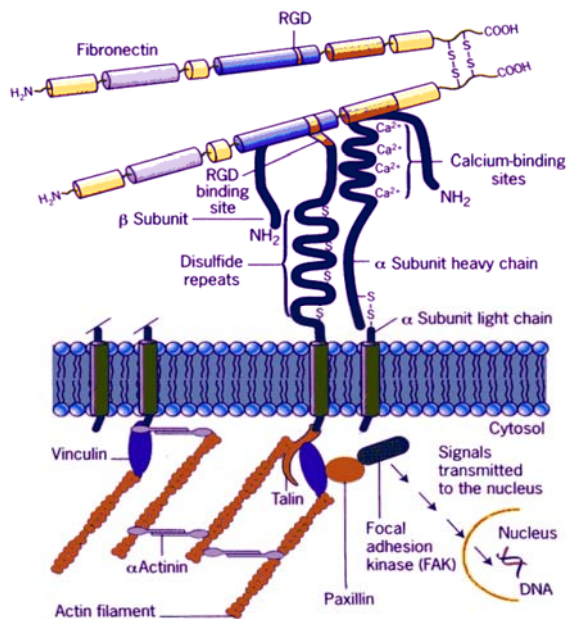


## Molecole Adesione

### Integrine

[http://www.uphs.upenn.edu/news/News\\_Releases/mar07/integrin-highres.jpg](http://www.uphs.upenn.edu/news/News_Releases/mar07/integrin-highres.jpg)



### Il segnalamento mediato da integrine regola:

- ✚ Proliferazione
- ✚ Differenziamento
- ✚ Motilità
- ✚ Sopravvivenza

## Integrine

- ✚ Grande famiglia di molecole di adesione coinvolte nelle interazioni delle cellule con proteine della matrice extracellulare (ECM) (es. laminina, collagene, fibronectina, vitronectina) e nell'adesione cellula-cellula.
- ✚ I **domini extracellulari** delle integrine sono di solito collegati alle **proteine della ECM**.
- ✚ I **domini intracellulari** sono collegati funzionalmente al **citoscheletro**.
- ✚ **Mediano la comunicazione fra gli ambienti extra- e intracellulari:**
  - L'interazione integrina-citoscheletro influenzano l'affinità e l'avidità delle integrine verso i ligandi nella ECM («**inside-out signalling**»)
  - Le interazioni ECM-integrine portano ad alterazioni nella forma e composizione dell'architettura cellulare («**outside-in signalling**»).
- ✚ Tutte le interazioni integrina-ligando **dipendono alla presenza di cationi divalenti** ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ ).

Coombe & Dye. In: Cell Adhesion Molecules, CRC Press

## Integrine [b]

- ✚ I **domini extracellulari** si collegano a **specifiche sequenze di aminoacidi** («motivi») nella proteine della matrice oppure, in alcuni casi, in proteine della superficie di altre cellule.
- ✚ La più nota è la sequenza **Arginina-Glicina-Aspartato** (Arg-Gly-Asp; **RGD**), che si trova nella **fibronectina** e in altre proteine della matrice extracellulare.
- ✚ Alcune integrine si collegano invece alla sequenza Leu-Asp-Val (**LDV**) presente nella fibronectina e in altre proteine.
- ✚ Ulteriori sequenze di legame per le integrine, ancora poco note, sono presenti nella laminina e nei collagene.

Alberts et al., 2015

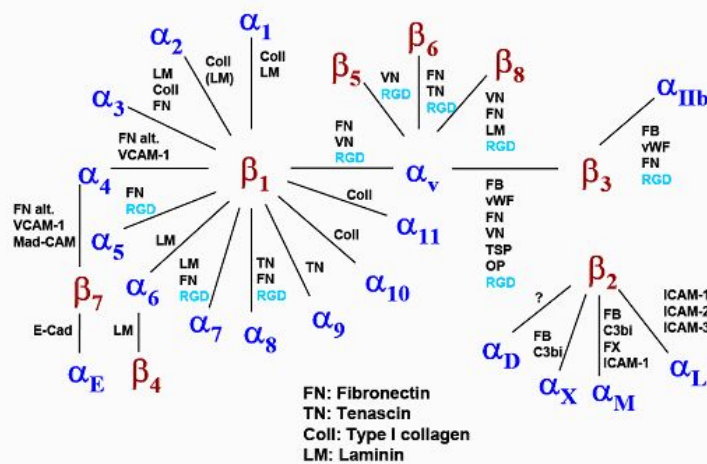
## Integrine [c]

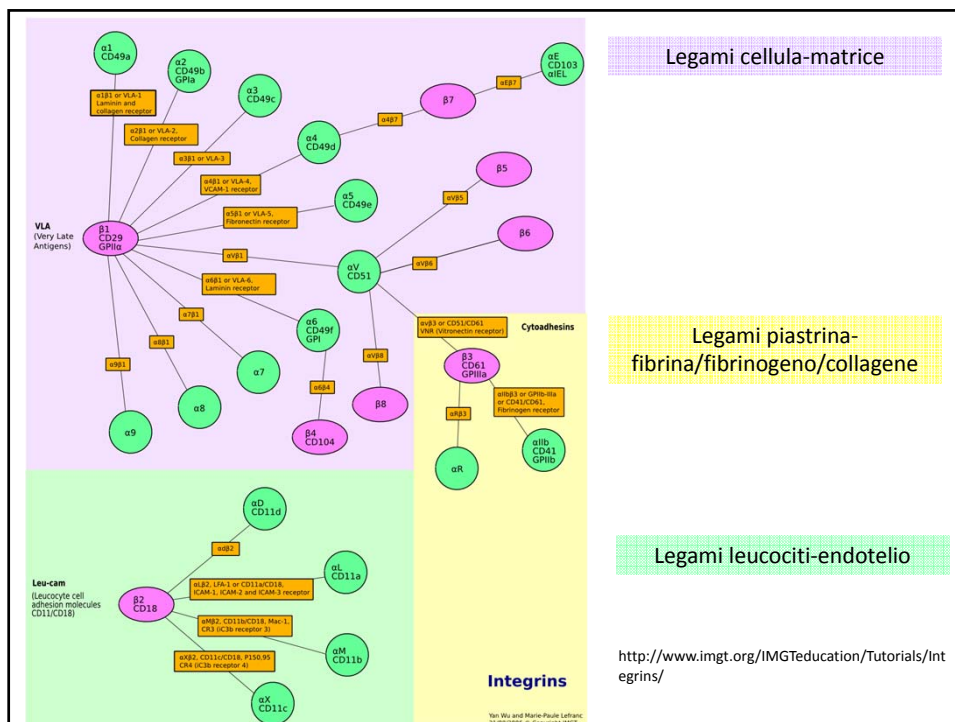
- Uomo: 24 tipi di integrine, formate dai prodotti di **8 tipi diversi di geni per le catene  $\beta$**  e **18 tipi diversi di geni per le catene  $\alpha$** , che dimerizzano mediante combinazioni diverse.
- Ogni integrina ha proprietà e funzioni caratteristiche.**
- Dato che la stessa molecola di integrina in tipi cellulari diversi può avere **specificità per ligandi diverse**, è probabile che fattori addizionali, tipo cellulare-specifici, interagiscono con le integrine modulando la loro attività.
- Il legame delle integrine con ligandi della MEC è anche influenzato dalla **concentrazione di cationi divalenti ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )** nell'ambiente extracellulare, riflettendo la **presenza di siti di legame per questi ioni nelle teste delle subunità  $\alpha$  e/o  $\beta$** .
- Gli ioni divalenti possono **influenzare** sia l'**affinità** che la **specificità** del legame dell'integrina con i suoi ligandi extracellulari.

Alberts et al., 2015

## Integrins

### Heterodimeric Cell Surface Receptors for Cell-ECM and Cell-Cell Interactions





- ✚ La **combinazione delle subunità  $\alpha$  e  $\beta$**  determina la **specificità** di legame e le proprietà di **segnalamento** delle singole integrine.
- ✚ Alcune integrine (es.  $\alpha_5\beta_1$ ) riconoscono principalmente un singolo ligando.
- ✚ Altre (es.  $\alpha_v\beta_3$ ) possono legarsi a diversi ligandi.

FrancaVilla C, Maddaluno L, Cavallaro U. The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis. Semin Cancer Biol. 19:98-309, 2009.

## Integrine [d]

- ✚ La **porzione intracellulare** di un dimero di integrina può **legarsi ad un complesso di diverse proteine**, che complessivamente formano un **ponte con il citoscheletro**.
- ✚ Per tutti tranne uno dei 24 dimeri di integrine umane, il collegamento è fatto con il citoscheletro di **actina**. [N.B. negli emi-desmosomi il collegamento viene invece fatto con il citoscheletro dei filamenti intermedi, in particolare con le **cheratine**].
- ✚ Questi collegamenti dipendono da **proteine** intracellulari che **si assemblano sulle** corte **code citoplasmatiche** delle subunità delle integrine.

Alberts et al., 2015

## Integrine [e]

- ✚ In molti casi una grande proteina, la **talina**, è componente di questo sistema di ponte, ma sono coinvolte anche numerose altre proteine.
- ✚ Come nel caso delle giunzioni cellula-cellula formate da caderine collegate all'actina, le giunzioni cellula-matrice formate da integrine collegate all'actina possono essere **piccole, non appariscenti, e transitorie**, oppure **estese, prominenti e durature**:
  - **Adesioni focali**: formate quando **fibroblasti** hanno tempo sufficiente per stabilire collegamenti forti con la superficie rigida di una piastra di cultura;
  - **Giunzioni mio-tendinee**: collegano i muscoli ai loro tendini.
- ✚ Negli epitelii i siti più prominenti di collegamento cellula-matrice sono gli **emidesmosomi**, dove un tipo specifico di integrina ( **$\alpha 6 \beta 4$** ) ancora le cellule alla laminina della lamina basale: in questo caso, in modo singolare, il collegamento intracellulare è fatto con i filamenti intermedi di cheratina, tramite le proteine adattatrice plectina e BP230.

Alberts et al., 2015

**Structure of an adhesion complex in migrating cells**

**Composition of a focal adhesion**

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/54/Focaladhesiondetail.jpg/300px-Focaladhesiondetail.jpg>

**Focal adhesion**

**ADESIONI FOCALI**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9874/figure/A2057/>

<http://www.reading.ac.uk/cellmigration/adhesion.htm>

## Giunzione mio-tendinea

**Figure 1 Mechanical forces regulate integrin turnover rate.** Muscle-tendon attachments at the *Drosophila* myotendinous junction (MTJ) form through protein assemblies in which integrins recruit intracellular adhesion complexes (IAC) to anchor the F-actin cytoskeleton to the extracellular matrix (ECM). As the forces applied on the integrin adhesions increase, for example in response to hyperactive muscle contraction, the rate of integrin endocytosis decreases and thus more integrins stay at the MTJs to strengthen the connection. In contrast, reduction of force increases integrin turnover.

He L, Montell D. **A cellular sense of touch.** Nat Cell Biol. 2012 Sep;14(9):902-3.

## Emi-desmosoma

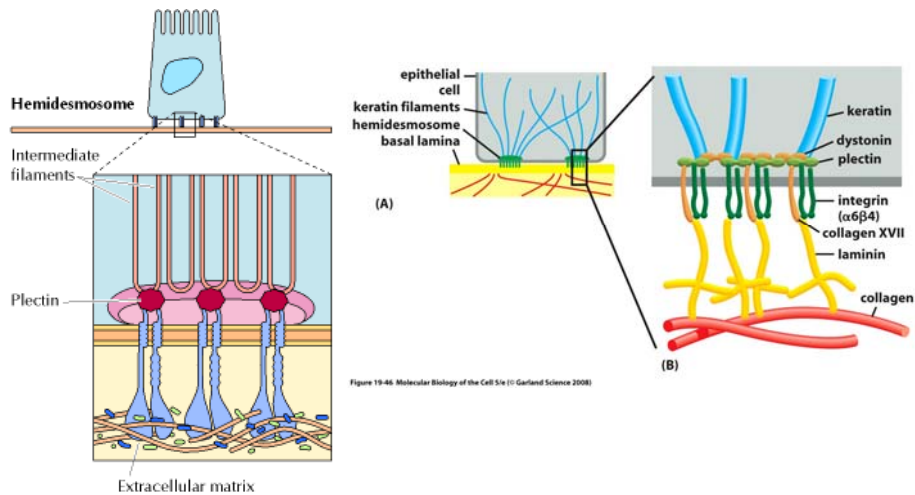
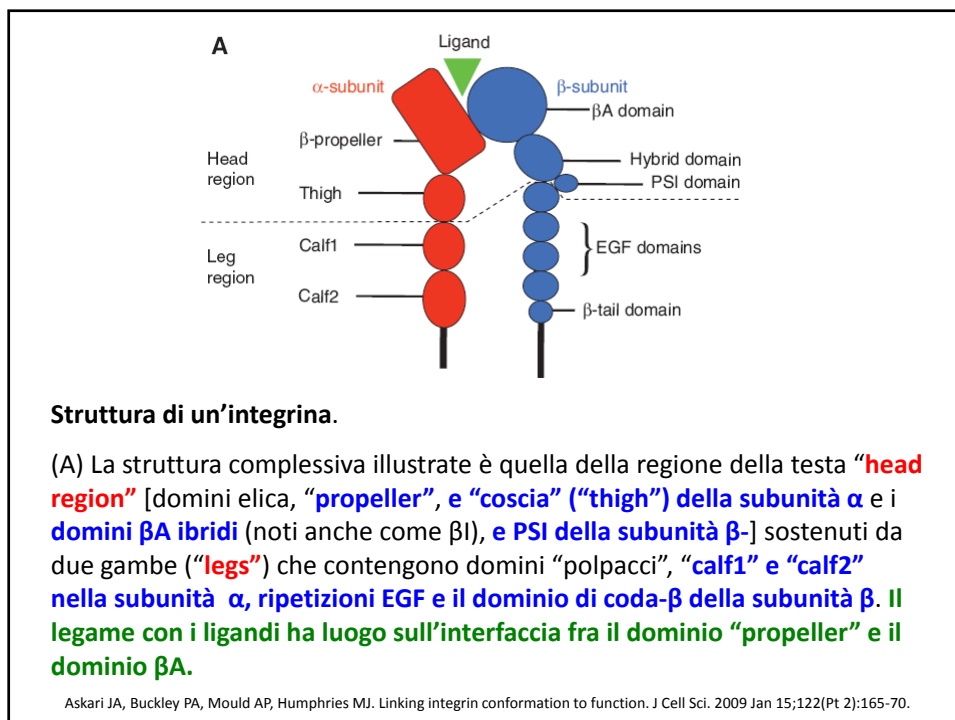
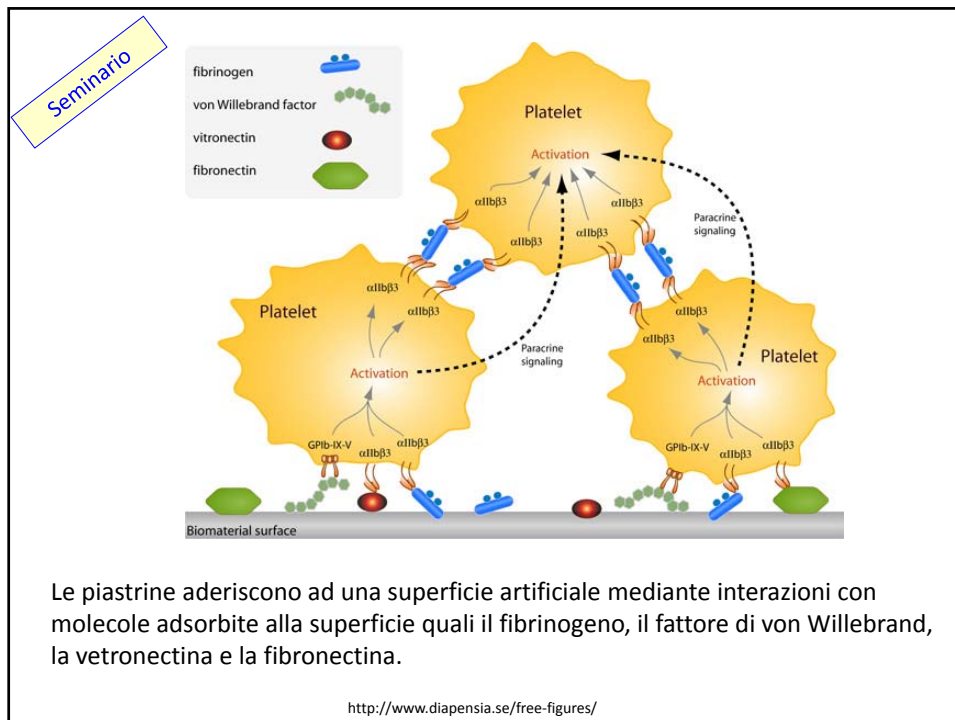


Figure 19-46. Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9874/figure/A2057/>

## Principali funzioni delle integrine

- ✚ **Collegamento della cellula alla matrice extracellulare (MEC).**
- ✚ **Trasduzione di segnale tra la MEC e la cellula.**
- ✚ Hanno inoltre una gran varietà di attività biologiche, che includono il **pattugliamento immunologico**, la **migrazione** cellulare e il **legame alle cellule di certi virus**, quali l'adenovirus, l'ecovirus, lo hantavirus e virus che provocano patologie alla bocca e al piede.
- ✚ Una importante funzione delle integrine si vede nella molecola **GPIIb/IIIa**, ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3), un'integrina presente sulla superficie delle **piastrine**, responsabile del **collegamento alla fibrina** all'interno di un coagulo sanguigno in formazione. Questa molecola **aumenta in modo drammatico la sua affinità di legame per la fibrina/fibrinogeno mediante associazione delle piastrine con i collageni esposti nel sito della ferita**.
- ✚ Dopo associazione delle piastrine con il collagene, la GPIIb/IIIa **cambia conformazione**, permettendole di legarsi alla fibrina e ad altri componenti del sangue per formare la matrice del **coagulo** e fermare la perdita di sangue.

