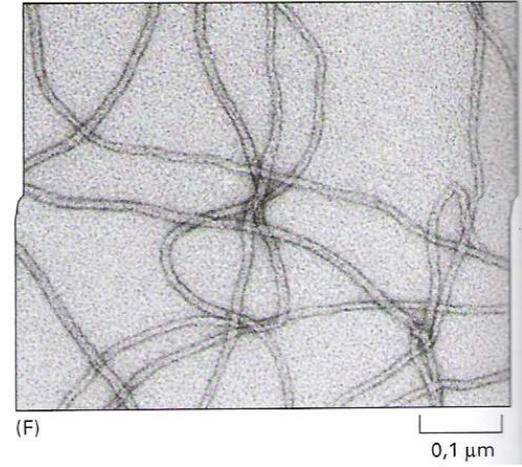
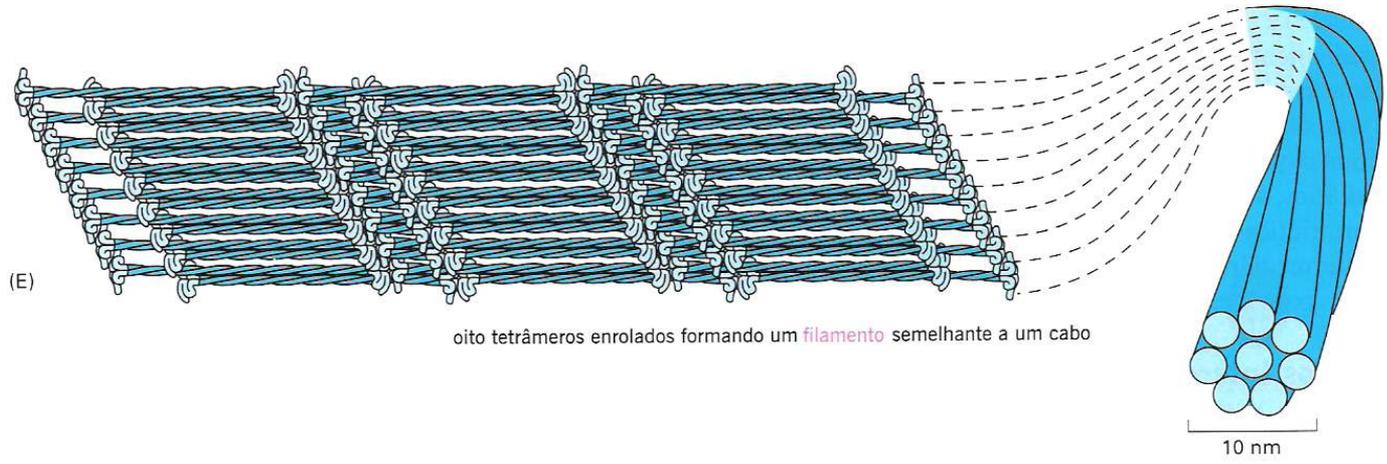
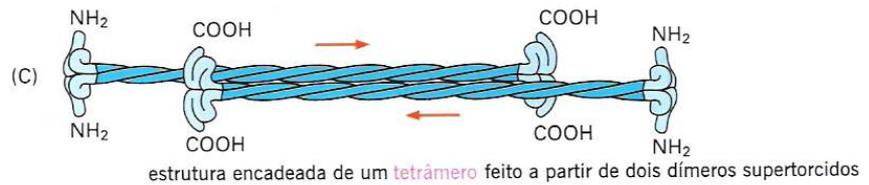
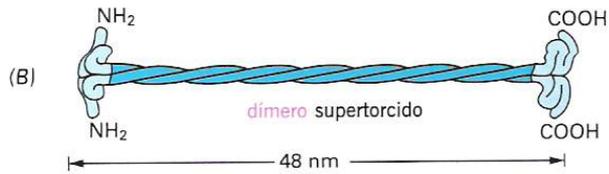
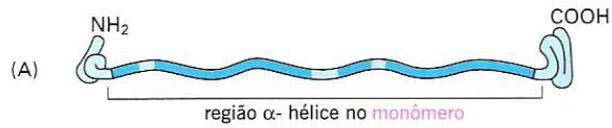
Normal



Mutated

- Mutante K14 não é capaz de formar filamentos, há muitas células basais mortas por trauma mecânico devido a fricção, levando às bolhas.

Cortes histológicos da pele de camundongo normal e transgênico.
Fonte: Coulombe et al. 1991. *Cell* 66:1301



Filamentos intermediários

TABLE 19-4 Primary Intermediate Filaments in Mammals

IF Protein	MW (10^{-3})*	Filament Form	Tissue Distribution
NUCLEAR LAMINS			
Lamin A	70	Homopolymer	Nucleus
Lamin B	67	Homopolymer	Nucleus
Lamin C	67	Homopolymer	Nucleus
KERATINS[†]			
Acidic keratins	40–57	Heteropolymers	Epithelia
Basic keratins	53–67	Heteropolymers	Epithelia
TYPE III INTERMEDIATE FILAMENTS			
Vimentin	57	Homo- and heteropolymers	Mesenchyme (fibroblasts)
Desmin	53	Homo- and heteropolymers	Muscle
Glial fibrillary acidic protein	50	Homo- and heteropolymers	Glial cells, astrocytes
Peripherin	57	Homo- and heteropolymers	Peripheral and central neurons
NEUROFILAMENTS			
NF-L	62	Homopolymers	Mature neurons
NF-M	102	Heteropolymers	Mature neurons
NF-H	110	Heteropolymers	Mature neurons
Internexin	66	—	Developing CNS

*Intermediate filaments show species-dependent variations in molecular weight (MW).

[†]More than 15 isoforms of both acidic and basic keratins are known.

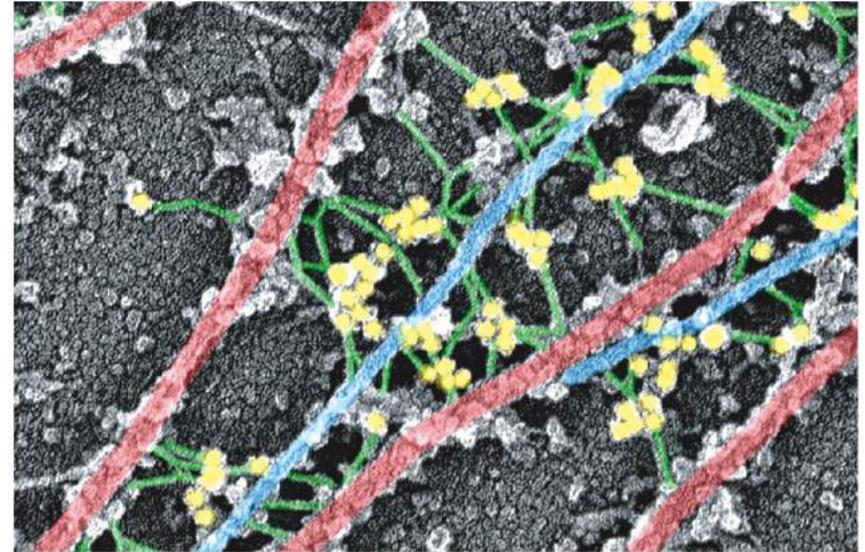
Proteínas acessórias

- Conectam os feixes de filamentos intermediários (FI) formando arranjos fortes e estáveis.

