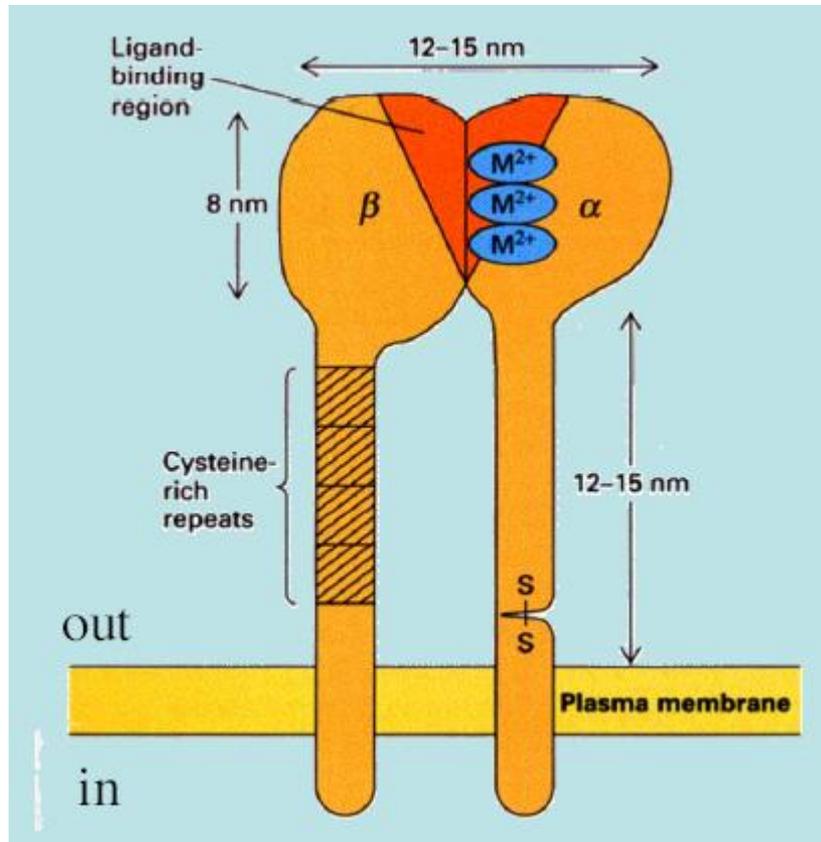


# Integrine



Eterodimeri  $\alpha + \beta$

Esistono 8 diverse subunità  $\beta$   
e 20  $\alpha$ , variamente combinate  
tra loro

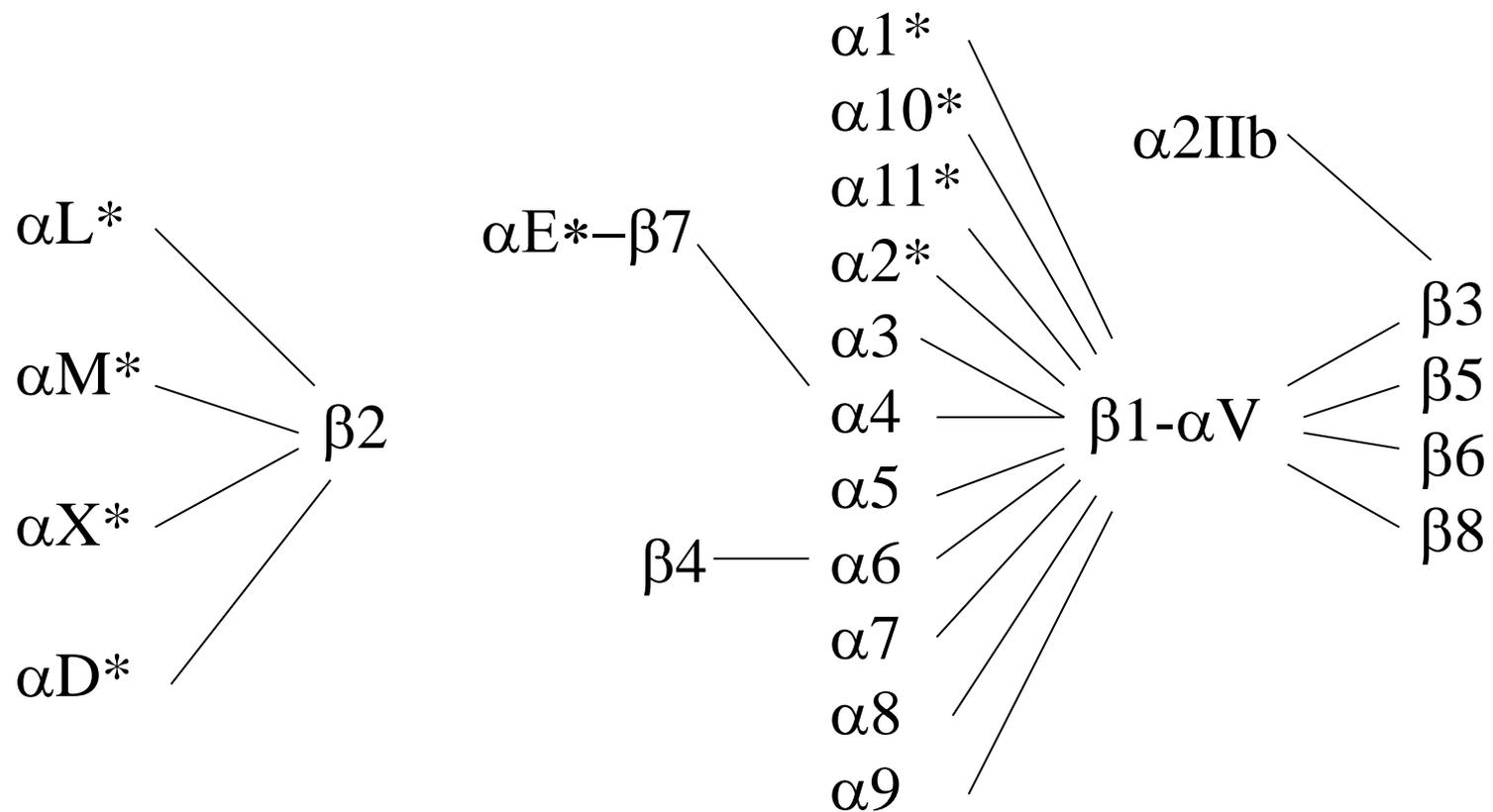
La combinazione di una subunità  
 $\alpha$  con una  $\beta$  conferisce la specificità  
di ligando.