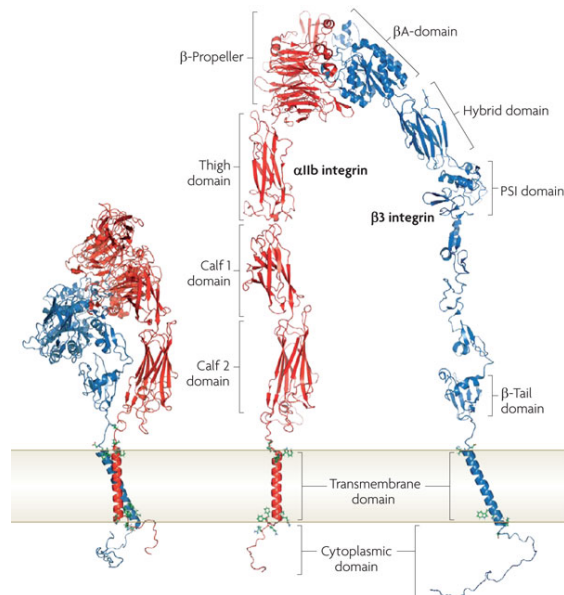




## L'eterodimero delle integrine

- ✚ La struttura extracellulare degli eterodimeri di integrine consiste in **una «testa» e in due «gambe»**.
- ✚ La «testa», che media le interazioni integrina-ligando, è il principale punto di contatto tra le subunità  $\alpha$  e  $\beta$ .
  - I contatti sono formati da interazioni fra la elica (catena  $\alpha$ ) con il dominio  $\beta$  (catena  $\beta$ ).
- ✚ Le «gambe» sono formate dai domini Thigh («coscia») e Calf-1 («polpaccio») della subunità  $\alpha$  e dai domini PSI, EGF, e  $\beta$ TD della subunità  $\beta$ .
- ✚ Le «ginocchia» permettono alle integrine di adottare una **conformazione ripiegata** oppure **dritta**, che è **fondamentale per l'attivazione delle integrine**.
- ✚ Ulteriori contatti fra le subunità  $\alpha$  e  $\beta$  hanno luogo fra Calf-1 e EGF3, fra Calf-2 e EGF4, fra Calf2 e  $\beta$ TD e fra le code citoplasmatiche di  $\alpha$  e  $\beta$ .

Coombe & Dye. In: Cell Adhesion Molecules, CRC Press



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

<http://www.nature.com/nrm/journal/v11/n4/images/nrm2871-i1.jpg>

## Struttura: subunità $\alpha$ e $\beta$ [1]

- Le subunità  $\alpha$  e  $\beta$  **non** condividono alcuna omologia, essendo due **polipeptidi distinti** con strutture a domini specifiche.
- I **domini extracellulari** di entrambe le subunità **contribuiscono** al **sito di legame** dell'eterodimero con il ligando.

Coombe & Dye. In: Cell Adhesion Molecules, CRC Press

## Struttura: subunità $\alpha$ e $\beta$ [2]



- Il **dominio extracellulare** della **subunità  $\alpha$**  contiene sette ripetizioni di circa 60 residui, che si ripiegano formando una **struttura ad elica («propeller»)**, con **sette pale formate da foglietti  $\beta$  disposte attorno ad un asse centrale**.
- Un sotto-insieme di catene  $\alpha$  delle integrine ha un **dominio di inserzione ( $\alpha A$ )** che contiene un **sito di legame per i cationi**, localizzato fra le ripetizioni due e tre dell'elica.
- Il C-terminale dell'elica è un dominio tipo immunoglobulinico, detto «**Thigh**» (coscia), seguito da due moduli a « $\beta$ -sandwich», Calf-1 e Calf-2 («**calf**»: polpaccio) e un piccolo dominio transmembrana.
- I **domini intracellulari** delle varie **subunità  $\alpha$**  mostrano poca omologia, tranne che per un **motivo conservato prossimo alla regione transmembrana che si associa con la coda citoplasmatica della subunità  $\beta$** .

Coombe & Dye. In: Cell Adhesion Molecules, CRC Press

## Struttura: subunità $\alpha$ e $\beta$ [3]

- ✚ La **regione extracellulare** delle **subunità  $\beta$**  delle integrine contengono un **dominio ibrido**, un **dominio «plexin-semaphorin-integrin» (PSI)**, **quattro ripetizioni tipo «Epidermal Growth Factor» (EGF)** e un **dominio di coda  $\beta$** .
- ✚ Il dominio ibrido è un dominio «Ig-like» che comprende un **motivo  $\beta A$**  (tipo dominio  $\alpha A$ ) inserito fra due  $\beta$ -foglietti.
- ✚ Quando la subunità  $\alpha$  **non** contiene il dominio di inserzione  $\alpha A$ , il **dominio  $\beta A$**  contiene un **motivo di legame ai metalli** che **si lega a cationi divalenti**.
- ✚ Il **dominio PSI** forma un  $\beta$ -foglietto antiparallelo con due filamenti fiancheggiato da due corte eliche che **contribuisce all'attivazione delle integrine**.
- ✚ Le **code** citoplasmatiche delle **catene  $\beta$**  delle integrine sono di solito corte e altamente conservate e contengono **due motivi di fosforilazione**.
- ✚ Le code reclutano proteine quali la **talina**, che **si lega ai filamenti di actina**, con ciò collegando le integrine al citoscheletro di actina.
- ✚ **Le interazioni integrine-citoscheletro sono essenziali per l'attivazione delle integrine.**

Coombe & Dye. In: Cell Adhesion Molecules, CRC Press

## Legame integrina-ligando (1)

- ✚ Le integrine possono **legarsi a cationi divalenti** mediante due domini diversi:  **$\alpha A$**  e  **$\beta A$** .
- ✚ Il dominio  $\alpha A$  si trova nelle catene  $\alpha$  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 11$ ,  $\alpha M$ ,  $\alpha X$  e  $\alpha D$ ) e quando presente **media il legame con i cationi**.
- ✚ Se il dominio  $\alpha A$  è assente, il legame con il catione ha luogo mediante il dominio  $\beta A$  che si trova in tutte le catene  $\beta$ .
- ✚ **La tasca di legame con il ligando si forma all'interfaccia fra le lame 2 e 3 del dominio a elica della subunità  $\alpha$  e il dominio  $\beta A$  della catena  $\beta$ .**
- ✚ Il suo orientamento si altera leggermente a seconda che la subunità  $\alpha$  abbia o meno il dominio  $\alpha A$ .

Coombe & Dye. In: Cell Adhesion Molecules, CRC Press

## Legame integrina-ligando (2)

- Le integrine sono classificate a seconda della **presenza** o **assenza** del **dominio  $\alpha A$** .
- Quattro **catene  $\alpha$  contenenti  $\alpha A$**  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 10$  e  $\alpha 11$ ) si combinano con  $\beta 1$  per dare una **sottofamiglia** distinta di **legame con laminina/collagene**.
- Le **integrine non contenenti  $\alpha A$**  ( $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 1$  e  $\alpha 6\beta 4$ ) sono **recettori selettivi per la laminina** (glicoproteina della lamina basale) e si legano a **siti** sulla laminina **diversi** da quelli a cui si legano le integrine contenenti il dominio  $\alpha A$ .
- Le integrine  $\alpha V$  e  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$  e  $\alpha III\beta 3$  **riconoscono la sequenza RGD (arginina-glicina-aspartato)**, che è importante per il legame delle integrine alla **fibronectina, vitronectina e collagene**.

Coombe & Dye. In: Cell Adhesion Molecules, CRC Press

Seminario

## Legame integrina-ligando (3)

- Nonostante molte integrine che si legano a RGD interagiscano con gli **stessi ligandi**, esse si legano con **affinità diverse**, riflettendo la precisione dell'incastro del motivo **RGD** con le tasche di legame con il ligando, creati dalle diverse combinazioni tra catene  $\alpha$  e  $\beta$ .
- Le integrine  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 7$ ,  $\alpha 9\beta 1$  e  $\alpha E\beta 7$  riconoscono un motivo acido **LDV** (leucina - acido aspartico - valina) che si trova nella fibronectina e in alcuni membri della IgSF.
- Le integrine  $\beta 2$  ( $\alpha D\beta 2$ ,  $\alpha L\beta 2$ ,  $\alpha M\beta 2$  e  $\alpha X\beta 2$ ) si legano ad un motivo **LEV** simile, in cui l'acido aspartico (D) è sostituito dal **glutamato** (E).

Coombe & Dye. In: Cell Adhesion Molecules, CRC Press

Composizione delle subunità	Principale distribuzione cellulare	Ligandi
$\alpha 1\beta 1$	Molti tipi cellulari	Soprattutto collagene
$\alpha 2\beta 1$	Molti tipi cellulari	Soprattutto collagene; anche laminine
$\alpha 3\beta 1$	Molti tipi cellulari	Laminine
$\alpha 4\beta 1$	Cellule emopoietiche	Fibronectina; <b>VCAM-1</b>
$\alpha 5\beta 1$	Fibroblasti	Fibronectina
$\alpha 6\beta 1$	Molti tipi cellulari	Laminine
$\alpha L\beta 2$	Linfociti I	<b>ICAM-1; ICAM-2</b>
$\alpha M\beta 2$	Monociti (precursori macrofagi)	Proteine sieriche (es. C3b; fibrinogeno, fattore X); <b>ICAM-1</b>
$\alpha IIb\beta 3$	Piastrine	Proteine sieriche (es. fibrinogeno, fattore di von Willebrand, vitronectina, fibronectina)
$\alpha 6\beta 4$	Cellule epiteliali	Laminina

Le famiglie di integrine sono suddivise in subfamiglie che hanno in comune la subunità  $\beta$ . I ligandi illustrati in rosso sono CAMs; tutti gli altri sono proteine della matrice extracellulare o del siero. Alcune subunità possono avere isoforme dovute a splicing alternativo con differenti domini citosolici.

Lodish et al., 7° ed.

## Tipi di integrina (2)

- La **subunità  $\beta 1$**  forma dimeri con almeno 12 distinte subunità  $\alpha$  e si trovano in quasi tutte le cellule dei vertebrati:  $\alpha 5\beta 1$  è un recettore per la fibronectina e  $\alpha 6\beta 1$  è un recettore per la laminina.
- La **subunità  $\beta 2$**  forma dimeri con almeno 4 tipi di subunità  $\alpha$  ed è espressa **esclusivamente sulla superficie dei leucociti**, dove gioca un ruolo fondamentale nel **combattimento alle infezioni**.
- Le integrine con  $\beta 2$  mediano **interazioni cellula-cellula**, piuttosto che cellula-matrice, legandosi a ligandi specifici su un'altra cellula: es. cellule endoteliale.
- I ligandi delle integrine  $\beta 2$  sono molecole di adesione della superfamiglia delle immunoglobuline**: ad es la  $\alpha L\beta 2$  (LFA-1) dei leucociti si lega saldamente alla **ICAM1** sull'endotelio vascolare nei siti di infezione.
- «**Leukocyte Adhesion Deficiency**» (LAD): patologia genetica in cui non vengono sintetizzate le subunità  $\beta 2$ ; i pazienti subiscono infezioni batteriche ricorrenti.

Alberts

## Tipi di integrina <sup>(3)</sup>

- ✚ Le **integrine  $\beta 3$**  si trovano nelle **piastrine** (ma anche in altri tipi cellulari) e si legano a diversi tipi di proteine della matrice, incluso il fattore di coagulazione **fibrinogeno** (le piastrine devono interagire con il fibrinogeno per mediare i processi normali di coagulazione).
- ✚ Glanzemann's disease: deficit genetico di subunità  $\beta 3$ : coagulazione inefficace, eccessivo sanguinamento.

Alberts

## TIPI DI INTEGRINA IN TIPI CELLULARI DIFFERENTI

**Vedi sito:**  
<http://www.imgt.org/IMGTEducation/Tutorials/Integrins/>

## Catene $\beta_1$

- ✚ Formano dimeri con 9 tipi di catena  $\alpha$  (si trovano in quasi tutte le cellule dei Vertebrati):
  - $\alpha_5\beta_1$ : recettore per la fibronectina (**VLA**)
  - $\alpha_6\beta_1$ : recettore per la laminina.
- ✚ Nei leucociti il più importante membro della subfamiglia delle integrine  $\beta_1$  è il **Very Late Antigen-4 (VLA-4, CD49d/CD29,  $\alpha_4\beta_1$ )**. **Il VLA-4 si lega al suo ligando VCAM-1, ed è il principale responsabile dell'adesione dei linfociti all'endotelio vascolare e del reclutamento dei leucociti alle zone infiammate.**

Pharmigen/Transduction Laboratories: cell Adhesion Molecules

## Catene $\beta_2$ ( $\alpha$ )

- ✚ Le integrine  $\beta_2$  sono espresse esclusivamente dai **leucociti** e subiscono un'alterazione conformazionale che coinvolge la **fosforilazione della subunità  $\beta$**  nel processo di **attivazione**.
- ✚ Tuttavia, questa fosforilazione non è né necessaria né sufficiente per l'attivazione conformazionale.
- ✚ Lo stato di attivazione è controllato dal sito GFFKR (Gly-Phe-Phe-Lys-Arg) immediatamente adiacente al dominio transmembrana della catena  $\alpha$ .