Ex. *plectina*



mantém os feixes de *FI* unidos e os conecta a microtúbulos, filamentos de actina e desmossomos

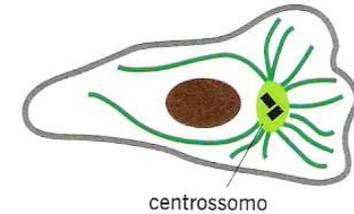


Micrografia eletrônica de um fibroblasto. Em vermelho, os **microtúbulos**; em azul, os **filamentos intermediários**; e em verde, **fibras de conexão de plectina** e, em amarelo partículas de ouro ligadas a anticorpos que reconhecem a plectina

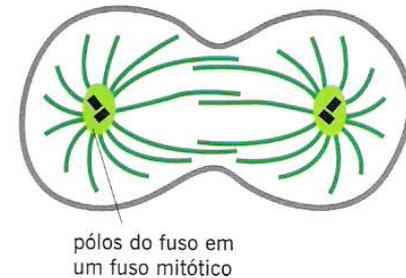
Microtúbulos

- Papel essencial na organização das céls. eucarióticas
- Tubos protéicos longos e ocos
- Sofrem dissociação e reassociação
- Criam vias de transporte para vesículas e organelas
- Ancoram organelas e membrana plasmática
- Formam o fuso mitótico, cílio e flagelo

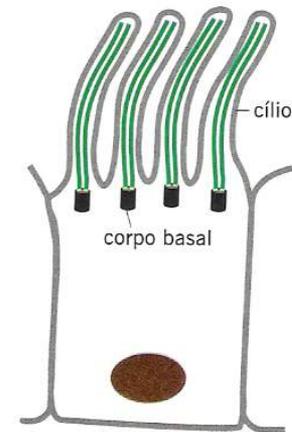
(A) CÉLULA EM INTERFASE



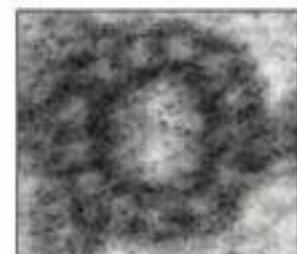
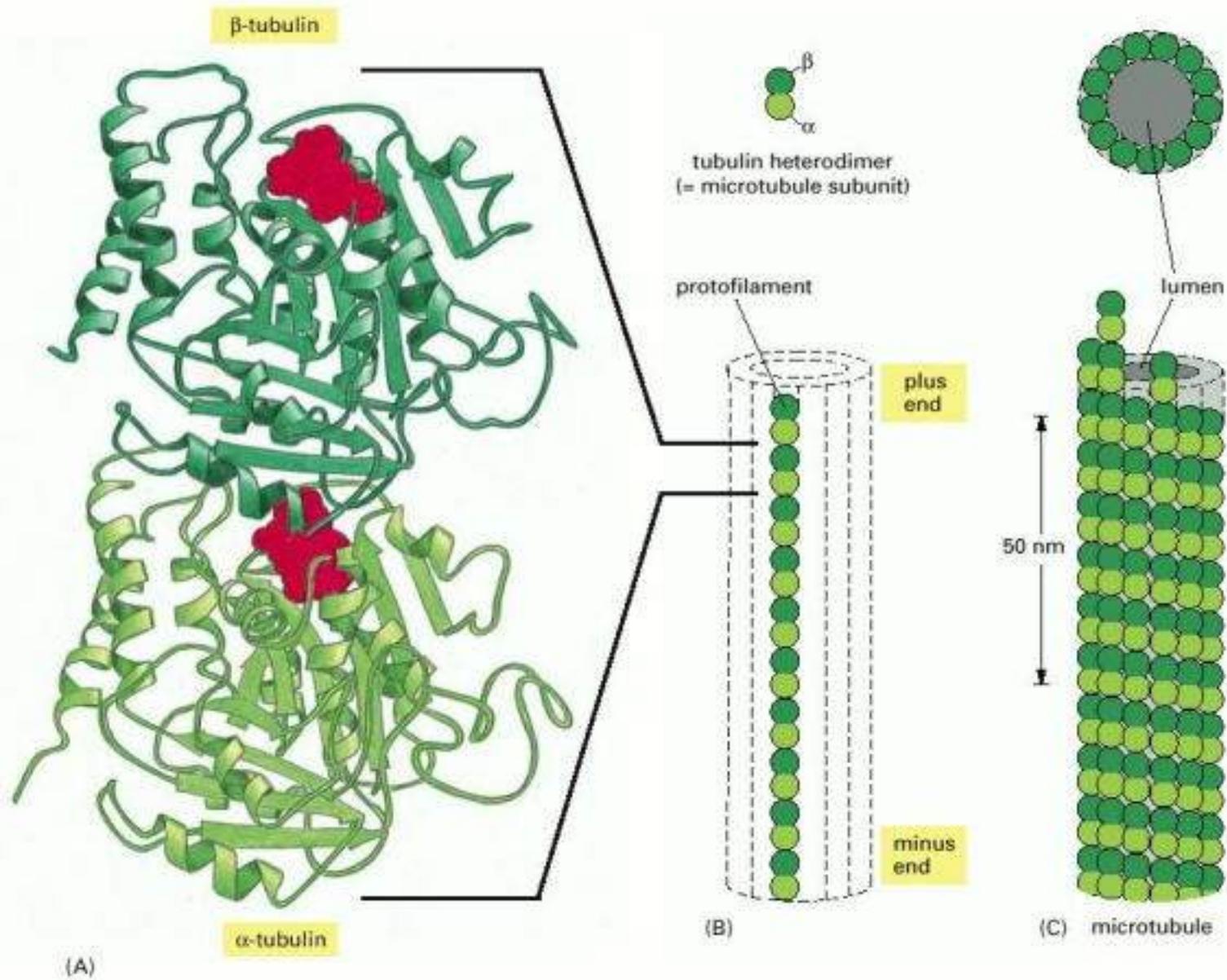
(B) CÉLULA EM DIVISÃO