Es.:

$\alpha 4 \beta 1$  collagene

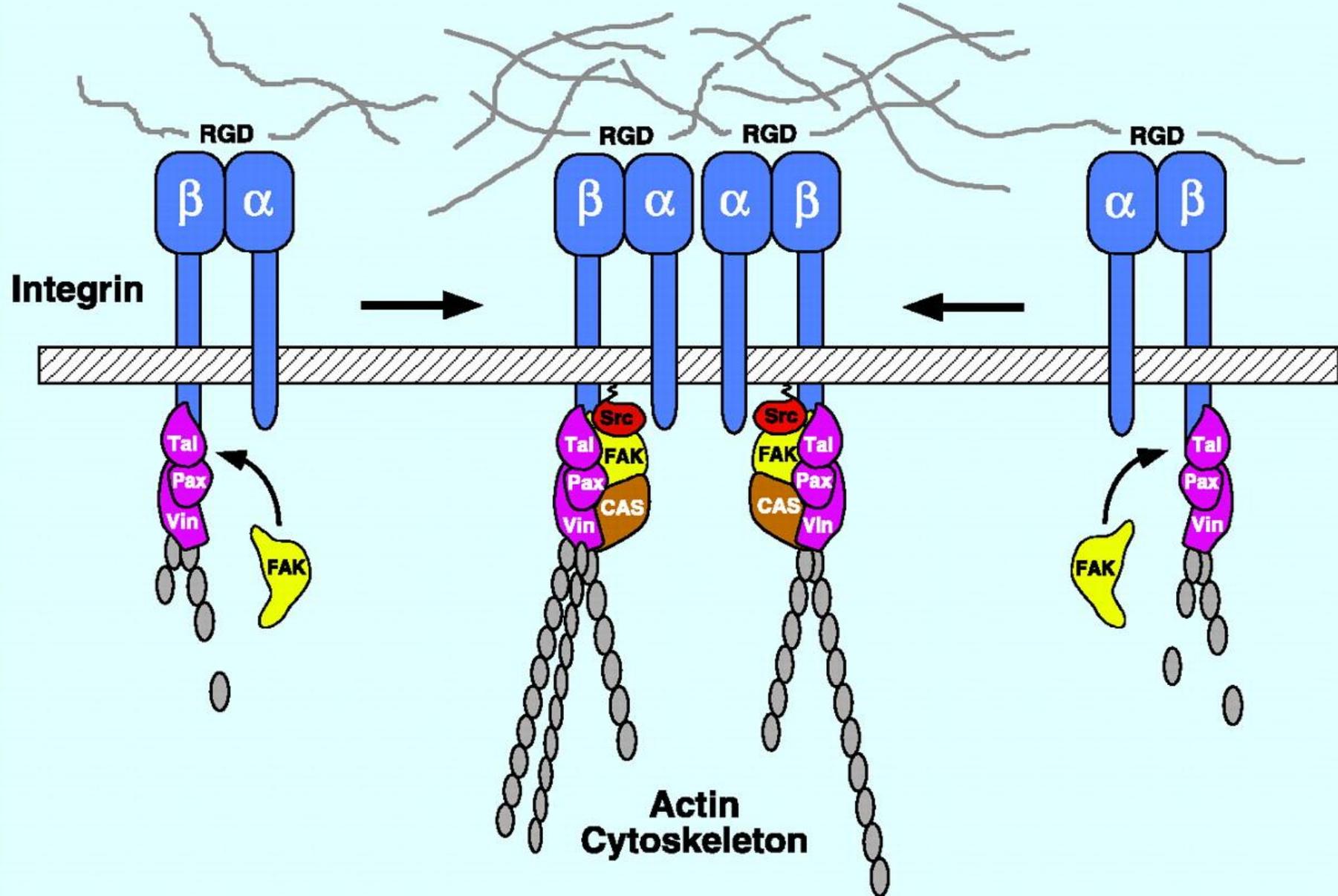
$\alpha 5 \beta 1$  fibronettina

$\alpha 6 \beta 1$  laminina