Pharmigen/Transduction Laboratories: cell Adhesion Molecules

Seminario

**INTEGRINE  $\beta_2$  (CD18) <> Leucociti**

- ✚ Formano eterodimeri con 4 differenti catene  $\alpha$ :  $\alpha_L$  (CD11a),  $\alpha_M$  (CD11b),  $\alpha_X$  (CD11c) e  $\alpha_D$ .
- ✚ Al contrario delle altre subfamiglie di integrine, l'espressione delle integrine  $\beta_2$  si riscontra solo nei leucociti.
- ✚ Ruolo fondamentale nella lotta alle infezioni
- ✚ Mediano soprattutto interazioni cellula – cellula
- ✚ Si legano a legandi specifici sulla superficie di altre cellule (controrecettori), membri della superfamiglia delle immunoglobuline delle CAMs.

Pharmigen/Transduction Laboratories: cell Adhesion Molecules

Seminario

**MAC-1 ( $\alpha_M\beta_2$ ):**

- Espresso ad alti livelli sui monociti e granulociti e a livelli più bassi su un sotto-insieme di linfociti T
- L'attivazione dei monociti e dei granulociti da parte degli stimoli infiammatori porta alla mobilitazione dei depositi intracellulari di Mac-1 e ad un rapido aumento della sua espressione sulla superficie cellulare.
- Si lega alla componente iC3b del complemento, al fibrinogeno, al fattore X della cascata della coagulazione e a ICAM-1.
- L'interazione di Mac-1 con iC3b media la fagocitosi dei bersagli opsonizzati.
- E' inoltre coinvolto nella migrazione transendoteliale dei monociti e dei neutrofilii

<http://bme.virginia.edu/ley/mac-1.html>



## Seminario

**P150,95 ( $\alpha_x\beta_2$ ) :**

- Espresso soprattutto dalle cellule dendritiche, monociti, macrofagi e granulociti
- Si trova anche a livelli più bassi sulle cellule NK e cellule T attivate.
- Si lega a iC3b, ICAM-1, fibrinogeno, e al polisaccaride della parete dei batteri Gram negativi.
- L'interazione di  $\alpha_x\beta_2$  a ligandi ancora sconosciuti è importante per l'adesione di monociti e neutrofili all'endotelio infiammato e può essere coinvolta nell'attività citotossica delle cellule T.

Pharmigen/Transduction Laboratories: cell Adhesion Molecules

## Seminario

 **$\alpha_D\beta_2$** 

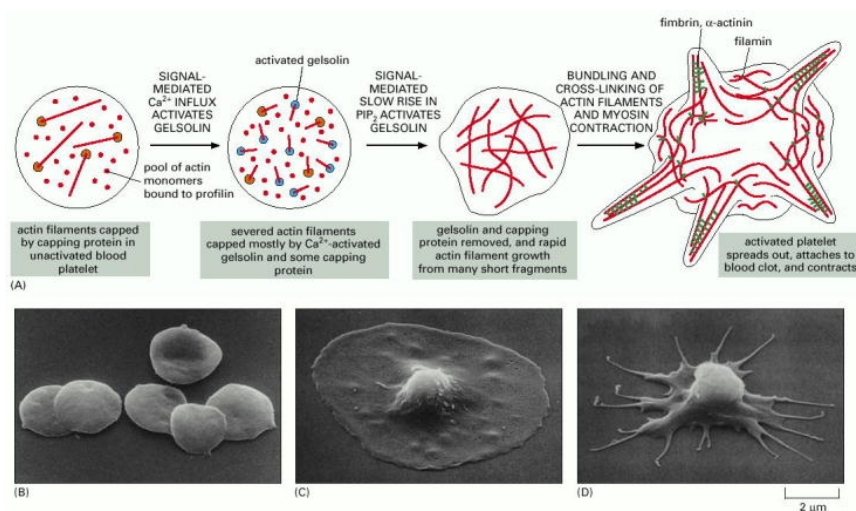
- Espressa in alti livelli dai macrofagi della polpa rossa della milza e dalle cellule schiumose delle strisce grasse che si formano sulla parete dell'aorta nei processi di aterosclerosi
- E' espressa a livelli più bassi da sub-tipi di leucociti del sangue periferico
- Si lega a ICAM-3 ma non a ICAM-1 o a VCAM-1.

Pharmigen/Transduction Laboratories: cell Adhesion Molecules

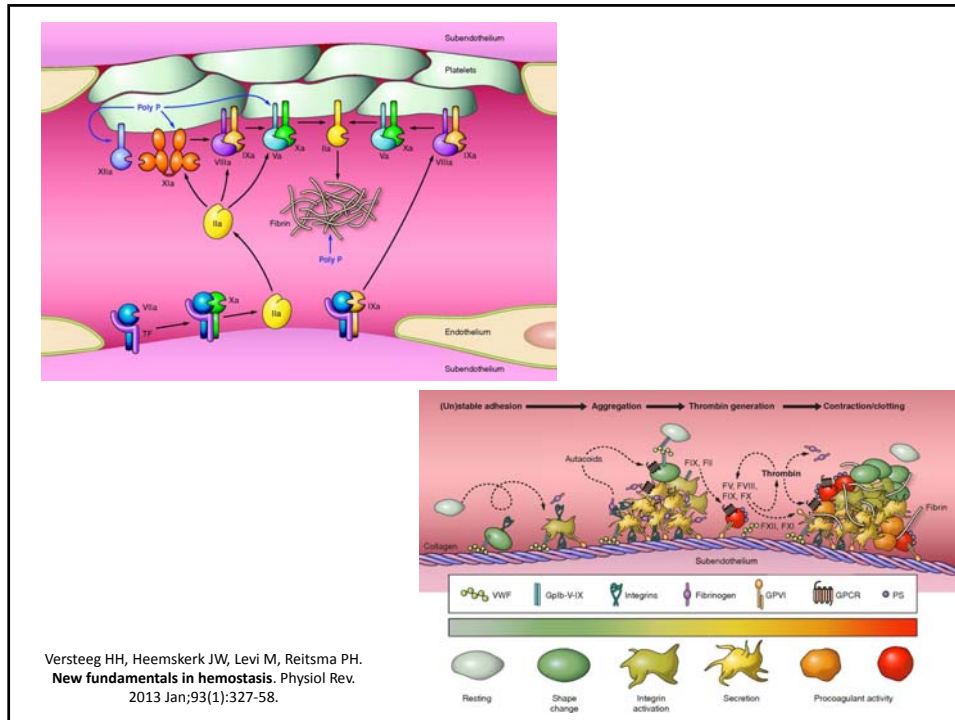
## Catene $\beta_3$

- Sono espresse da diversi tipi cellulari (es. **piastrine**)
- Si legano a diverse proteine della matrice extracellulare, incluso fibrinogeno nel processo di coagulazione del sangue
- **Malattia di Glanzmann**: deficienza di catene  $\beta_3$ , eccessivo sanguinamento.

Pharmigen/Transduction Laboratories: cell Adhesion Molecules



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26809/figure/A3032/?report=objectonly>



## Seminario

### Recettore $\alpha_{IIb}\beta_3$

- è espresso costitutivamente nelle piastrine.
- Mentre  $\alpha_{IIb}\beta_3$  delle piastrine non stimolate si può legare soltanto al fibrinogeno, la  $\alpha_{IIb}\beta_3$  delle piastrine attivate è in grado di legarsi al fibrinogeno, fattore di von Willebrand, fibronectina, vitronectina e trombospondina.
- L'adesione mediata da  $\alpha_{IIb}\beta_3$  gioca un ruolo critico nell'aggregazione ed attivazione delle piastrine.
- L'attivazione piastrinica è accompagnata da una modificazione conformazionale di  $\alpha_{IIb}\beta_3$  e il legame con il ligando induce un'ulteriore alterazione della conformazione.

## Seminario

**Recettore  $\alpha_v\beta_3$** 

- Espresso su una gran varietà sia di cellule emopoietiche che non-emopoietiche, che includono cellule endoteliali, monociti, macrofagi, neutrofili, piastrine, alcuni linfociti attivati, cellule muscolari lisce, osteoclasti e cellule tumorali.
- Si lega alla vitronectina, fibrinogeno, fibronectina, fattore di von Willebrand e trombospondina
- E' coinvolto nel legame di piastrine e leucociti all'endotelio.

Pharmigen/Transduction Laboratories: cell Adhesion Molecules

## Seminario

**INTEGRINE  $\beta_4$ -  $\beta_8$** 

- ✚ L'integrina  $\beta_4$  (CD104) forma un eterodimero con la subunità  $\alpha_6$  (CD49f) che si lega alla laminina.
- ✚ E' espressa dalle cellule epiteliali, sotto-insieme di cellule endoteliali, e sotto-insieme di timociti immaturi del topo.
- ✚ Le subunità  $\beta_5$ ,  $\beta_6$  e  $\beta_8$  formano eterodimeri con  $\alpha_v$ .
- ✚ La subunità  $\beta_7$  si può combinare con le subunità  $\alpha_4$  e  $\alpha_{IEL}$ .
- ✚ L'eterodimero  $\alpha_4\beta_7$  è espresso dalle cellule NK, eosinofili e dalla maggior parte dei linfociti maturi e può legarsi alla fibronectina, VCAM-1 e MAdCAM-1.
- ✚ L'integrina  $\alpha_{IEL}\beta_7$  è espressa dalla maggior parte dei linfociti intraepiteliali ed interagisce con la E-caderina alla superficie delle cellule epiteliali delle mucose.

Pharmigen/Transduction Laboratories: cell Adhesion Molecules

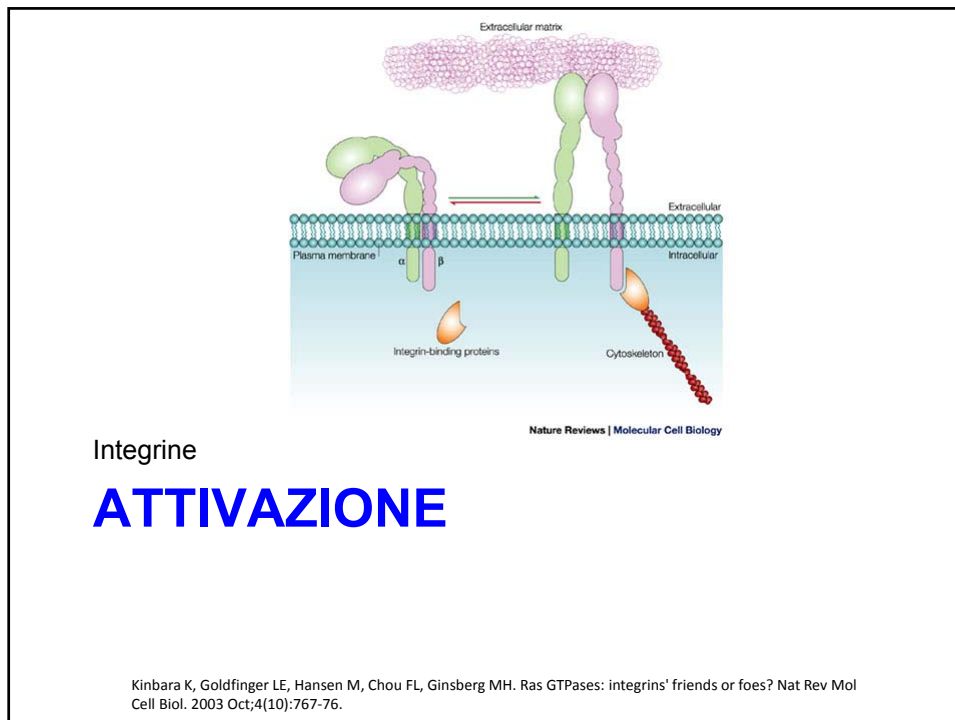
### Integrina $\alpha_6\beta_4$ - [1]

- ✚ L'integrina  $\alpha_6\beta_4$  è espressa da diversi tipi cellulari: timociti immaturi, **epiteli squamosi**, sottotipi di cellule endoteliali, cellule di Schwann e anche in fibroblasti nel sistema nervoso periferico.
- ✚ Negli epitelii stratificati come la pelle, la  **$\alpha_6\beta_4$**  si concentra in strutture dense dette **emidesmosomi**.
- ✚ Gli emidesmosomi sono coinvolti nel **collegamento delle cellule basali alla sottostante lamina basale**.
- ✚ Questo è svolto mediante **collegamento dei filamenti intermedi alla matrice extracellulare** mediati da questa integrina.
- ✚ Tutte le altre integrine usano i filamenti di actina per questo scopo invece dei filamenti intermedi.

<http://www.imgt.org/IMGTEducation/Tutorials/Integrins/>

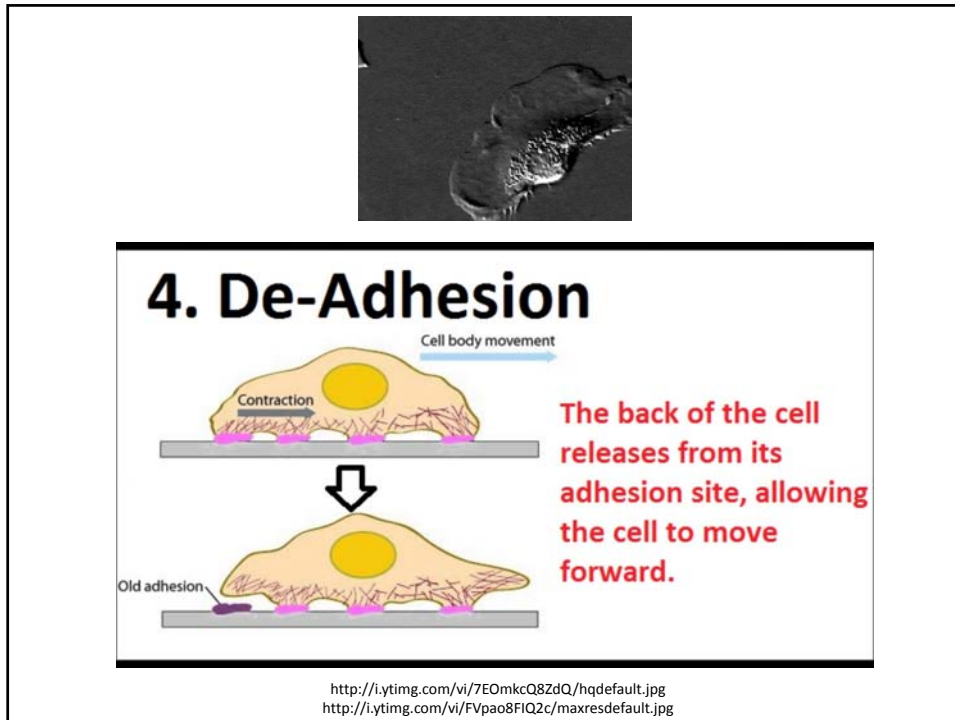
### Integrina $\alpha_6\beta_4$ - [2]

- ✚ I ligandi per l'integrina  $\alpha_6\beta_4$  sono le **laminine 1 e 5**, ma l'affinità per la laminina 5 è molto più forte.
- ✚ Negli emidesmosomi la  $\alpha_6\beta_4$  è collegata alla laminina-5.
- ✚ Le diverse varianti di splicing di  $\alpha_6\beta_4$  non influenzano la specificità per un ligando dell'integrina.
- ✚ In topi knock-out per  $\alpha_6$  o per  $\beta_4$  non si formano emidesmosomi, il che suggerisce che la  $\alpha_6\beta_4$  sia necessaria per la formazione oppure per l'inizio della formazione degli emidesmosomi: i topi mostravano gravi processi di vescicolazione e morivano subito dopo la nascita.