(C) CÉLULA CILIADA



Microtúbulos geralmente se estendem para fora da estrutura organizadora



(E) 10 nm

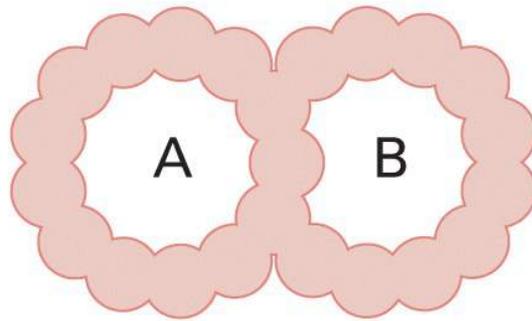


(D) 50 nm

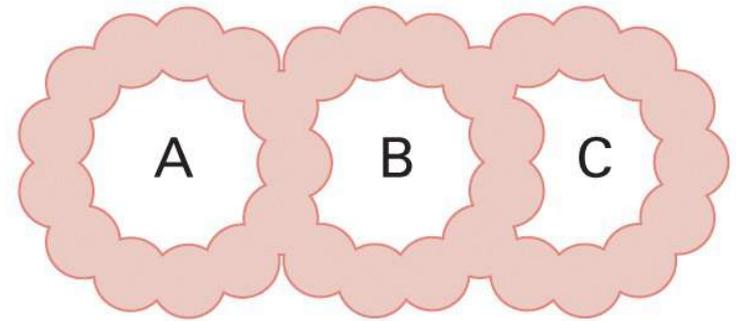
Arranjo dos protofilamentos em microtúbulos simples, duplos e triplos



Singlet

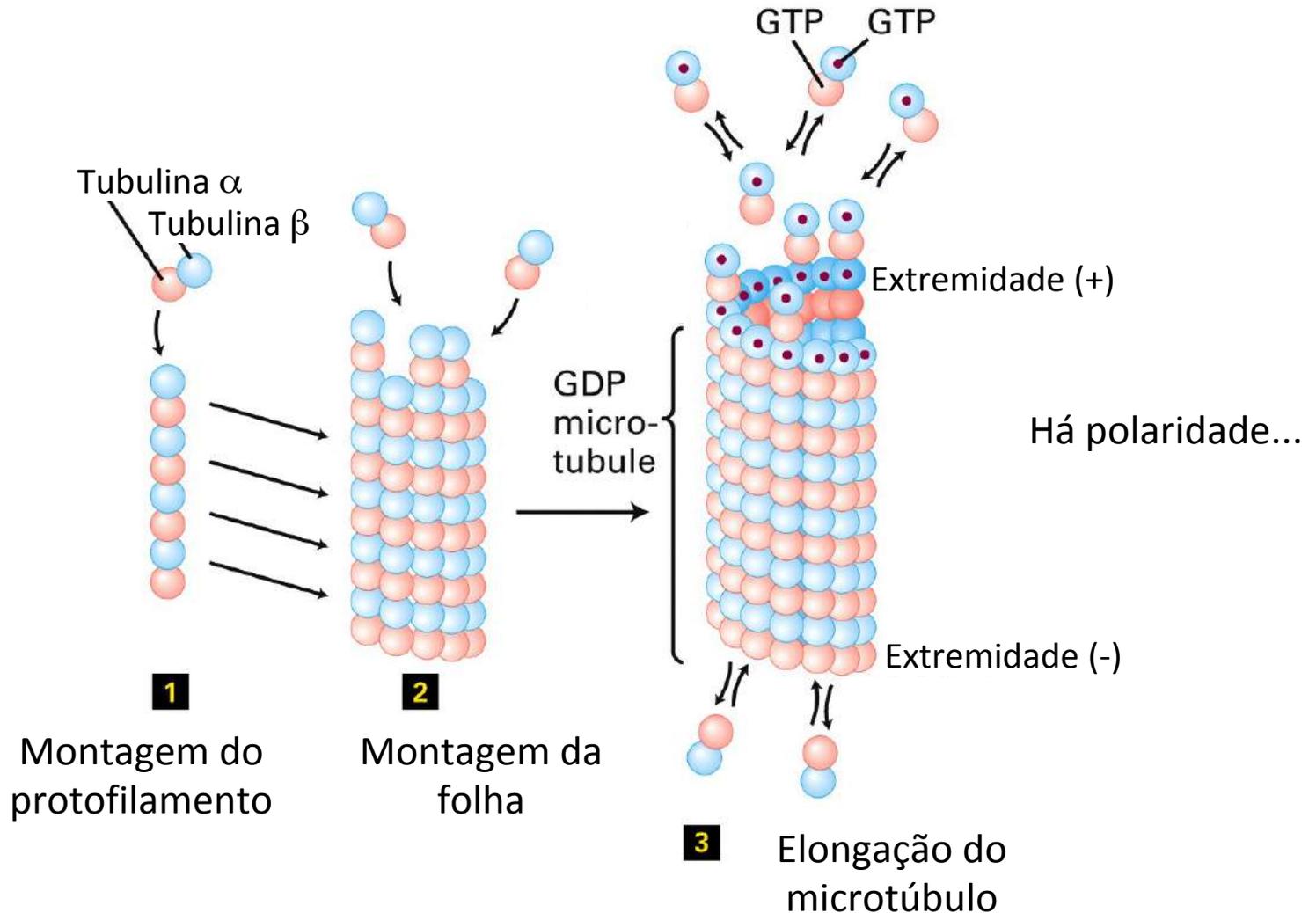


Doublet
(cilia, flagella)



Triplet
(basal bodies, centrioles)

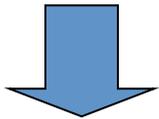
Estágios na montagem dos microtúbulos



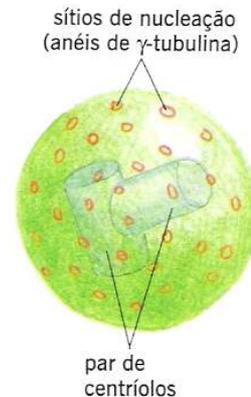
Centros organizadores de microtúbulos=MTOCs

- Número, posicionamento e orientação no citoplasma são controlados
- Em células animais = o **centrossomo** é o principal centro organizador de microtúbulos (MTOC). Os corpos basais de cílios e flagelos também são MTOCs

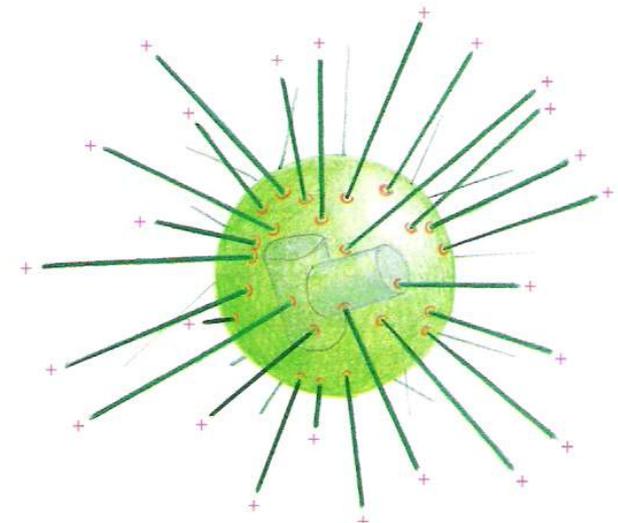
γ -tubulina é o sítio de nucleação



O crescimento do microtúbulo é orientado.