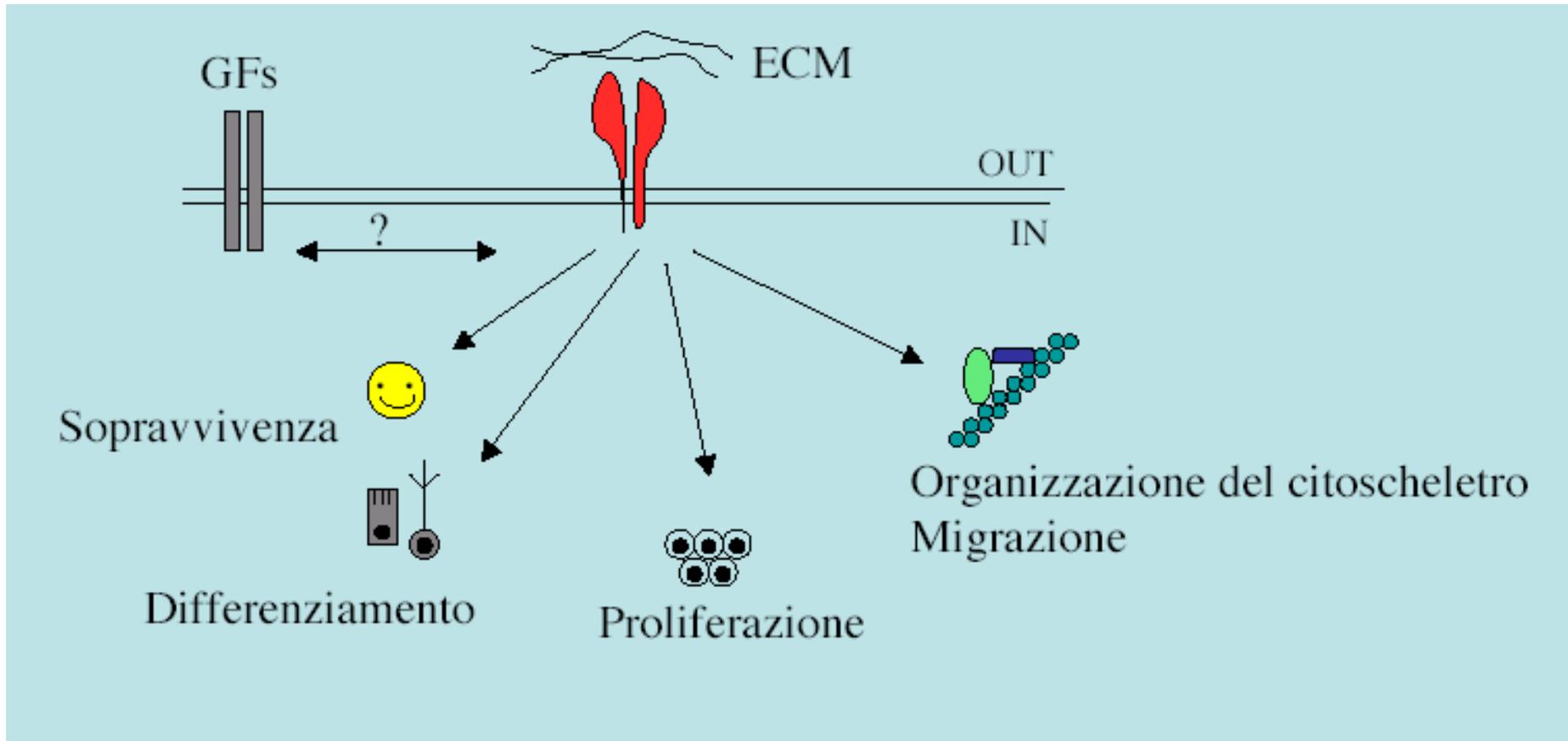


\* Subunità  $\alpha$  che presentano il dominio I (Inserted domain)