### LE INTEGRINE POSSONO CAMBIARE DA UNA CONFORMAZIONE ATTIVA AD UNA INATTIVA - [1]

- ✚ Una cellula che **striscia** in un tessuto – ad es. un fibroblasto o un macrofago o una cellula epiteliale che ha subito una transizione epitelio-mesenchimale e migra lungo la lamina basale – deve essere **in grado** sia di **stabilire** che di **rompere** i **collegamenti con la matrice**, e di farlo rapidamente in modo da viaggiare rapidamente.
- ✚ Allo stesso modo, un leucocita circolante deve essere in grado di attivare che di disattivare la sua capacità di legarsi alle cellule endoteliali in modo da strisciare fuori da un vaso sanguigno in un sito di infiammazione, nelle circostanze appropriate. Inoltre, se si deve **applicare** delle **forze** laddove esse sono richieste, **il fare e disfare dei collegamenti extracellulari in tutti questi casi devono essere accoppiati all'assemblaggio e al disassemblaggio rapido dei collegamenti al citoscheletro all'interno della cellula.**



### LE INTEGRINE POSSONO CAMBIARE DA UNA CONFORMAZIONE ATTIVA AD UNA INATTIVA - [2]

- Le molecole di integrine che attraversano la membrana e mediano i collegamenti non possono essere oggetti semplicemente passivi ed inerti con porzioni appiccicose ad entrambe le estremità.
- Esse debbono essere in grado di **alternare fra un stato attivo in cui rapidamente formano collegamenti e uno stato inattivo in cui non lo fanno**; inoltre, **il collegamento con i loro ligandi da un lato della membrana deve alterare la propensione a legare un diverso insieme di ligandi dall'altro lato.**

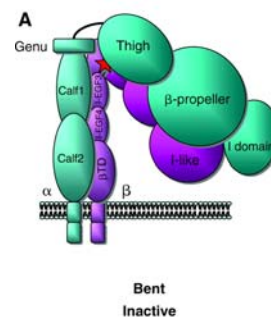
### LE INTEGRINE POSSONO CAMBIARE DA UNA CONFORMAZIONE ATTIVA AD UNA INATTIVA -[3]

- La base di questi fenomeni dinamici é la **regolazione allosterica**; quando un integrina si lega o si distacca dai suoi ligandi, essa subisce dei cambiamenti conformazionali che influenzano sia le estremità **intra**cellulari che **extra**cellulari della molecola.
- Le alterazioni strutturali da una parte sono accoppiate ad alterazioni strutturali dall'altra, cosicchè **le influenze possono essere trasmesse in qualsiasi direzione attraverso la membrana cellulare**.

Alberts et al., 2015

### LE INTEGRINE POSSONO CAMBIARE DA UNA CONFORMAZIONE ATTIVA AD UNA INATTIVA -[4]

- Le integrine esistono in molteplici conformazioni strutturali che riflettono i diversi stati di attività.
- Nello stato **INATTIVO** i segmenti esterni del dimero sono ripiegati formando una struttura compatta che non è in grado di legarsi alle proteine della matrice,
- In questo stato le code del dimero sono agganciate una all'altra, impedendo la loro interazione con le proteine di collegamento con il citoscheletro.



Evans, 2009:  
<http://jcs.biologists.org/content/122/2/215/F1.large.jpg>

Alberts et al., 2015

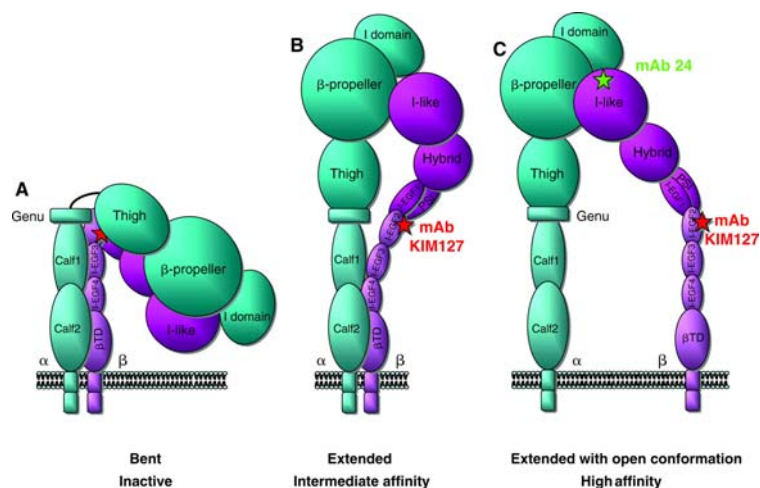


## LE INTEGRINE POSSONO CAMBIARE DA UNA CONFORMAZIONE ATTIVA AD UNA INATTIVA -[5]

- ✚ Nello stato **ATTIVO**, le subunità sono staccate nella zona della membrana e sono in grado di **esporre i siti intracellulari di legame per le proteine adattatrici citoplasmatiche**, mentre il **sito extracellulare** si dispiega e si **stende**, formando come un paio di gambe, **esponendo un sito ad alta affinità per le proteine della matrice** nelle estremità delle subunità.
- ✚ Quindi, il **passaggio fra stati inattivo e attivo** dipende da **alterazioni conformazionali** importanti che simultaneamente espongono i siti di legame intracellulari ed extracellulari alle due estremità delle molecole di integrine.

Alberts et al., 2015

### Conformazioni inattiva e attiva (a)

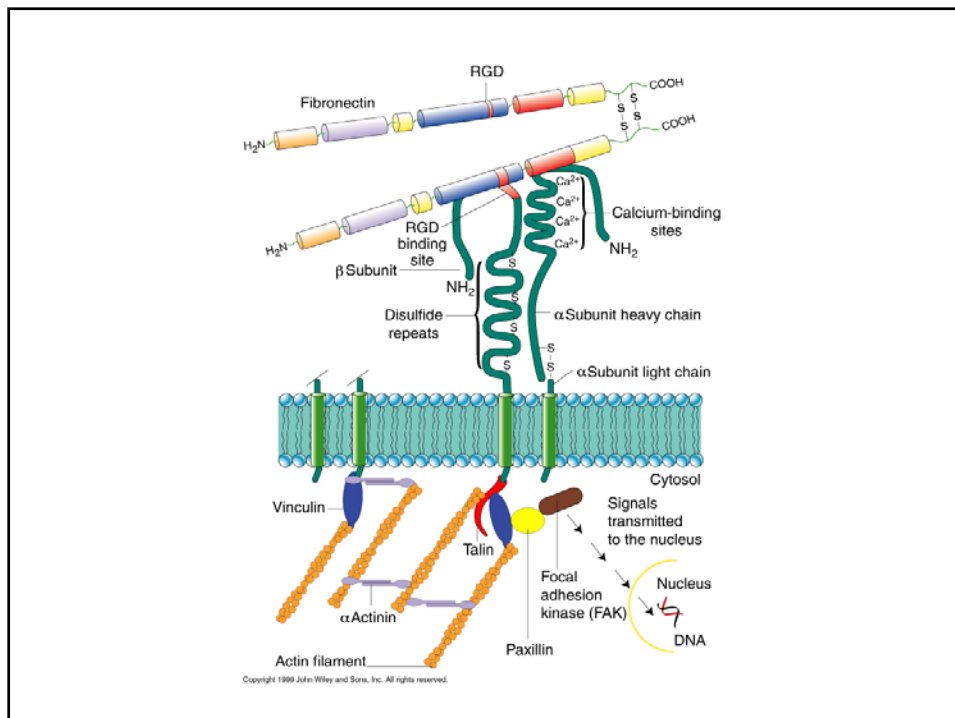


Evans, 2009: <http://jcs.biologists.org/content/122/2/215/F1.large.jpg>

## ATTIVAZIONE «OUTSIDE-IN»

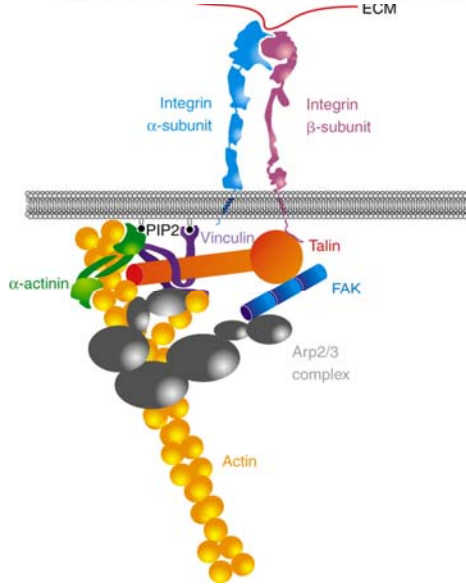
- Il **collegamento con una proteina della matrice extracellulare** (es. sequenza RGD del fibrinogeno) **può portare alcune integrine a passare dallo stato da uno stato inattivo a bassa affinità ad uno stato attivo ad alta affinità**.
- Come risultato, **i siti di legame** per la **talina** e altre **proteine adattatrice citoplasmatiche** vengono **esposti sulla coda della subunità  $\beta$** .
- Il legame con queste proteine adattatrici porta al **collegamento con i filamenti di actina** nell'estremità intracellulare della molecola di integrina.
- In questo modo, quando la cellula fa presa con il suo ligando fuori dalla cellula, la cellula reagisce collegando la molecola di integrina al citoscheletro, in modo tale che si possa applicare forza in quel punto di collegamento.

Alberts et al., 2015

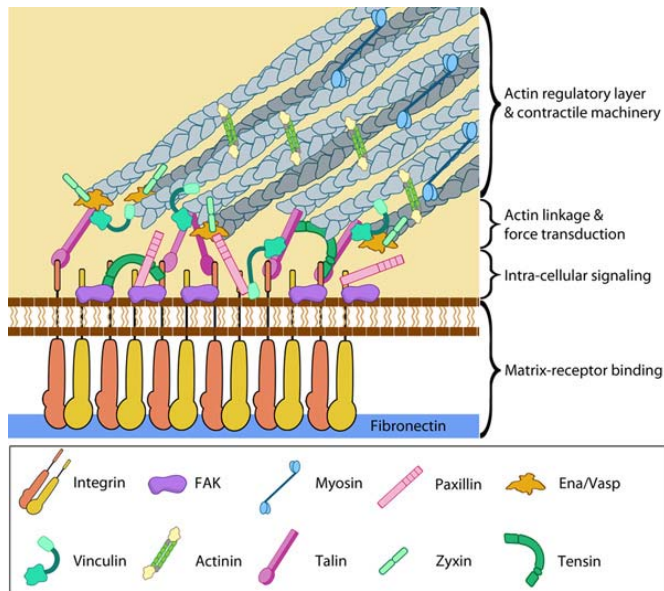


## Integrins in cell migration – the actin connection

Miguel Vicente-Manzanares<sup>1,\*</sup>, Colin Kiwon Choi<sup>1,2</sup> and Alan Rick Horwitz<sup>1</sup>



Vicente-Manzanares M, Choi CK, Horwitz AR. Integrins in cell migration—the actin connection. *J Cell Sci.* 2009 Jan 15;122(Pt 2):199-206.



[http://www.mechanobio.info/topics/methods/super-resolution-microscopy-intro/7\\_super-resolution-microscopy](http://www.mechanobio.info/topics/methods/super-resolution-microscopy-intro/7_super-resolution-microscopy)

## ATTIVAZIONE «INSIDE-OUT» - [1]

- ✚ L'attivazione inside-out delle integrine di solito dipende da segnali regolatori intracellulari che stimolano la capacità della talina e di altre proteine di interagire con la coda della subunità  $\beta$ .
- ✚ La **talina compete con la catena  $\alpha$  dell'integrina** per il **sito legame sulla coda della subunità  $\beta$** .
- ✚ Quindi, **quando la talina si lega alla catena  $\beta$ , blocca il collegamento  $\alpha$ - $\beta$  intracellulare** permettendo alle due gambe della molecola di integrina di separarsi.

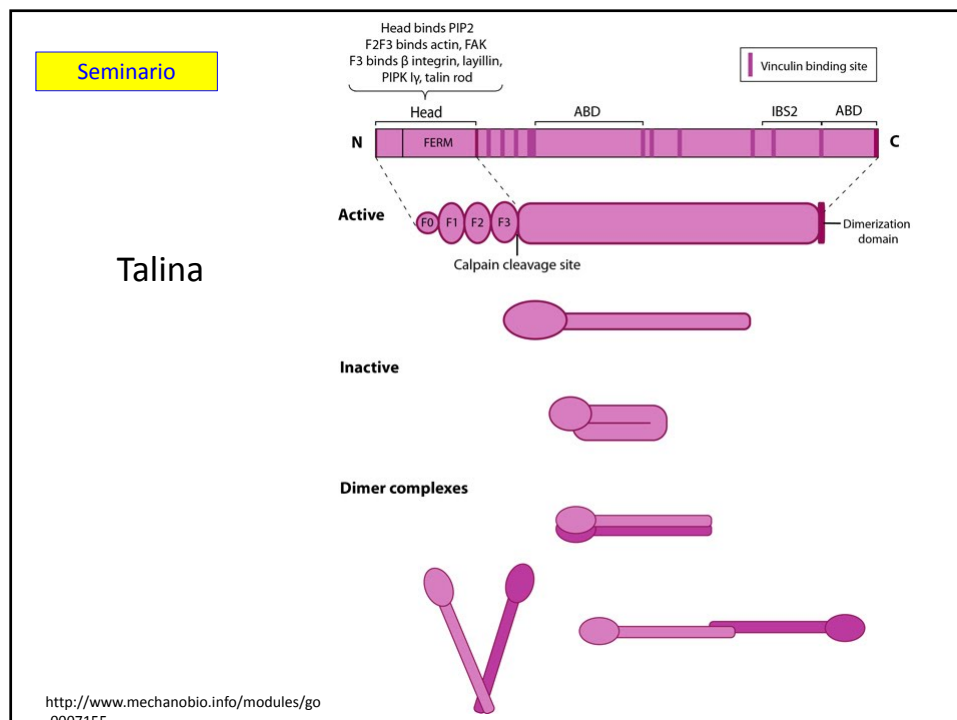
Alberts et al., 2015

- ✚ Questa attivazione “**inside-out**” viene scatenata da **molecole regolatorie intracellulari**. Queste includono il **fosfoinositide  $PIP_2$** , che si ritiene sia in grado di **attivare la talina** in modo tale che **essa si lega in modo forte alla catena  $\beta$  dell'integrina**. In questo modo, un segnale generato all'interno della cellula scatena un processo tramite il quale le molecole di integrina afferrano e si collagano saldamente ai loro ligandi extracellulari.
- ✚ Le molecole intracellulari come il  $PIP_2$  sono esse stesse prodotte in **risposta a segnali ricevuti dall'esterno** della cellula mediante altri tipi di recettori di superficie, quali i **recettori accoppiati a proteine G** e i **recettori ad attività tirosina chinasi**, che possono quindi controllare l'attivazione delle integrine.
- ✚ Viceversa, **l'attivazione delle integrine mediante legame alla matrice può influenzare il ricevimento dei segnali mediati da altre vie di signalling**. L'interazione di tutte queste vie di comunicazione, trasmettendo i segnali in entrambe le direzioni attraverso la membrana cellulare, permette che abbiano luogo interazioni complesse fra la cellula e il ambiente fisico-chimico.

## ATTIVAZIONE «INSIDE-OUT» - [3]

- ✚ Nelle **piastrine** una proteina segnale extracellulare, la trombina, si collega ad un recettore accoppiato ad una proteina G (GPCR) sulla superficie cellulare e con ciò attiva una via di segnalamento intracellulare che porta all'attivazione delle integrine.
- ✚ E' probabile che vie di segnalamento simili portino all'attivazione delle integrine in molti altri tipi cellulari.

Alberts et al., 2015



## Seminario

**Talina (p235)** - [1]

- ✚ Fornisce un **collegamento** tra i microfilamenti di **actina**.
- ✚ E' una proteina di dimensioni abbastanza grandi (MW 270 kDa; 235 kDa nei gel, donde il nome originario di **p235**).
- ✚ **Nuclea l'assemblaggio di actina** e **si lega alla vinculina** oltre che a un gran numero di proteine leganti l'actina e altre proteine soprattutto nelle adesioni focali.
- ✚ Oltre che legarsi alla vinculina, che di per se si associa ai lipidi, la talina è anche in grado di legarsi direttamente ai lipidi.