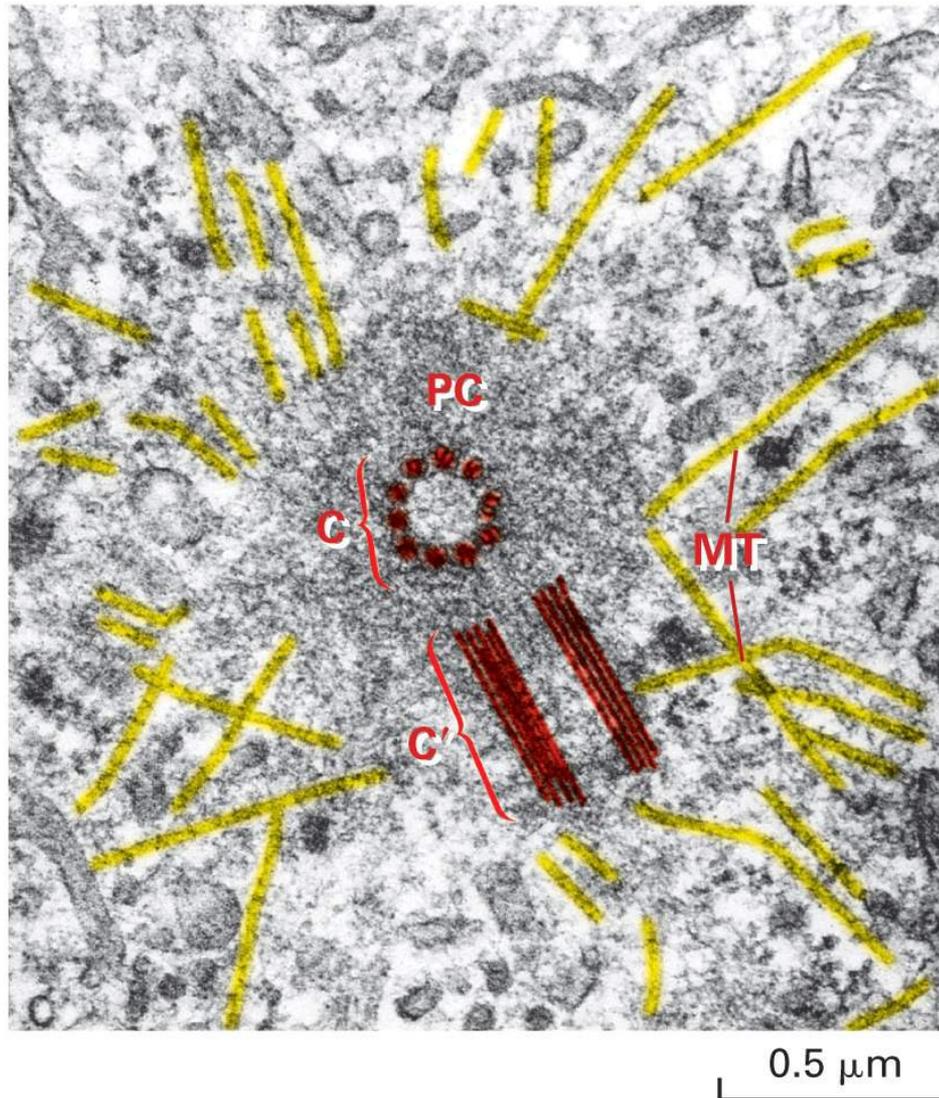


(A)



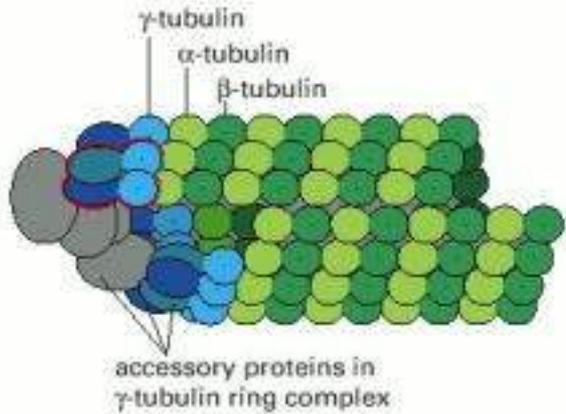
(B)

microtúbulos crescendo a partir de complexos de anéis de γ -tubulina do centrossomo

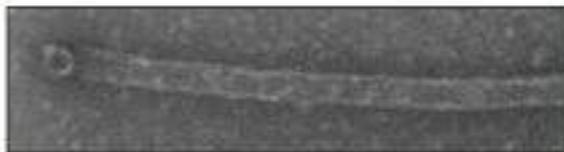
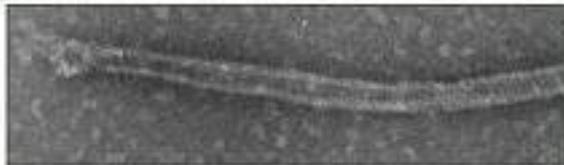
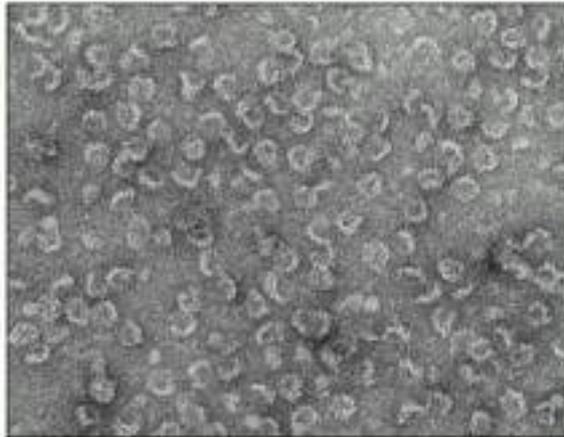


Micrografia eletrônica do centrosomo (MTOC) em uma célula animal.