**Matrix**

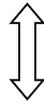


# Segnali trasmessi dalle integrine



# La forza dell'adesione

Affinità



Kd interazione  
integrina-ligando

“Valenza”



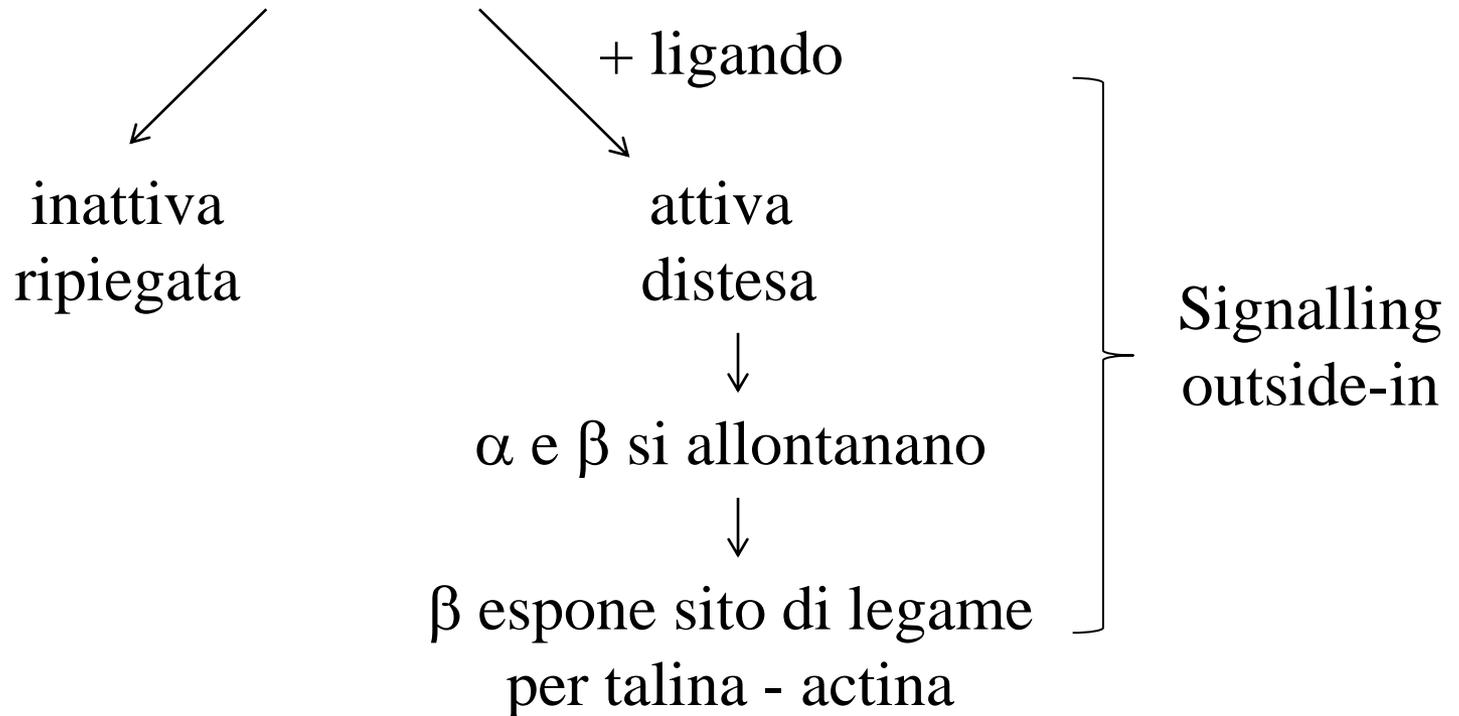
Densità delle integrine  
(n°/μm<sup>2</sup>); loro disposizione  
geometrica; capacità di  
muoversi per diffusione  
passiva o attiva entro i domini  
di membrana.