<http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/Encyclop/Abp-t/Talin.htm>

## Seminario

**Talina** - [2]

- ✚ E' una proteina dimerica testa-coda che adotta una forma a manubrio.
- ✚ E' facilmente digerita (trombina, calpaina II) in due domini di 47 kDa e di 200 kDa.
  - Il frammento di 47 kDa è il **N-terminale** e **si lega a lipidi anionici (PIP2)**
  - La **coda C-terminale** di maggiori dimensioni forma un gran numero di ripetizioni.
- ✚ Si ritiene che contenga tre **siti diversi di legame con l'actina**.
- ✚ Il rapporto della talina con l'actina è complesso:
  - Da una parte riduce la lunghezza dei filamenti di actina e la viscosità delle soluzioni di actina.
  - Dall'altro è in grado di nucleare l'assemblaggio dell'actina.
  - L'interazione actina-talina è molto sensibile al pH.

<http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/Encyclop/Abp-t/Talin.htm>

## Seminario

Talin-binding protein	Function
<a href="#">actin</a>	component of microfilaments
<a href="#">pp125<sup>FAK</sup></a>	A tyrosine protein kinase
<a href="#">layilin</a>	A trans-membranous glycoprotein
<a href="#">vinculin</a>	pivotal component of the focal contact
<a href="#">b-integrin</a>	Trans-membranous adhesion protein
<a href="#">Myosin II</a>	Contractile protein
<a href="#">Dystrophin</a>	Giant protein absent in Duchenne Muscular Dystrophy .

**Table 1 Talin binding partners**

<http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/Encyclop/Abp-t/Talin.htm>

## Le integrine si aggregano per formare siti di adesione forti – [1]

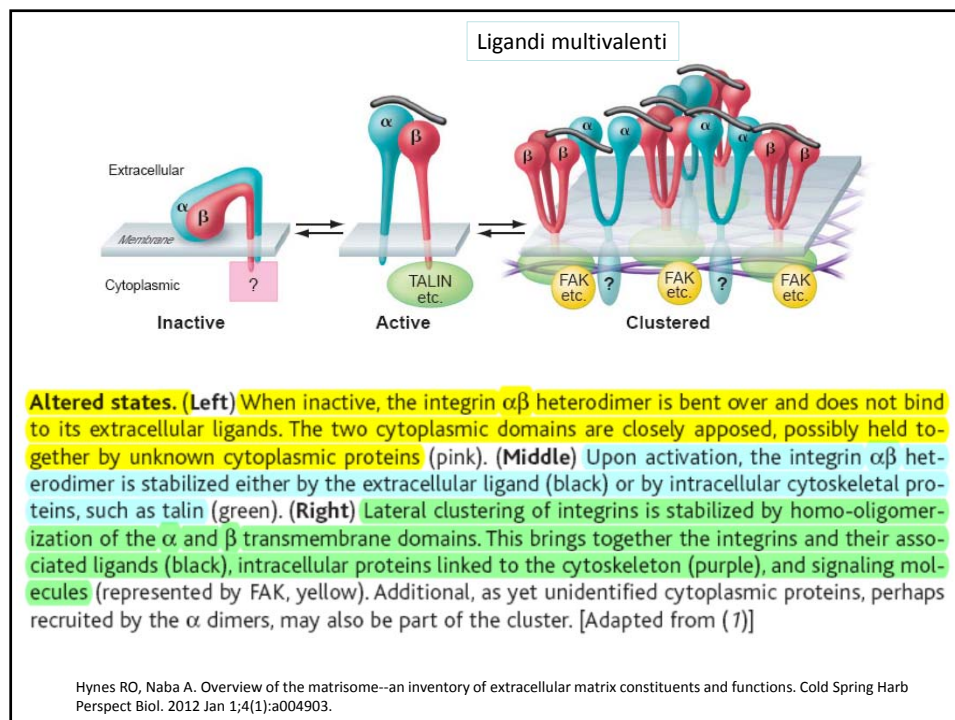
- ✚ Come le altre molecole di adesione, le integrine differiscono dai recettori per ormoni e altri segnali solubili in quanto di solito **si legano al loro ligando con minore affinità**, mentre sono presenti in **concentrazioni da 10-100 volte superiori** con un effetto tipo-Velcro.
- ✚ In seguito alla loro attivazione le integrine formano **aggregati**, creando una placca densa in cui **molte molecole d integrina sono ancorate al citoscheletro**.
- ✚ La struttura proteica risultante può essere notevolmente ampia e complessa: es. **adesioni focali** formate da fibroblasti in una piastra di coltura rivestita da fibronectina.

Alberts et al., 2015

## Definizioni

- + **Affinità:** forza di legame tra una integrina singola e il suo ligando. Questa può essere alterata da alterazioni conformazionali nella struttura dell'integrina.
- + **Avidità:** misura della forza complessiva di legame di integrine aggregate.

Evans R, Patzak I, Svensson L, De Filippo K, Jones K, McDowall A, Hogg N. Integrins in immunity. *J Cell Sci.* 2009 Jan 15;122(Pt 2):215-25.





### Le integrine si aggregano per formare siti di adesione forti – [2]

- L'assemblaggio dei complessi giunzionali dipende dal reclutamento di dozzine di proteine «scaffold» e di segnalamento.
- La talina è il principale componente di molti complessi cellula-matrice, ma numerose altre proteine danno un contributo essenziale.
- Es: «Integrin-linked kinase» (ILK) e le sue partners di collegamento «pinch» e «parvin» che complessivamente formano un complesso trimero che funge come «hub» organizzativo in molti tipi di giunzioni.

Alberts et al., 2015

### Le integrine si aggregano per formare siti di adesione forti – [3]

- Le giunzioni cellula-matrice utilizzano inoltre diverse **proteine di collegamento con l'actina** (es vinculina, zyxin, VASP e  $\alpha$ -actinina) per **promuovere l'assemblaggio e organizzazione dei filamenti di actina**.
- Un altro componente estremamente importante di molte giunzioni cellula-matrice è la «**Focal Adhesion Kinase**» (**FAK**) che interagisce con diversi componenti delle giunzioni e svolge un'importante funzione di **segnalamento**.

Alberts et al., 2015

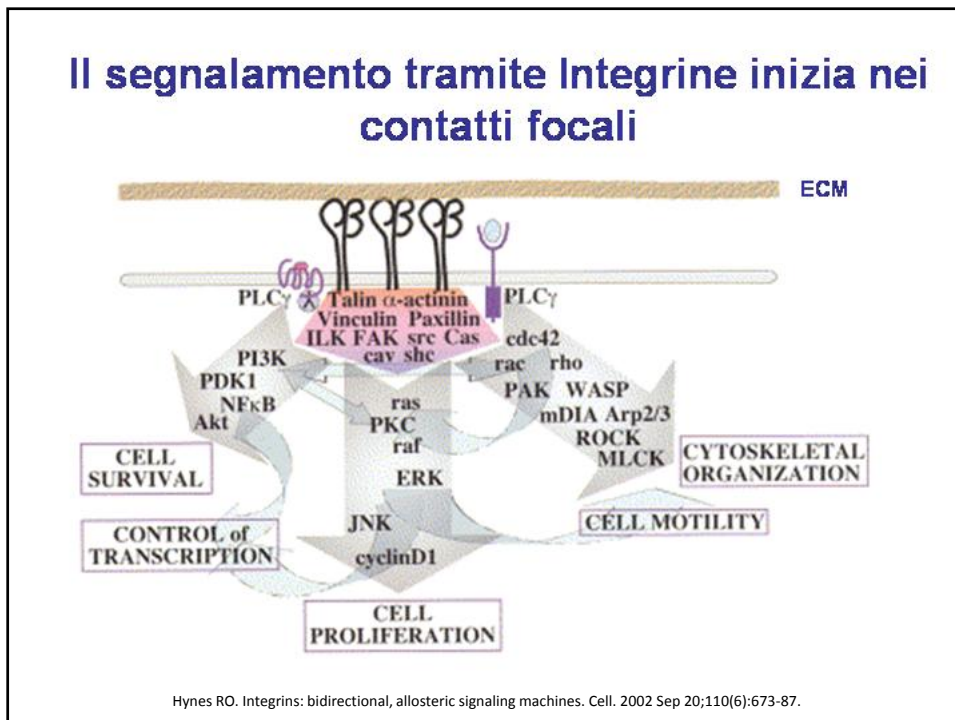
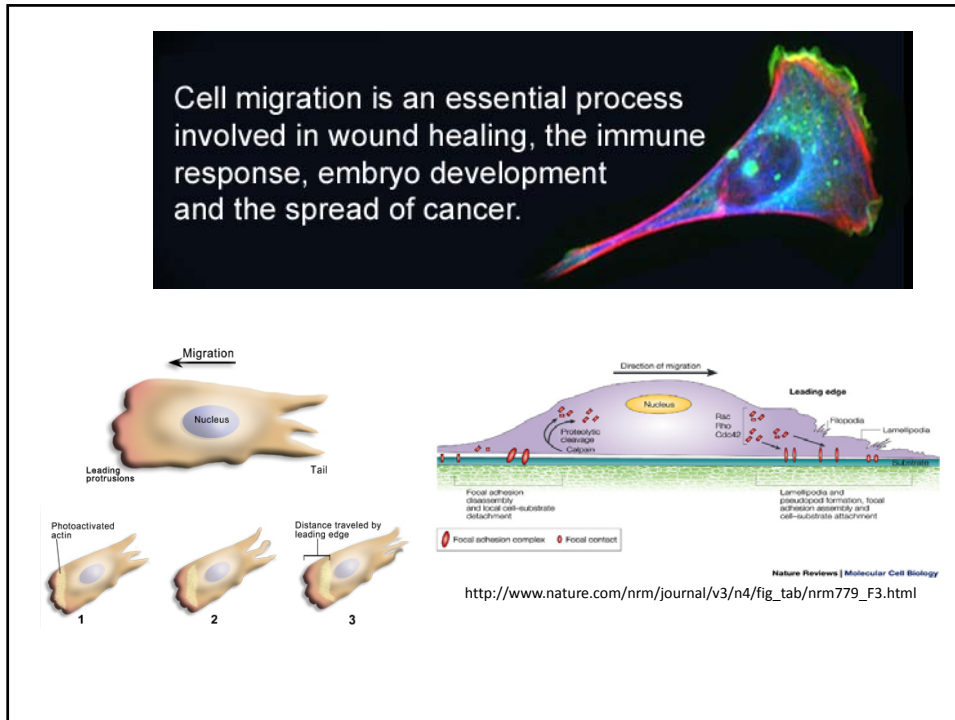
## SEGNALAMENTO MEDIATO DA INTEGRINE

- ✚ L'interazione delle integrine con la matrice extracellulare nei punti di contatto o di **adesioni focali** porta all'**aggregazione delle integrine** e al **reclutamento di molecole di segnalamento e di filamenti di actina ai domini citoplasmatici delle integrine**.
- ✚ L'adesione cellulare alla matrice di per può **attivare diverse molecole di segnalamento** che includono la "Focal Adhesion Kinase" (FAK), le MAP chinasi Erk e c-Jun kinase (JNKs) e i membri Rho della famiglia delle GTPasi, incluso RhoA, Rac1 e CDC42.
- ✚ Le integrine regolano **l'adesione cellulare**, lo "**spreading**" delle cellule sulla matrice, la **proliferazione**, la **sopravvivenza** (o **l'apoptosi**) e **alterazioni morfologiche** di diversi tipi cellulari (ad es. cellule epiteliali, endoteliali, fibroblasti e altri tipi di cellule mesenchimali).

Lee JW, Juliano R. Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. Mol Cells. 2004 Apr 30;17(2):188-202.

## Integrine/actina e trasduzione di segnale – [2]

- ✚ Il legame **integrine-actina** è molto importante per il funzionamento delle integrine sotto diversi aspetti:
  1. La polimerizzazione attiva dell'actina, la formazione di legami incrociati e l'ulteriore generazione di forza sono fondamentali per la **maturazione delle adesioni** mediate da integrine che si creano e sono di vita breve in adesioni focali stabili e in grado di trasmettere il segnale.
  2. E' richiesto per il preciso **controllo spazio-temporale delle protrusioni cellulari** e loro retrazione durante la migrazione cellulare.
  3. Permette alle cellule di adottare o modificare la loro **forma caratteristica**, ad esempio, per diventare polarizzate.
  4. E' critico per l'assemblaggio della matrice di fibronectina



Francavilla C, Maddaluno L, Cavallaro U. The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis. Semin Cancer Biol. 19:98-309, 2009.

- ✚ L'interazione con le proteine della matrice extracellulare (es. fibronectina e vitronectina) o con immunoglobuline sulle superficie cellulare [es. «intercellular adhesion molecule 1» (ICAM-1) e «vascular adhesion molecule-1» VCAM-1]] promuove l'**aggregazione** delle integrine e conseguente **trasduzione di segnale** mediata dalle integrine.
- ✚ In conseguenza del legame, le integrine (che non hanno attività enzimatiche o chinasiche specifiche) **attivano complesse vie di segnalamento** associandosi con chinasi e proteine adattatrici nei complessi delle **adesioni focali**.

- ✚ I **complessi delle adesioni focali**, identificati come strutture specializzate di adesione, sono composti da:

- **Integrine**
- **Proteina chinasi**, quali le «focal adhesion kinase», FAK, e il «non-receptor tyrosine kinase receptor Src
- **Proteine adattatrici** (es. Shc)
- **Intermediari di segnalamento** (es. famiglia Rho delle GTPasi)
- **Proteine citoscheletriche che legano l'actina** (es. talina, la  $\alpha$ -actinina, la paxillina, la tensina e la vinculina)
- Altre proteine di segnalamento.

- ✚ Il signaling mediato dalle integrine regola **l'espressione genica**, la **crescita cellulare**, il **differenziamento** e la **sopravvivenza**.

Francavilla C, Maddaluno L, Cavallaro U. The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis. Semin Cancer Biol. 19:98-309, 2009.

Francavilla C, Maddaluno L, Cavallaro U. The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis. Semin Cancer Biol. 19:98-309, 2009.

- Un'impedita regolazione del signaling mediato dalle integrine può contribuire alla progressione della malattia in diverse tipologie di patologie, che includono le malattie autoimmuni, le disfunzioni trombotiche e il cancro.

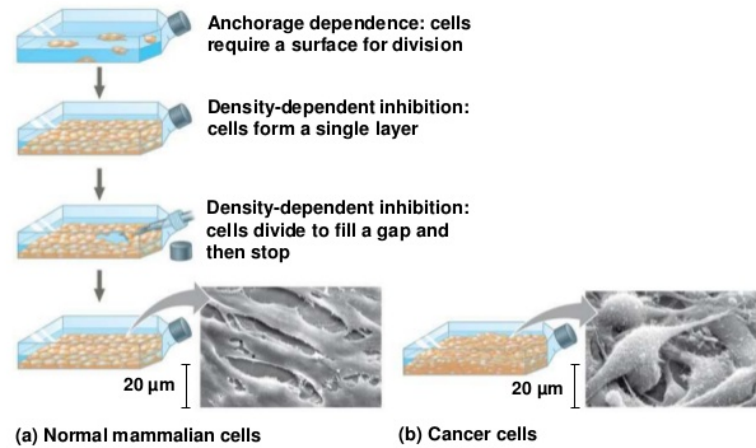
### I punti di collegamento con la matrice extracellulare controllano la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tramite integrine – [1]

- Oltre che a creare **collegamenti**, le integrine **attivano vie di segnalamento intracellulare** permettendo il **controllo di quasi tutti i comportamenti cellulari a seconda della natura della matrice circostante e dello stato delle cellule ad essa collegate**.
- *In vitro* **le cellule normali non crescono né proliferano a meno che non siano ancorate alla matrice extracellulare**: non bastano i nutrienti e i fattori di crescita nel mezzo di coltura.
- **Se perdono l'aggancio alla MEC vanno in apoptosi: DIPENDENZA DA ANCORAGGIO.**
- Mutazioni che annullano o disturbano questa forma di controllo sono comuni nella cellula tumorali e giocano un ruolo fondamentale nei processi di invasione.