C e C' = centríolos; MT = microtúbulos; PC = matriz centrossomal



(A)



(B)

100 nm

Polimerização da tubulina nucleada pelos complexos de γ -tubulina

(A) Modelo para a nucleação do crescimento do microtúbulo pela γ -TuRC.

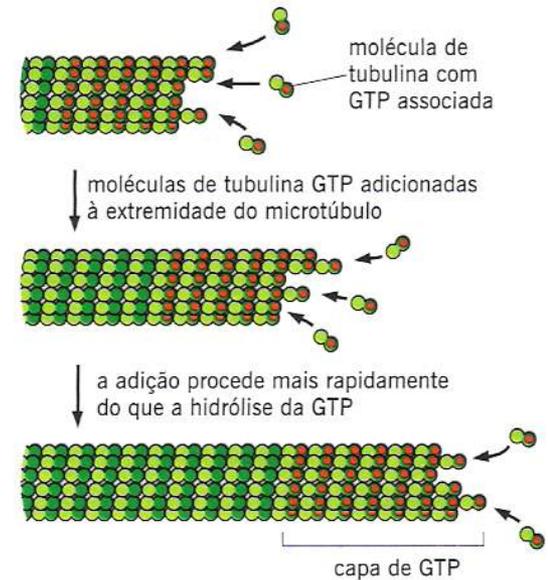
(B) Micrografia eletrônica de complexos de anéis γ -tubulina purificados (acima) e microtúbulos individuais nucleados a partir dos complexos de anéis de γ -tubulina (meio e abaixo).

(A, modified from M. Moritz et al., *Nature Cell Biol.* 2:365–370, 2000; B, courtesy of Y. Zheng et al., *Nature* 378:578–583, 1994.)

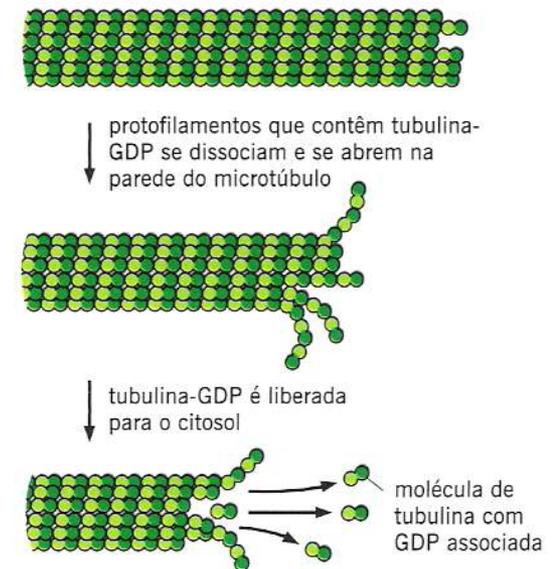
Instabilidade dinâmica dos microtúbulos

- Crescimento e encurtamento do microtúbulo de forma dinâmica.
- Deve-se a capacidade da β -tubulina hidrolisar GTP

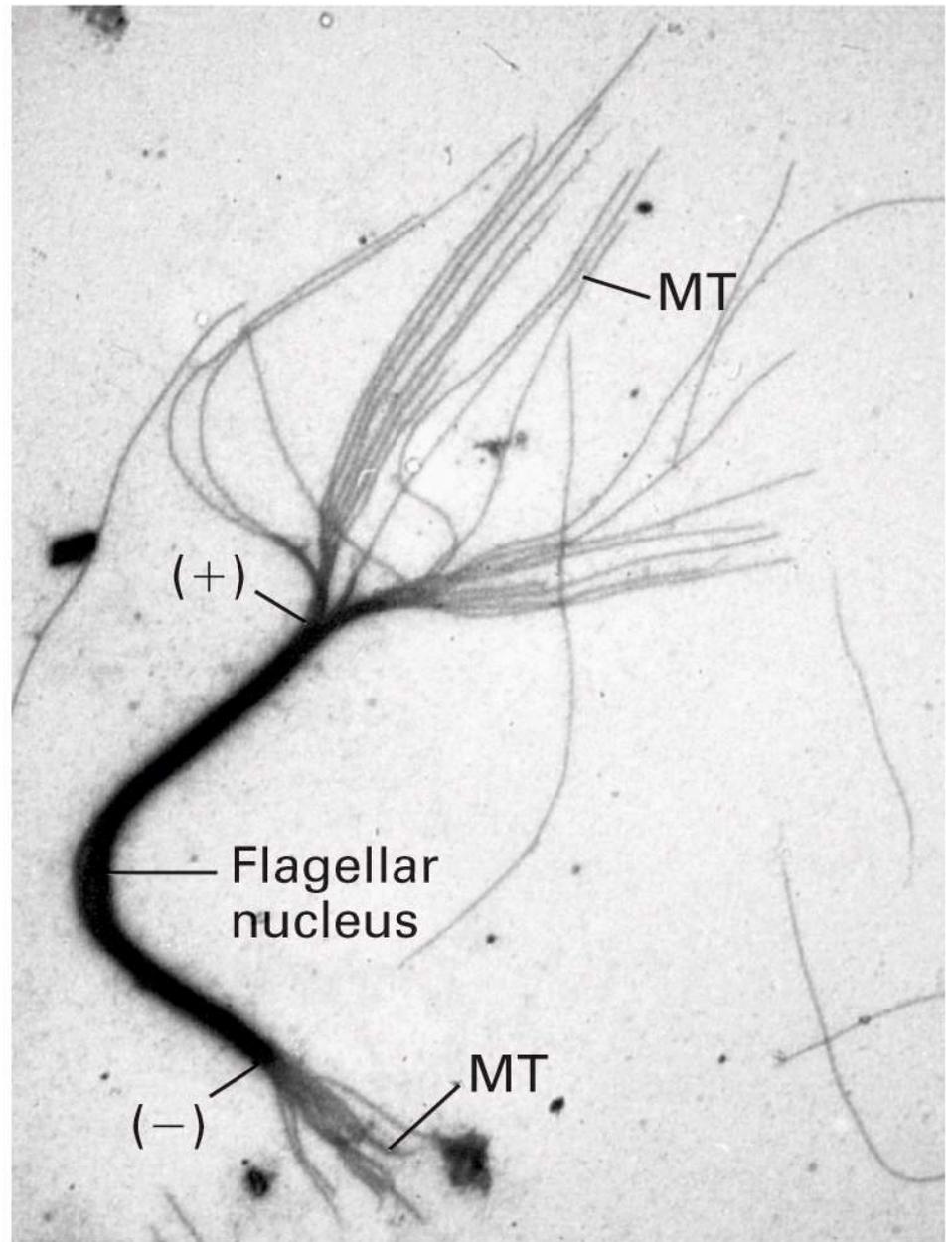
<http://jcb.rupress.org/content/158/5/873.full>