Le integrine hanno bassa affinità per il ligando ma sono molto concentrate sulla membrana

# Integrine

- Regolazione allosterica: il legame ad un ligando provoca modificazioni conformazionali che si ripercuotono sull'intera proteina

- Esistono in due conformazioni:



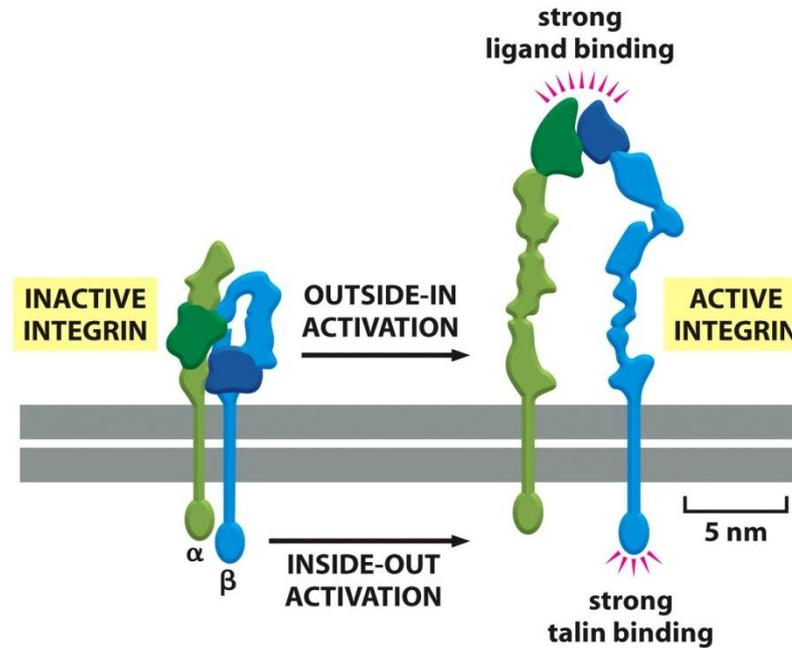


Figure 19-48b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

**Cambiamento di conformazione di una molecola di integrina quando essa si lega ad un ligando.** Strutture attiva (stesa) ed inattiva (piegata) di un'integrina basate su dati di cristallografia a raggi X.