Alberts et al., 2015

## Dipendenza o indipendenza da ancoraggio in cellule normali e tumorali

Figure 12.19



<https://classconnection.s3.amazonaws.com/662/flashcards/3330662/png/densitylabeled-13F880A838F181E700C.png>

## Le integrine reclutano proteine di segnalamento ai siti di adesione cellula-matrice

- I meccanismi tramite i quali le integrine segnalano verso l'interno della cellula sono complessi e coinvolgono diverse vie;
- Integrine e recettori convenzionali di segnalamento spesso si influenzano reciprocamente e regolano il comportamento cellulare.
- Ad es. la via **Ras/MAP kinase** può essere attivata sia da recettori convenzionali che da integrine, ma le cellule spesso hanno bisogno contemporaneamente di entrambi i tipi di stimolazione per raggiungere un'attivazione sufficiente da promuovere la proliferazione o la sopravvivenza cellulare.

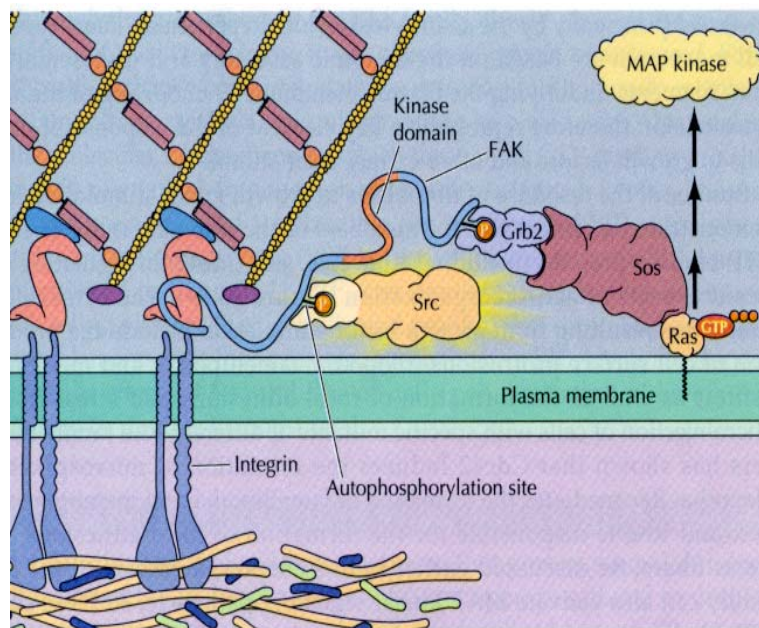
Alberts et al., 2015

## Segnalamento tramite FOCAL ADHESION KINASE (FAK)

- *In vitro* i siti di adesione focale sono spesso siti di fosforilazione di tirosina prominenti.
- **FAK**: principali **proteine fosforilate in tirosina delle adesioni focali**.
- Quando le integrine si aggregano nei siti di contatto cellula-matrice la FAK viene reclutata alla subunità  $\beta$  mediante molecole adattatrici quali la talina oppure la paxilina (che si lega a un tipo di subunità  $\alpha$ ).
- Le molecole di FAK aggregate si fosforilano una con l'altra su tirosina specifiche, creando un sito di ancoraggio di fosfotirosina per membri della famiglia Src di tirosina chinasi citoplasmatiche.
- Oltre a fosforilare altre proteine dei siti di adesione, le Src fosforilano le FAKs in siti aggiuntivi di tirosina, creando altri siti di ancoraggio per ulteriori proteine di segnalamento.
- In questo modo, il segnalamento dall'esterno mediato da integrine tramite le famiglie FAK e Src viene convogliato all'interno della cellula in un modo simile a quello dei recettori ad attività tirosina chinasi.

Alberts et al., 2015

## Integrin Signaling via Focal Adhesion Kinase







Seminario

## Focal adhesion kinases (FAKs) – [3]

- ✦ La **regione C-terminale** della FAK è ricca di siti di interazione proteina-proteina.
- ✦ Una sequenza con circa 100 residui di AA designata «FAT» (Focal Adhesion Targetting») indirizza la FAK verso complessi adesivi di nuova formazione o già formati.
- ✦ L'integrità di questa regione è essenziale per il segnalamento della FAK.
- ✦ Il dominio FAT è inoltre un sito di legame per la proteina delle adesioni focali **paxilina**.
- ✦ Poichè la paxilina si lega direttamente ai domini citoplasmatici dei recettori integrinici nonché alla proteina delle adesioni focali **vinculina**, la **paxilina può fungere da «docking partner» per la FAK nei complessi di adesione**.
- ✦ Il **dominio chinasi della FAK** condivide somiglianza di sequenza con altre tirosina chinasi sia recettoriali che non.

Parsons JT. Focal adhesion kinase: the first ten years. J Cell Sci. 2003 Apr 15;116(Pt 8):1409-16.

## I punti di adesione cellula-matrice rispondono a forze meccaniche – [1] (MECCANOTRASDUZIONE)

- Come le giunzioni cellula-cellula, anche **le giunzioni cellula-matrice sentono e rispondono alle forze meccaniche che agiscono su di esse**.
- La maggior parte delle giunzioni cellula-matrice è collegata da un anello contrattile di actina che tende a tirare le giunzioni verso l'interno, allontanandole dalla matrice.
- Quando le cellule sono collegate ad una **matrice rigida** che resiste fortemente a tali forze di trazione la **giunzione** è in grado di sentire la risultante alta tensione e di scatenare una risposta in cui **recluta integrine aggiuntive e altre proteine per aumentare la capacità della giunzione di resistere alla tensione**.
- Il collegamento di una cellula ad una **matrice** relativamente **morbida** genera meno tensione e quindi una risposta meno robusta.

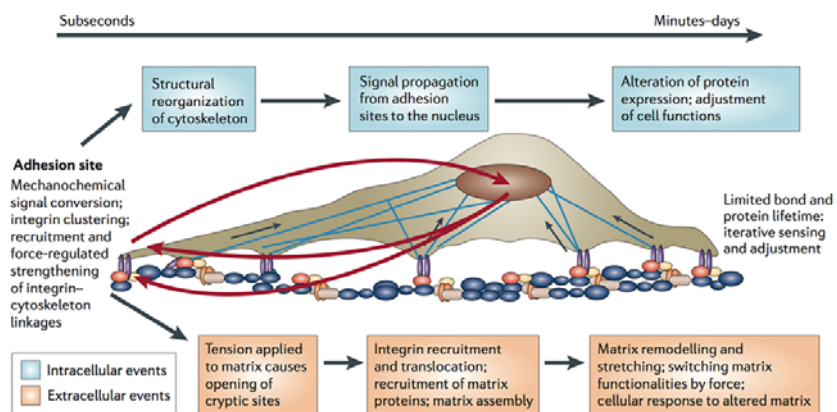
Alberts et al., 2015

# Local force and geometry sensing regulate cell functions

Viola Vogel\* and Michael Sheetz†

Abstract | The shapes of eukaryotic cells and ultimately the organisms that they form are defined by cycles of mechanosensing, mechanotransduction and mechanoresponse. Local sensing of force or geometry is transduced into biochemical signals that result in cell responses even for complex mechanical parameters such as substrate rigidity and cell-level form. These responses regulate cell growth, differentiation, shape changes and cell death. Recent tissue scaffolds that have been engineered at the micro- and nanoscale level now enable better dissection of the mechanosensing, transduction and response mechanisms.

## Processi cellulari di meccanosensibilità e risposte indotte



Vogel V, Sheetz M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 Apr;7(4):265-75.

### I punti di adesione cellula-matrice rispondono a forze meccaniche – [2] (MECCANOTRASDUZIONE)

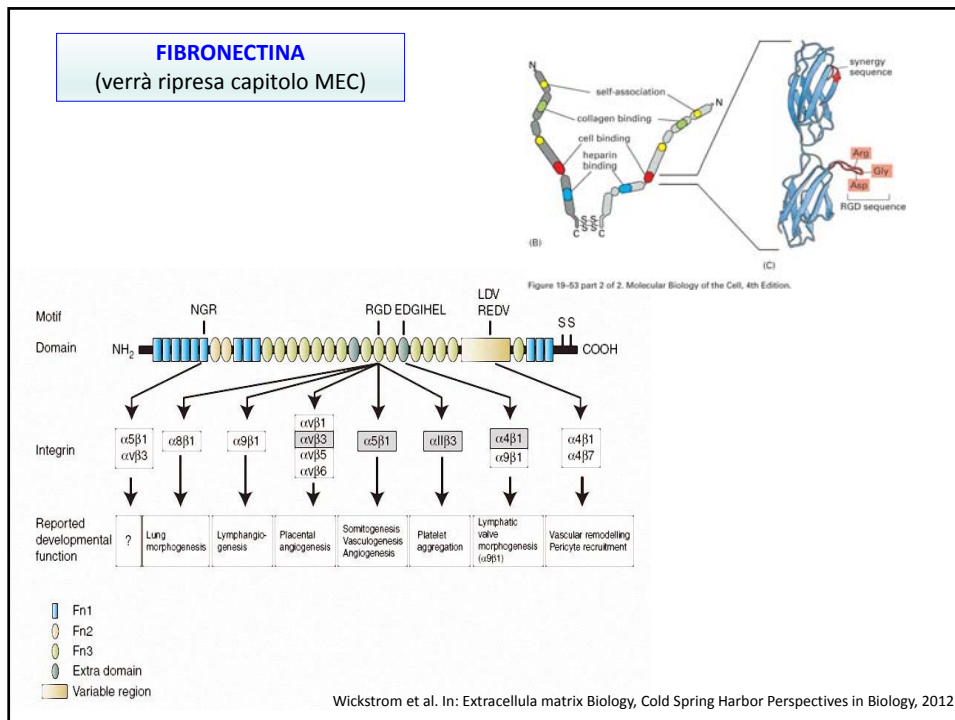
- La meccanotrasduzione mediata da integrine è simile a quella mediata da caderine.
- La lunga coda C-terminale della talina include un gran numero di siti di legame per la proteina vinculina, che regola il citoscheletro di actina.
- Molti di questi siti sono nascosti all'interno di domini proteici della proteina ripiegata, ma vengono esposti quando quei domini si dispiegano mediante stiramento della proteina.
- **Il N-terminale della talina si collega all'integrina mentre il C-terminale si lega all'actina.**
- Quindi, quando i filamenti di actina sono tirati da motori di miosina all'interno della cellula, la tensione risultante stira il bastoncino di talina esponendo i siti di legame per la vinculina.
- A loro volta le molecole di vinculina reclutano e organizzano ulteriori filamenti di actina.
- La tensione perciò aumenta la resistenza della giunzione.

Alberts et al., 2015

### L'asse integrine – actina – [1]

- ✚ Al contrario di quanto avviene con  $\alpha6\beta4$ , **la maggior parte delle integrine** in seguito a legame con un ligando **sono collegate funzionalmente al citoscheletro di actina.**
- ✚ Un **ligando fondamentale delle integrine associate all'actina** è la **fibronectina** (FN) che nell'Uomo e nei topi è riconosciuta da 11 eterodimeri di integrine.
- ✚ La **fibronectina** è una grande glicoproteina che esiste in due forme:
  - ➡ **Fibronectina cellulare:** presente nei tessuti dove si assembla in una matrice fibrillare.
  - ➡ **Fibronectina plasmatica:** prodotta dagli epatociti e secreta nel sangue dove rimane in forma solubile non fibrillare, oppure, quando penetra nei tessuti, rimane incorporata nella ECM
- ✚ La fibronectina si trova solo nei Vertebrati ed è **fondamentale per lo sviluppo della vascolarizzazione** dove si trova fra l'endotelio e le cellule perivascolari.

Wickstrom et al. In: Extracellular matrix Biology, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012



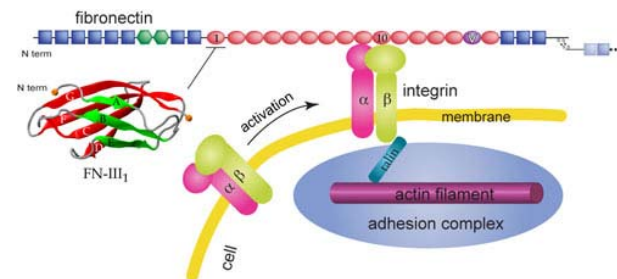
## L'asse integrine – actina – [2]

- ✚ La **fibronectina (FN)** è un dimero legato da ponti disolfuro e la sua deposizione in una matrice fibrillare è un processo cellulare che dipende in modo critico dalle integrine.
- ✚ Le integrine  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha 11\beta 3$  inducono la fibrillogenesi in vitro.
- ✚ Queste **integrine si legano alla FN**, che è secreta come struttura compatta globulare **in cui i siti di legame per altre molecole di FN sono sepolti all'interno della proteina («siti criptici»)**.
- ✚ Il legame è seguito dall'**attivazione del segnalamento** mediato da integrine, portando al **reclutamento di proteine citoplasmatiche per formare complessi di adesione focale (FCs)**.
- ✚ Diversi componenti delle adesioni focali sono **proteine che legano e modulano l'actina** permettendo il reclutamento e la riorganizzazione del citoscheletro di actina verso questi siti e la loro maturazione in FAs.

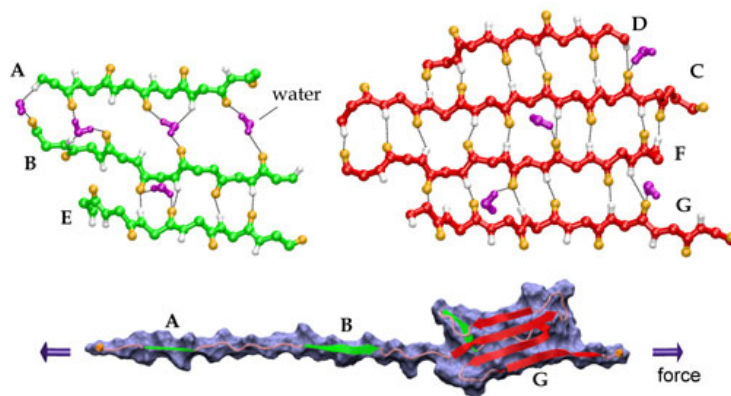
Wickstrom et al. In: Extracellular matrix Biology, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012

## L'asse integrine – actina – [3]

- La principale integrina che contribuisce alla formazione di fibrille di FN, la  $\alpha 5 \beta 1$ , lascia le adesioni focali (FA) e si muove lungo la F-actina per formare adesioni fibrillari. In questo modo facilita la generazione di tensione meccanica tramite il citoscheletro di actina, portando allo stiramento della molecola di FN legata che provoca la comparsa in superficie di siti di auto-assemblamento precedentemente criptici e, successivamente al legame di altre molecole di FN, con la risultante produzione di **fibrille di FN**.