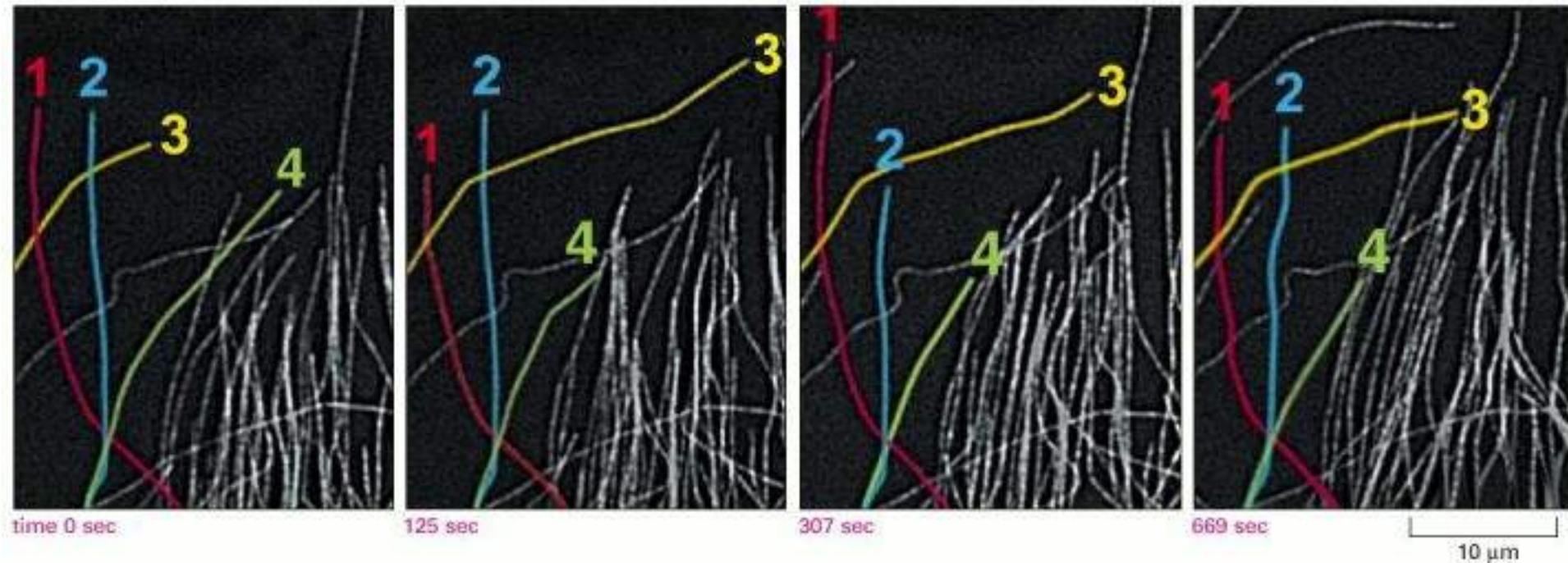
MICROTÚBULO EM CRESCIMENTO



Micrografia eletrônica de fragmentos de um feixe de MT de um flagelo, usados para nuclear *in vitro* a adição de $\alpha\beta$ -tubulina.



Observação direta da instabilidade dinâmica de microtúbulos numa célula viva



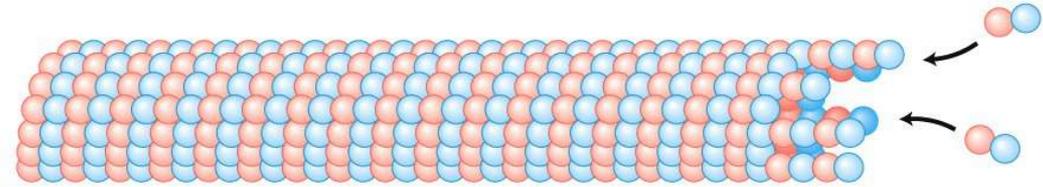
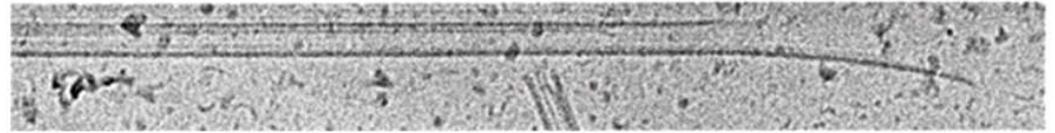
Microtúbulos em uma célula epitelial do pulmão de salamandra observados após a cél. ter sido injetada com uma pequena quantidade de tubulina marcada com rodamina. Quatro microtúbulos estão destacados para facilitar a observação.

<https://youtu.be/9ICqcZ99qGk>

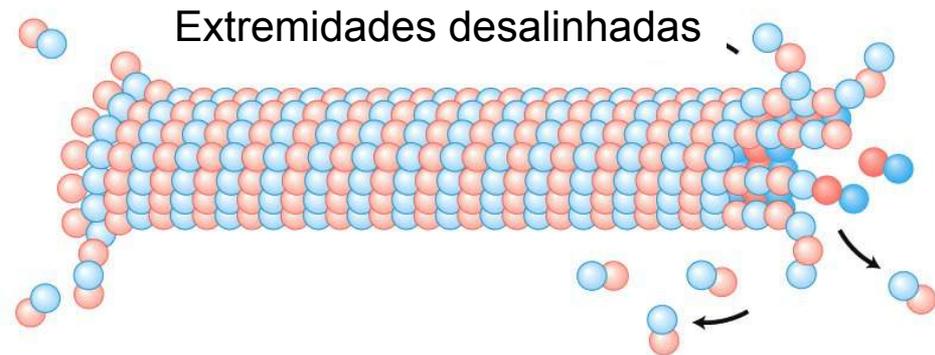
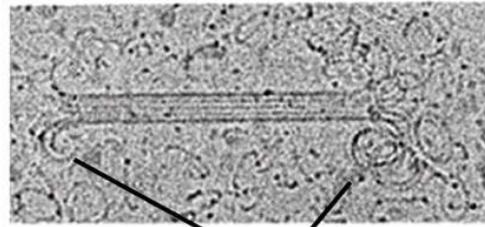
<https://www.youtube.com/watch?v=IEDwMZm1z8>

Criomicroscopia eletrônica
permite a observação e
diferenciação de
microtúbulos em
crescimento e
encurtamento.