# Signalling inside-out

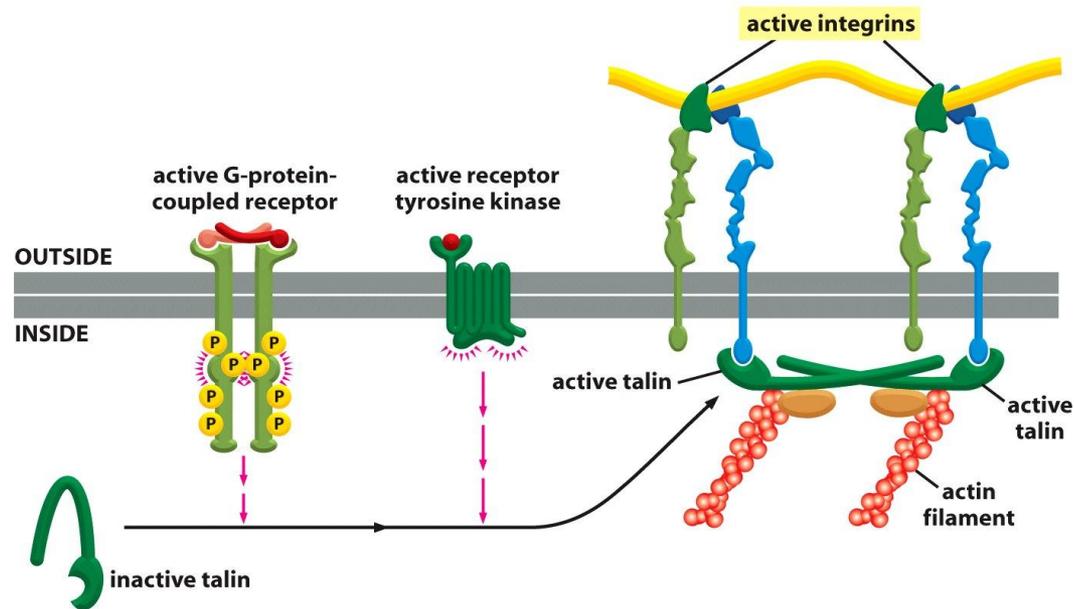
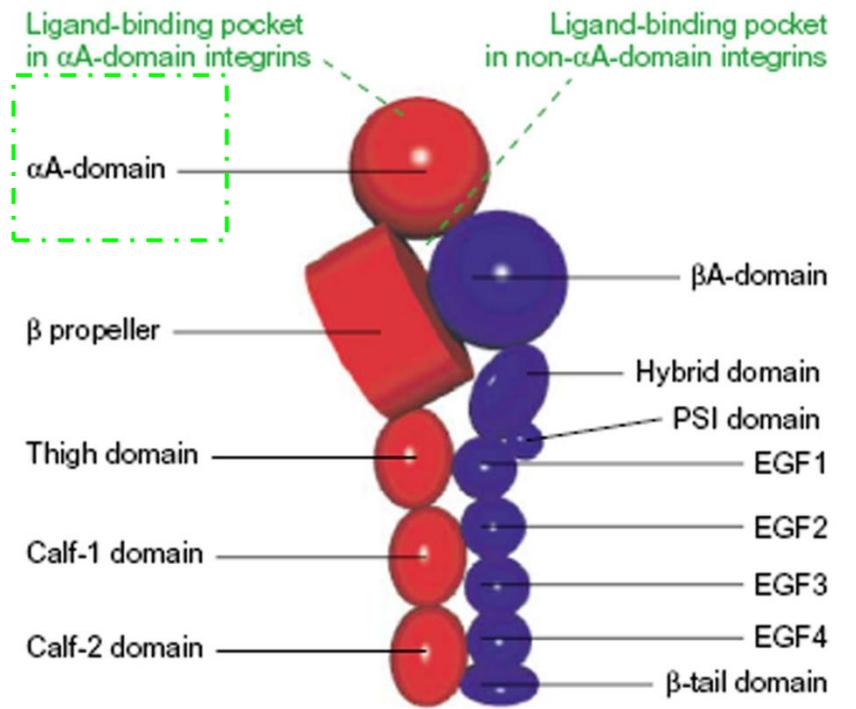
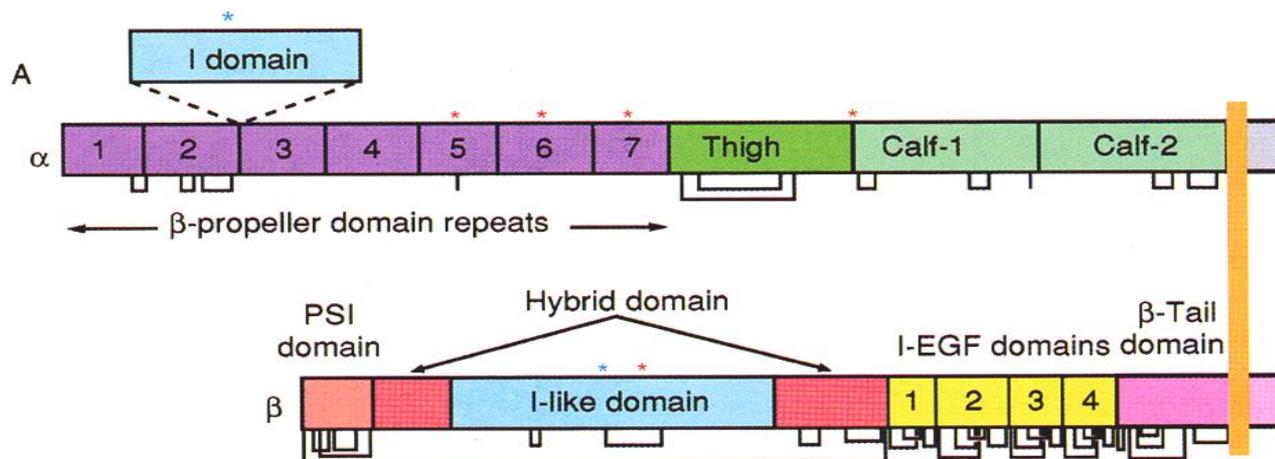