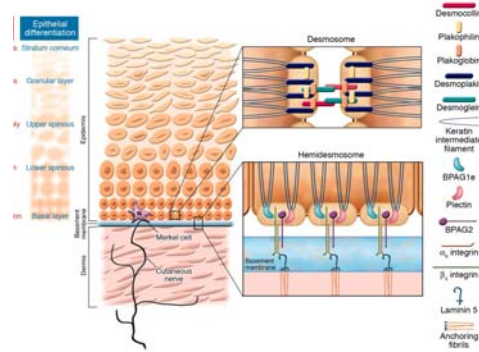


Wickstrom et al. In: Extracellular matrix Biology, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012  
<http://www.ks.uiuc.edu/Research/fibronectin/images/fn-int.jpg>



**Stiramento del modulo di tipo III della fibronectina.**

<http://www.ks.uiuc.edu/Research/fibronectin/>



Collegamento con il citoscheletro

## ASSE INTEGRINE – FILAMENTI INTERMEDI

[http://www.biology-online.org/is/tiny\\_mce/plugins/imagemanager/files/boa002/AN-nothingF01.jpg](http://www.biology-online.org/is/tiny_mce/plugins/imagemanager/files/boa002/AN-nothingF01.jpg)

### Asse Integrine – Filamenti intermedi – [1]

- ✚ Le **membrane basali** («Basement Membranes», **BMs**) sono strati densi di matrice extracellulare che fungono da **barriere strutturali che separano le cellule epiteliali, cellule endoteliali, assoni dei nervi periferici, cellule adipose e cellule muscolari dal sottostante stroma**.
- ✚ Le BMs fornisce **sostegno strutturale, separano i tessuti in compartimenti e regolano il comportamento cellulare**.
- ✚ Tutti i tipi cellulari producono componenti della BM: **collagene di tipo IV, laminina, fibronectina, proteoglicani ad eparan solfato e nidogeno/entattina** oltre a componenti minori.
- ✚ La composizione molecolare della BM varia nei differenti tessuti conferendo ad essi una **specificità di segnalamento** importante per definire le funzioni specializzate delle cellule epiteliali ed endoteliali nei diversi organi.
- ✚ Tutte le BM contengono **laminine**, una famiglia di 16 glicoproteine eteropolimeriche generate dalla combinazione di catene  $5\alpha$ ,  $4\beta$  e  $3\gamma$ .

Wickstrom et al. In: Extracellular matrix Biology, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012

Seminario

## Asse Integrine – Filamenti intermedi – [2]

- ✚ Quando presenti in concentrazione sufficiente, le **laminine** possono auto-assemblarsi in **polimeri** che **interagiscono con altre componenti della ECM, nonché con recettori sulla superficie cellulare quali le integrine e il distroglicano**.
- ✚ Le isoforme di laminina presenti nei tessuti sono regolate in modo tessuto-specifico e regolato nel tempo durante lo sviluppo embrionale.
- ✚ La **laminina-332** (che contiene catene  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$  e  $\gamma 2$ ; preferenzialmente nota come **laminina-5**) è un componente delle **BM epiteliali**, e quindi è presente nella pelle, mucosa squamosa stratificata, amnio, e cornea.
- ✚ La sua principale funzione è quella di mantenere l'integrità epiteliale e la coesione epitelio-mesenchima in tessuti esposti a forze meccaniche elevate.
- ✚ Questa funzione è facilitata dalla capacità unica della laminina-332 di interagire con integrine distinte.
- ✚ La sua **interazione con l'integrina  $\alpha 3 \beta 1$**  porta all'assemblaggio dei canonici punti di **adesione focale (FA)**, mentre **l'interazione con le integrine  $\alpha 6 \beta 4$**  porta alla formazione di **emidesmosomi**.

Wickstrom et al. In: Extracellular matrix Biology, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012

Seminario

## Asse Integrine – Filamenti intermedi – [3] Emidesmosomi: struttura e assemblaggio – [1]

- ✚ Gli **emidesmosomi** sono complessi multiproteici presenti negli epitelii semplici e stratificati.
- ✚ Ci sono due tipi che si distinguono in base alla composizione molecolare.
- ✚ **Tipo I (emidesmosomi classici)**: si trovano negli epitelii stratificati (es. pelle) e contengono tre proteine transmembrana:
  - **Integrina  $\alpha 6 \beta 4$** , **tetraspanina CD151**, e **collagene di tipo XVII** («antigene 180 bullous pemphigoid, [PD]).
- ✚ **Tipo II**: si trovano negli epitelii semplici (es. Intestino) e contengono solo l'integrina  $\alpha 6 \beta 4$ .

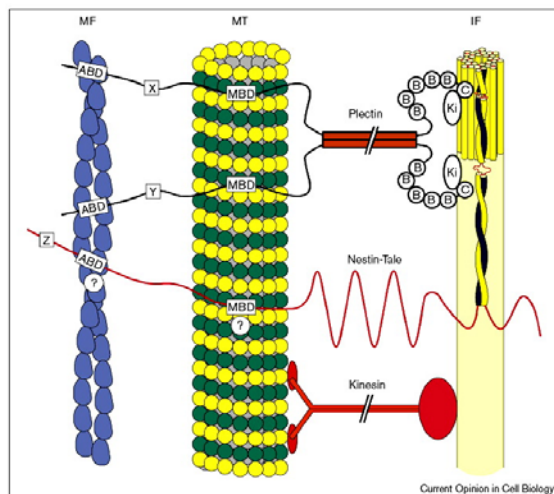
Wickstrom et al. In: Extracellular matrix Biology, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012

Seminario

## Asse Integrine – Filamenti intermedi – [3] Emidesmosomi: struttura e assemblaggio – [2]

- ✚ L'aspetto unico degli **emidesmosomi** è che essi **collegano la ECM alla rete dei filamenti intermedi (FI)**.
- ✚ Quest'interazione è stabilita da due proteine della famiglia delle placchine: la **plectina** e la **BP230** (anche nota come BPAG1); solo la plectina è presente sia negli emidesmosomi di tipo I che di tipo II.
- ✚ Le **plectine** sono grandi proteine citoplasmatiche, che nel loro C-terminale contengono sei ripetizione di tipo placchina.
- ✚ Le **interazioni della plectina con i filamenti intermedi è mediata da una sequenza di residui basici che collega la 4<sup>a</sup> e la 5<sup>a</sup> ripetizione placchina.**
- ✚ Il N-terminale delle plectine contiene tuttavia due domini «calponin-homology» (CH) che costituiscono un dominio di legame con l'actina.
- ✚ Mediante il dominio di legame con l'actina le plectine si possono associare sia con il dominio citoplasmatico dell'integrina  $\alpha 6 \beta 4$  oppure con i filamenti di actina, però in modo mutuamente esclusivo, che spiega l'assenza di actina negli emidesmosomi.

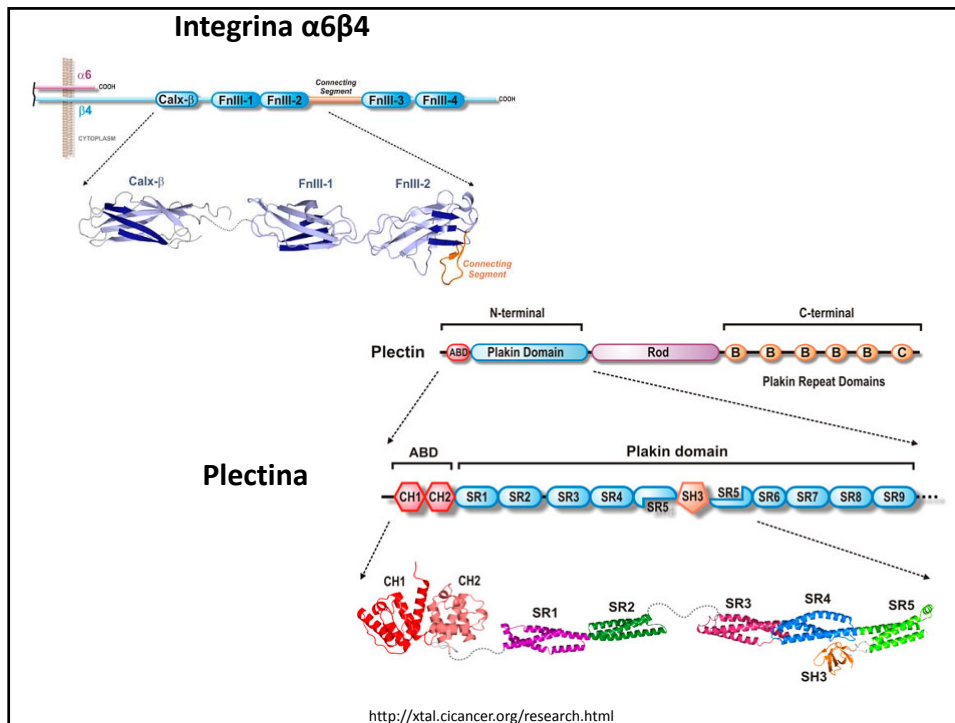
Wickstrom et al. In: Extracellular matrix Biology, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012



Schematic representation of the interaction between microfilaments (MF), microtubules (MT) and intermediate filaments (IF) engaging plectin with its amino-terminal actin-binding (ABD) and microtubule-binding (MBD) domains. While plectin's MBD has not yet been defined in molecular terms, it has been clearly visualized by electron microscopy [29].

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





Seminario

## Collagene di tipo XVII (noto anche come BP180) - [1]

- ✚ Proteina **transmembrana** che gioca un **ruolo critico nel mantenimento del collegamento tra gli elementi strutturali intracellulari e extracellulari coinvolti nell'adesione dell'epidermide**.
- ✚ E' un eterotrimerico con tre catene  $\alpha 1$  (XVII).
- ✚ Proteina transmembrana di tipo II (C-terminale rivolto verso l'esterno della cellula).
- ✚ Ogni catena di 180 kDa contiene un **dominio intracellulare** globulare di circa 70 kDa che **interagisce con la subunità  $\beta 4$**  delle integrine, con la plectina e con la BP230 ed è necessaria per il collegamento stabile degli emidesmosomi ai filamenti intermedi di cheratina.

[http://en.wikipedia.org/wiki/Collagen\\_type\\_XVII\\_alpha\\_1](http://en.wikipedia.org/wiki/Collagen_type_XVII_alpha_1)

Seminario

## Asse Integrine – Filamenti intermedi – [3] Emidesmosomi: struttura e assemblaggio – [3]

- ✚ L'interazione della plectina con la coda citoplasmatica dell'integrina  $\alpha6\beta4$  è considerato il passo iniziale per la formazione degli emidesmosomi.
- ✚ **La coda dell'integrine  $\alpha6\beta4$  è insolitamente lunga** e non condivide alcuna omologia con le altre subunità  $\beta$  delle integrine.
- ✚ La sua interazione con la plectina induce un'alterazione conformazionale nella coda dell'integrina.
- ✚ Poichè il reclutamento del collagene di tipo XVII e della placchina BP230 ai desmosomi richiede una previa interazione della plectina con la  $\beta4$ , questo cambiamento conformazionale potrebbe facilitare le interazioni di entrambe le proteine con l'integrina.

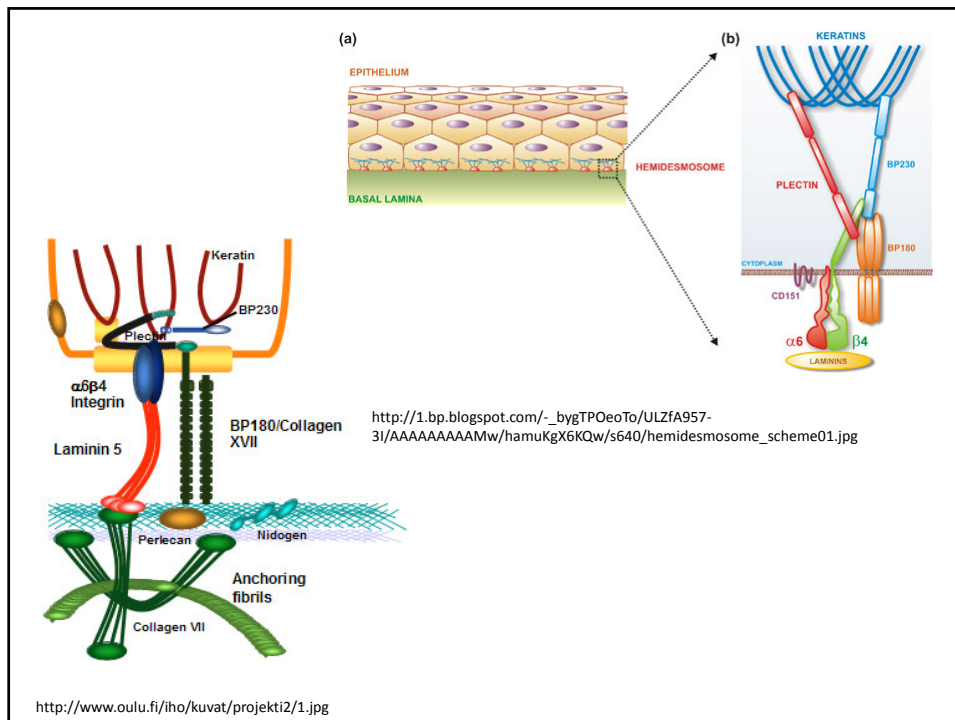
[http://en.wikipedia.org/wiki/Collagen,\\_type\\_XVII,\\_alpha\\_1](http://en.wikipedia.org/wiki/Collagen,_type_XVII,_alpha_1)

Seminario

## Collagene di tipo XVII (noto anche come BP180) - [2]

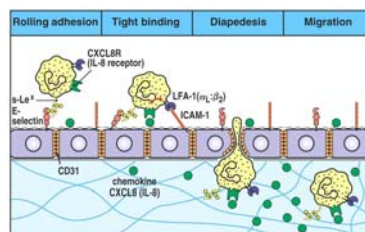
- ✚ Il grande **ectodominio C-terminale** di circa 120 kDa consiste in 15 **subdomini collagenosi**, caratterizzati dalle tipiche sequenze ripetute G-X-Y dei collagene.
- ✚ La struttura globale **dell'ectodominio** è quella di una **triplice elica flessibile** con una significativa stabilità termica.
- ✚ La parte prossimale alla membrana dell'ectodominio, all'interno degli aminoacidi 506-519, è responsabile del **legame con la subunità  $\alpha6$  dell'integrina** – aspetto apparentemente importante per l'integrazione del collagene di tipo XVII nell'emidesmosoma.
- ✚ Il maggiore dominio colagenoso, Col15, che contiene 232 aminoacidi (aa 567-808) contribuisce significativamente a stabilizzare l'omotrimerico del collagene XVII.
- ✚ **Il C-terminale del collagene XVII si lega alla laminina 5** e la corretta integrazione della laminina 5 nella ECM richiede il collagene XVII.

[http://en.wikipedia.org/wiki/Collagen,\\_type\\_XVII,\\_alpha\\_1](http://en.wikipedia.org/wiki/Collagen,_type_XVII,_alpha_1)



## FUNZIONI DELLE INTEGRINE NEI LEUCOCITI (1)

- Le integrine giocano un ruolo ben definito nel movimento dei leucociti verso i siti di infiammazione.
- In seguito alla fase iniziale di "rolling" mediata da selectine, il flusso di leucociti è rallentato ulteriormente dall'interazione di integrine sulla superficie dei leucociti con molecole di adesione intercellulare della superfamiglia delle Immunoglobuline (ICAMs) espresse dalle cellule endoteliali attivate
- mentre le integrine di solito non si legano ad un ligando a meno che non siano prima in uno stato attivato, le cellule devono prima ricevere uno stimolo che attivi l'integrina.