(a) Montagem (crescimento)



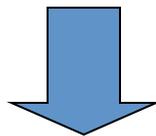
(b) Desmontagem (encurtamento)



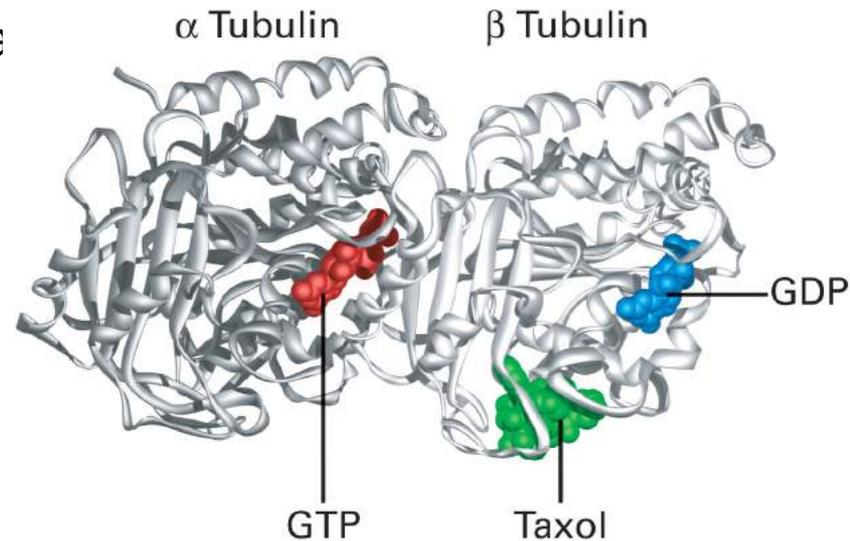
Balanço entre montagem e dissociação

- Há uma remodelação rápida e contínua dos microtúbulos no citosol.

Colchicina X **Taxol** no fuso mitótico
(desestabiliza MT) x (estabiliza MT)

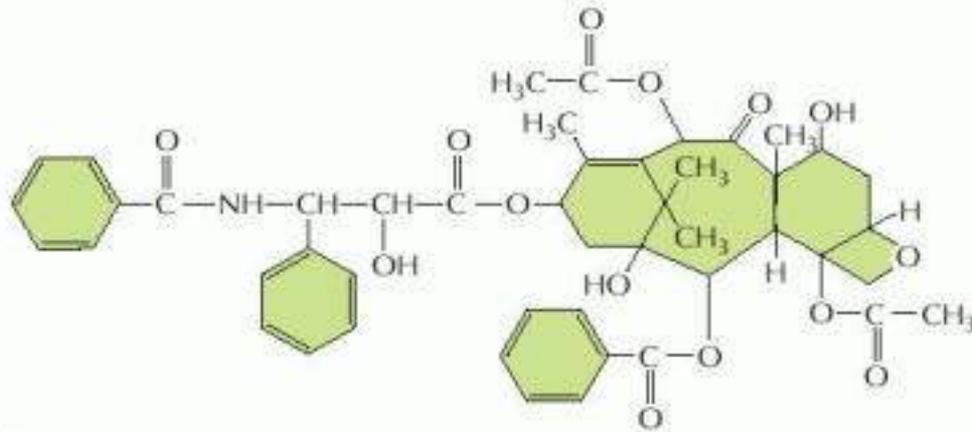


Drogas antimitóticas



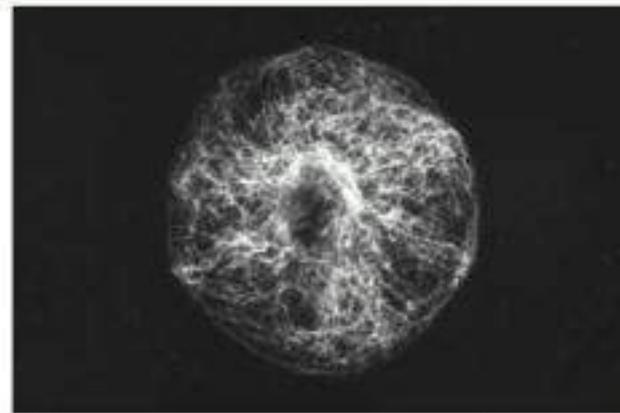
Colchicina: sequestra dímeros livres de $\alpha\beta$ -tubulina no citosol (usada há séculos para redução de dor nas articulações causada por “gota”)

Taxol: estabiliza o polímero (inibe a mitose e usado em tratamentos para câncer (paclitaxel))



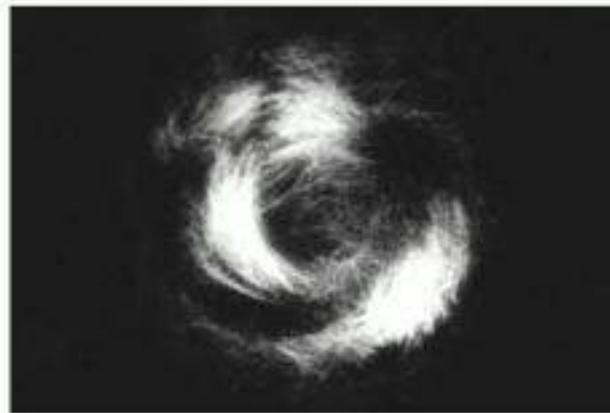
(A)

taxol



(B)

15 μm



(C)



(D)

Efeito do taxol na organização de microtúbulos: microscopia de imunofluorescência mostrando a organização dos microtúbulos numa célula epitelial do fígado antes da adição do taxol (B) e depois (C). (D) *Taxus*, a fonte natural de taxol.