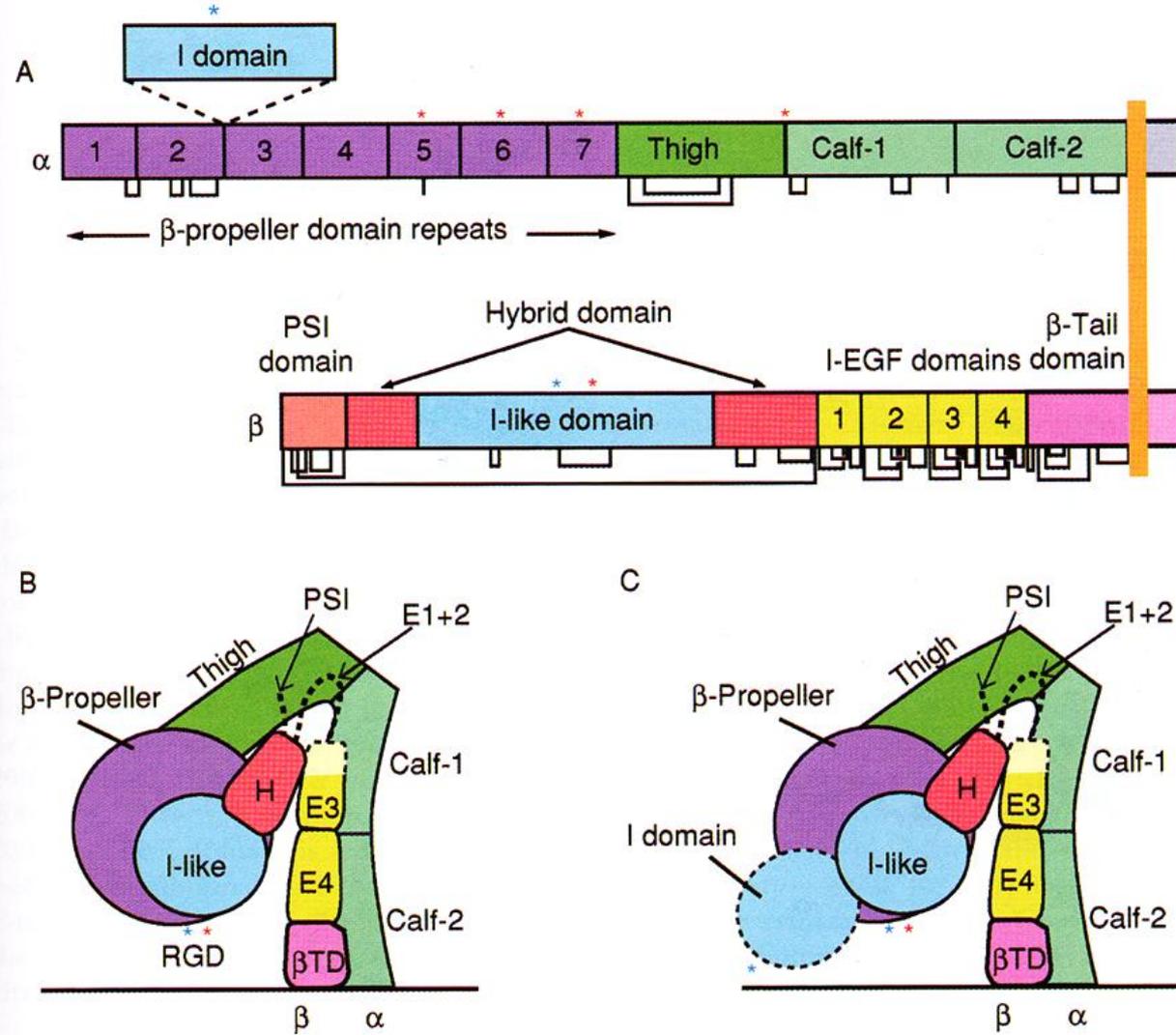
Figure 19-49 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

**Attivazione delle integrine mediante comunicazione intrecciata con altre vie di segnalazione.** Dei segnali ricevuti dall'esterno della cellula mediante altri tipi di recettori di superficie, quali recettori accoppiati a proteine G e recettori ad attività tirosina chinasi, possono alterare la conformazione della talina e quindi attivare le integrine.