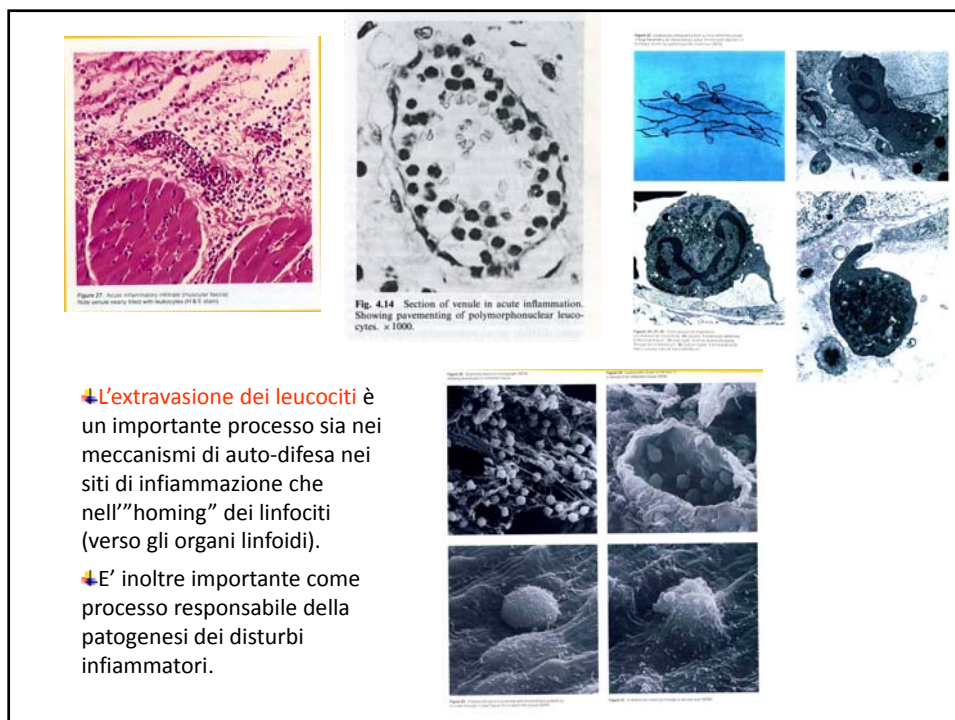
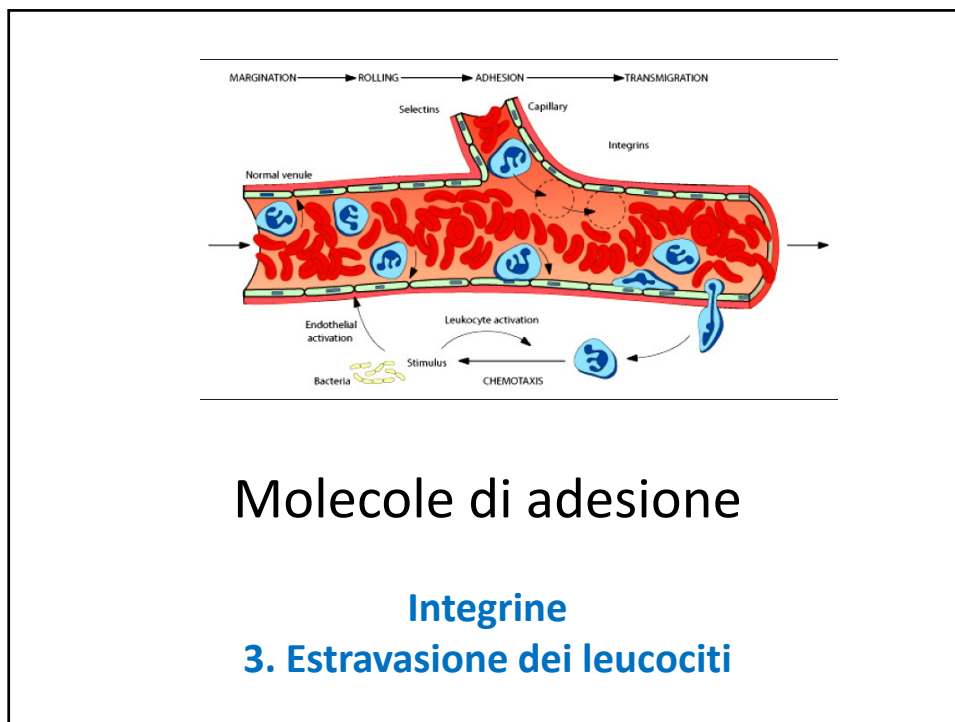


## FUNZIONI DELLE INTEGRINE NEI LEUCOCITI (2)

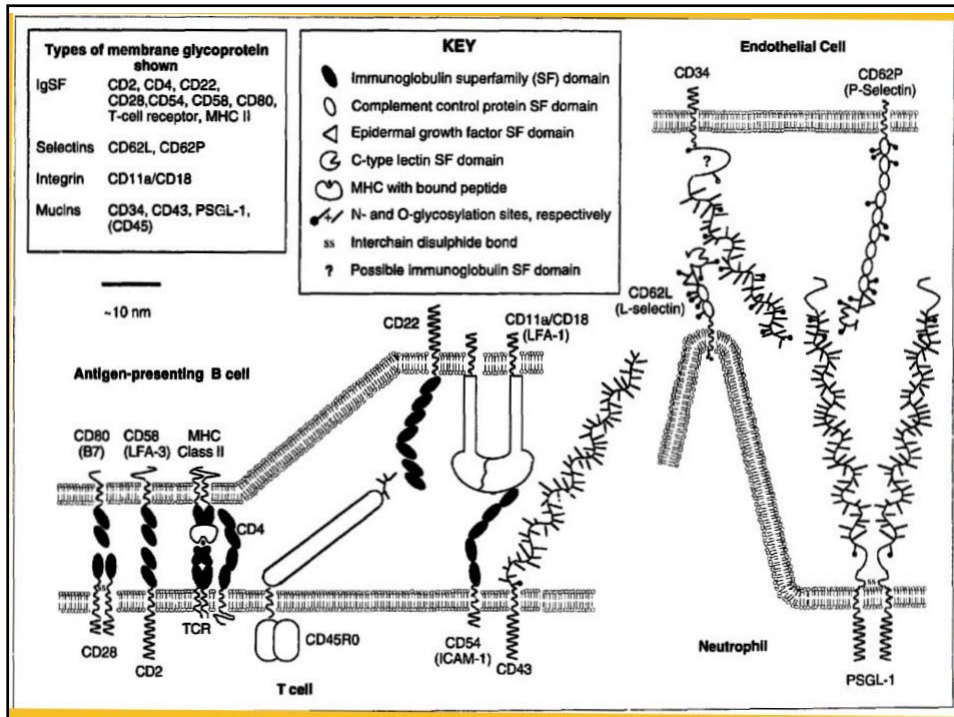
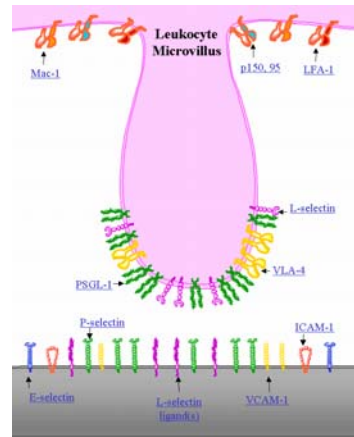
- ✚ Lo stimolo può essere fornito da chemochine, da legami incrociati di recettori dei leucociti quali Cd2 e CD3, o da segnali indotti dal legame a molecole quali le selectine E- e P- sulla superficie delle cellule endoteliali,
- ✚ Studi recenti suggeriscono che le chemochine, in particolare, sono un fattore principale di attivazione dell'adesione mediata da integrine all'endotelio e successivamente arresto dei leucociti.
- ✚ L'adesione ferma dei leucociti attivati è mediata da entrambe le famiglie  $\beta_1$  e  $\beta_2$  di recettori di tipo integrina.
- ✚ L'adesione dei neutrofilii alle cellule endoteliali è mediata primariamente dall'interazione di integrine  $\beta_2$ , LFA-1 ( $\alpha_L\beta_2$ ) e Mac-1 ( $\alpha_M\beta_2$ ) con le ICAM-1 e ICAM-2 espresse dalle cellule endoteliali.
- ✚ Inoltre, interazioni adesive mediate da integrine  $\beta_1$  possono contribuire all'extravasazione dei leucociti.
- ✚ L'interazione di  $\alpha_4\beta_1$  con VCAM-1 espressa sulle cellule endoteliali attivate contribuisce all'emigrazione di linfociti, monociti, basofili e eosinofili.

## FUNZIONI DELLE INTEGRINE NEI LEUCOCITI (3)

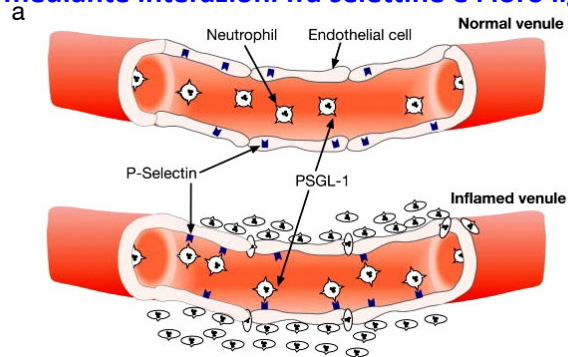
- ✚ L'importanza dell'adesione mediata dalle integrine  $\beta_2$  in vivo è illustrata dal sindrome di deficit di adesione leucocitaria di tipo I (Leukocyte Adhesion Deficiency type I, LAD-1) in cui vi è una assenza totale o parziale di integrine  $\beta_2$  nei leucociti. I pazienti con questa condizione ereditaria soffrono di gravi e ricorrenti infezioni batteriche e funginee. I loro neutrofilii possono rotolare, ma non aderiscono al tessuto endoteliali e non riescono ad emigrare dal torrente sanguigno ai siti di infiammazione. Difetti simili si trovano in topi carenti di ICAM-1



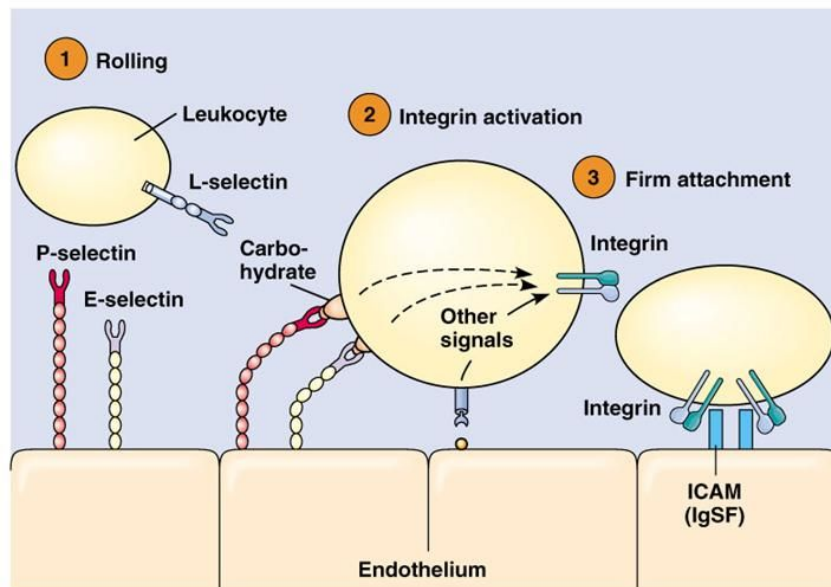
- Leukocytes roll on stimulated endothelium before migrating to sites of inflammation or vascular injury.
- This initial and essential step is largely mediated by the **selectins and their ligands**.
- The leukocyte receptors involved **cluster** on small membrane projections (microvilli).



### Ancoraggio dei leucociti circolanti all'endotelio attivato mediante interazioni fra selettine e i loro ligandi

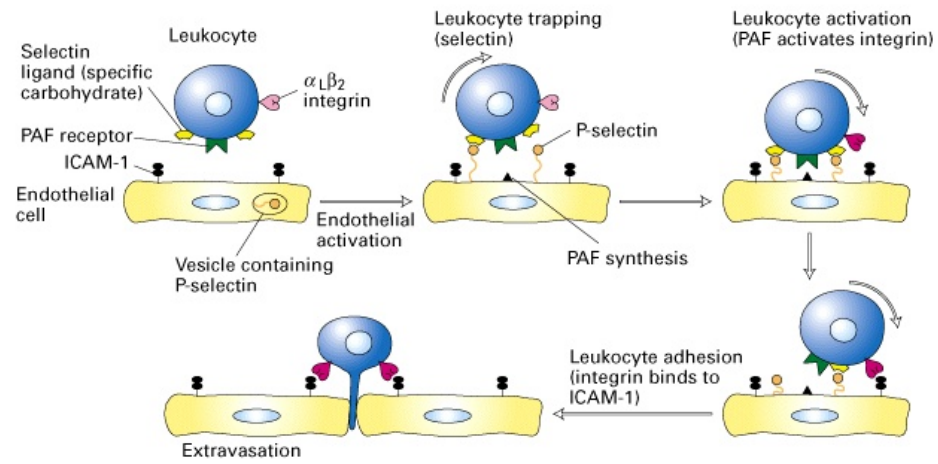


(a) Nelle **venule normali** i leucociti fluiscono senza interazioni adesive con l'endotelio, ma nei **vasi infiammati**, vengono **esposte sulla superficie delle cellule endoteliali selettine e ligandi per le integrine**. Questo porta all'ancoraggio, rottolamento ("rolling"), e arresto dei leucociti circolanti e la loro finale extravasazione dalla circolazione verso il tessuto circostante. Ad esempio, la P-selettina è normalmente espressa nei **corpi di Weibel-Palade** delle **cellule endoteliali**, ma entro pochi minuti dopo l'attivazione delle cellule endoteliali mediante trombina, istamina, ipossia o danno, questi corpi si fondono con la membrana plasmatica, promuovendo l'espressione della P-selettina sulla superficie della cellula endoteliale. Allo stesso modo, la P-selettina immagazzinata nei **granuli  $\alpha$**  delle **piastrine** viene espressa sulla superficie delle piastrine pochi minuti dopo l'attivazione piastrinica. I leucociti si ancorano e rottolano sulle cellule endoteliali attivate e le piastrine.



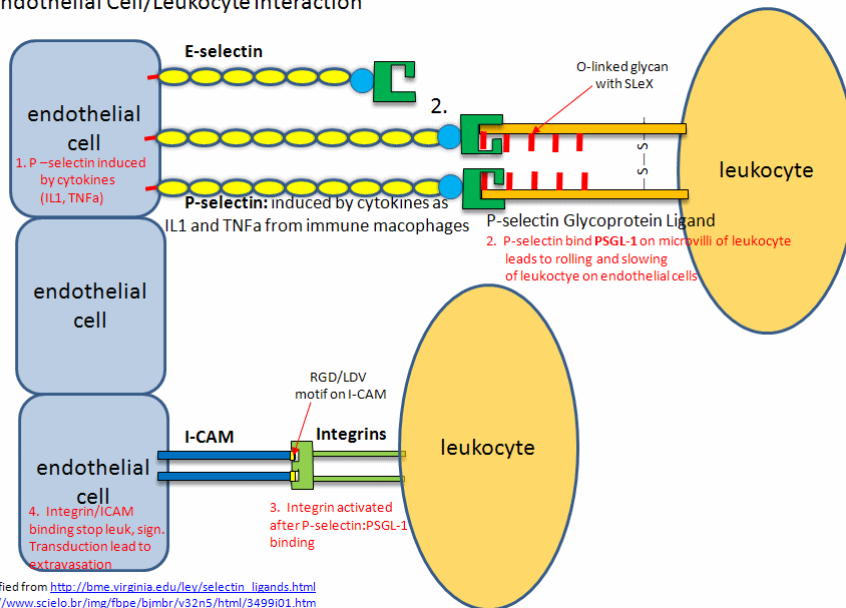
Copyright © 2003 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

**Le selectine, ICAMs, e le integrine mediano l'adesione tra leucociti e cellule endoteliali vicino ai siti di infezione**



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21599/figure/A6507/?report=objectonly>

**Endothelial Cell/Leukocyte Interaction**



Modified from [http://bme.virginia.edu/lev/selectin\\_ligands.html](http://bme.virginia.edu/lev/selectin_ligands.html)  
<http://www.scielo.br/img/fbppe/bimbr/v32n5/html/3499i01.htm>