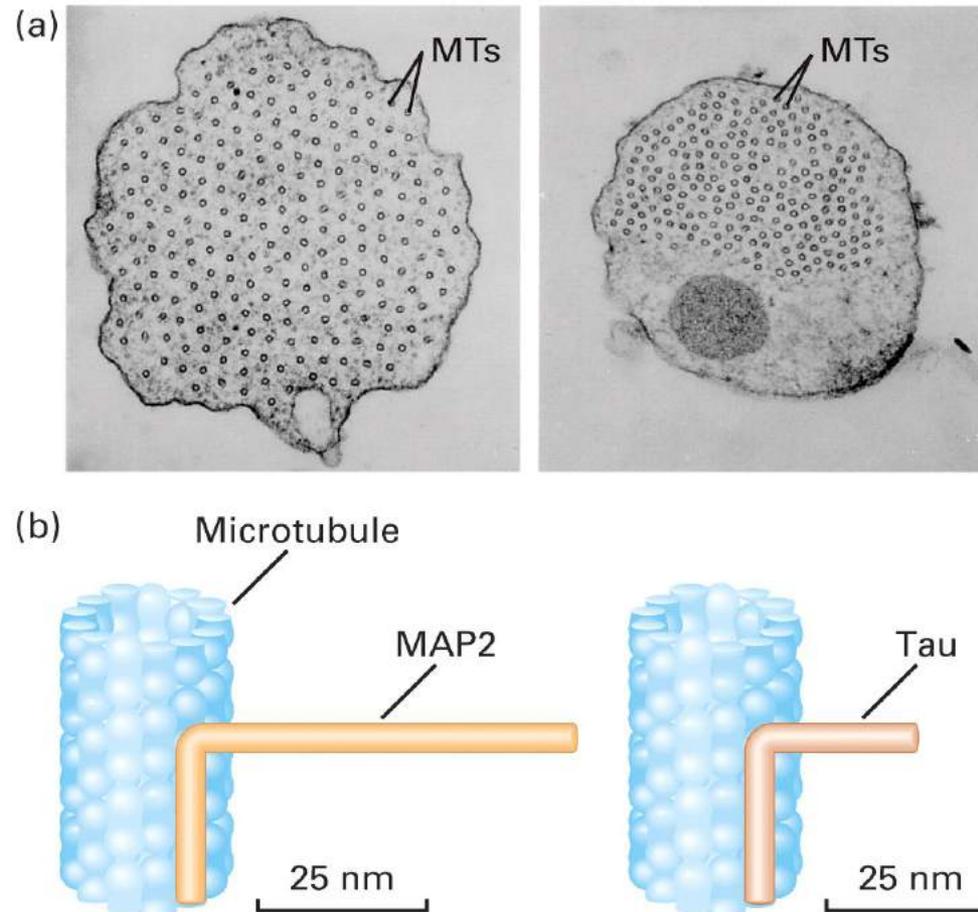
Dinâmica dos microtúbulos

TABLE 20-1 Proteins That Modulate Microtubule (MT) Dynamics

Protein	MW	Location	Function
MICROTUBULE-STABILIZING PROTEINS			
MAP1	250,000–300,000 (heavy chain)	Dendrites and axons; non-neuronal cells	Assembles and stabilizes MTs
MAP2	42,000 and 200,000	Dendrites	Assembles and cross-links MTs to one another and to intermediate filaments
MAP4	210,000	Most cell types	Stabilizes MTs
Tau	55,000–62,000	Dendrites and axons	Assembles, stabilizes, and cross-links MTs
CLIP170	170,000	Most cell types	Cross-links MTs to endosomes and chromosomes
MICROTUBULE-DESTABILIZING PROTEINS			
Katanin	84,000	Most cell types	Microtubule severing
Op18 (stathmin)	18,000	Most cell types	Binds tubulin dimers

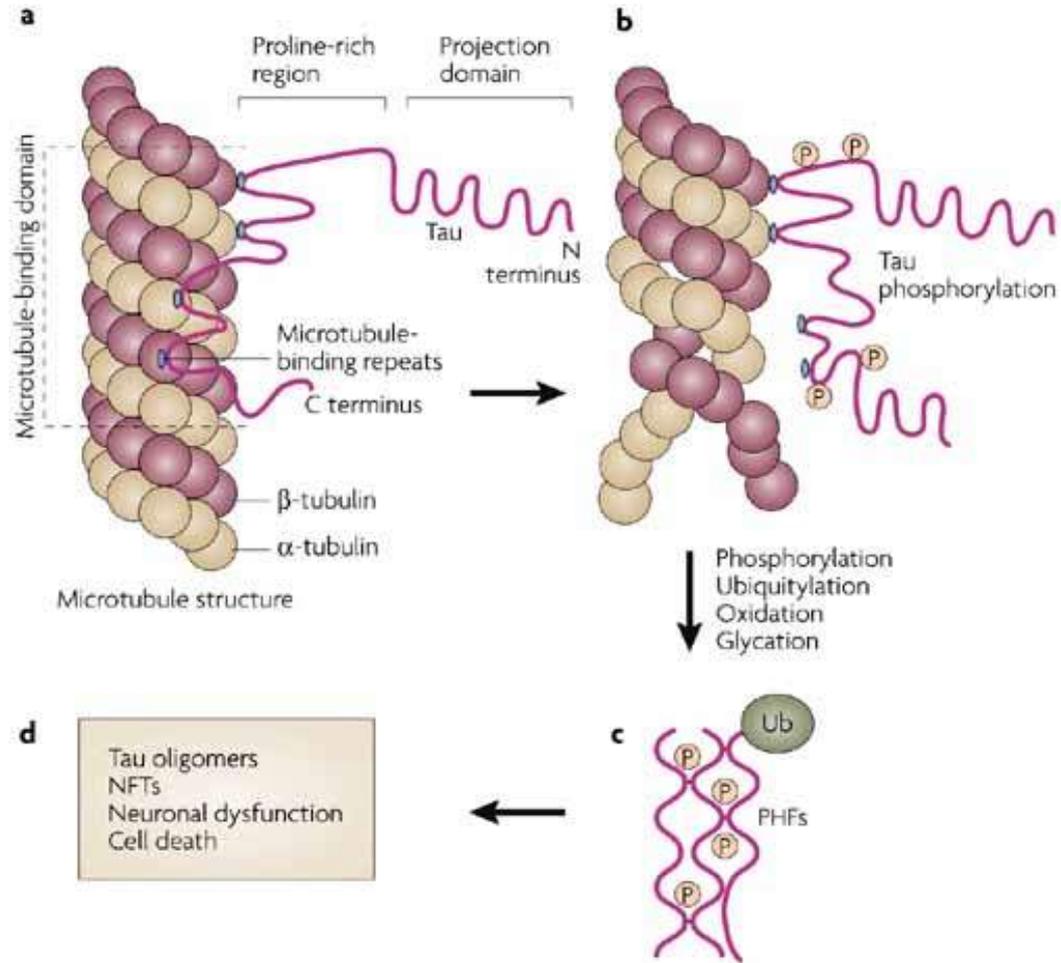
Fonte: Lodish et al.

O espaçamento dos MT depende dos domínios de projeção de MAPs



Micrografias eletrônicas de secções transversais de protuberâncias induzidas pela expressão de MAP2 (esquerda) e Tau (dir.) em células de inseto transfectadas. (Fonte : Lodish et al., 2014)

Tau x microtúbulos



Nature Reviews Drug Discovery **6**, 464-479
(June 2007) | doi:10.1038/nrd2111