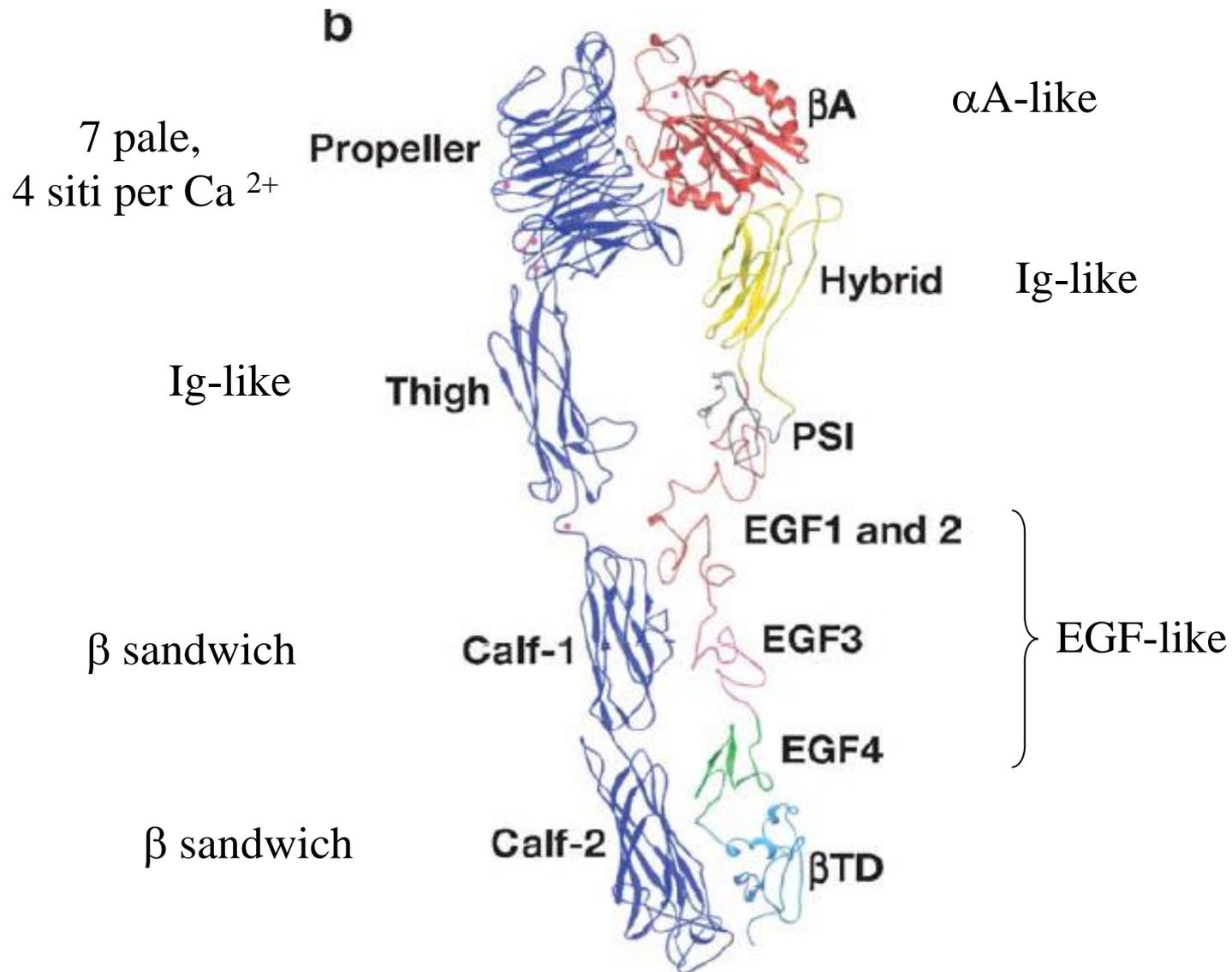
Current Opinion in Structural Biology



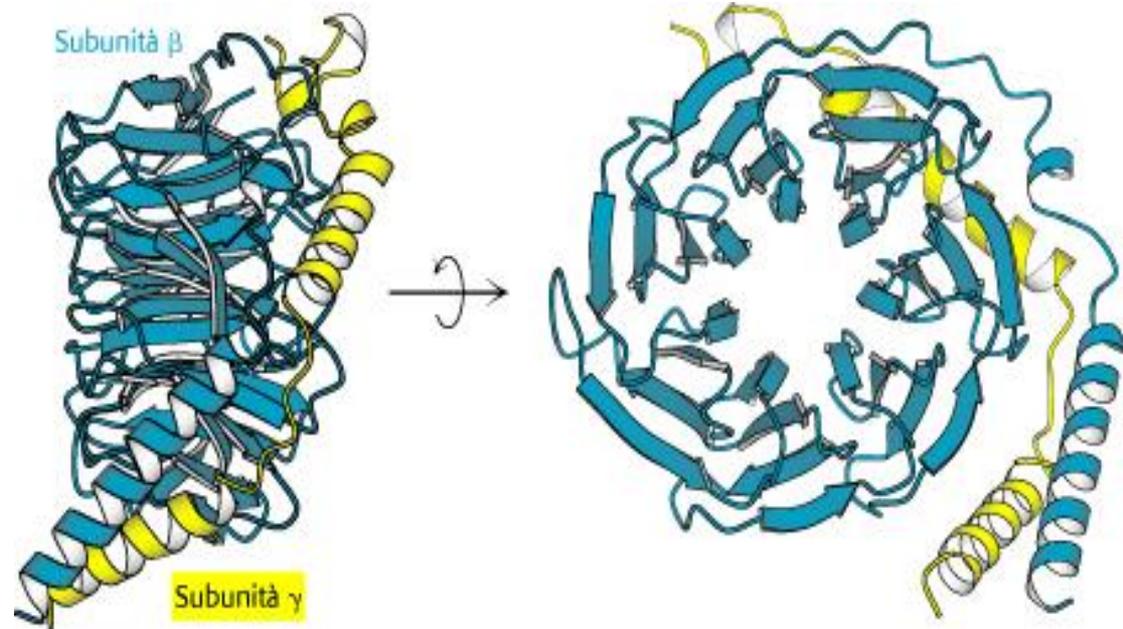
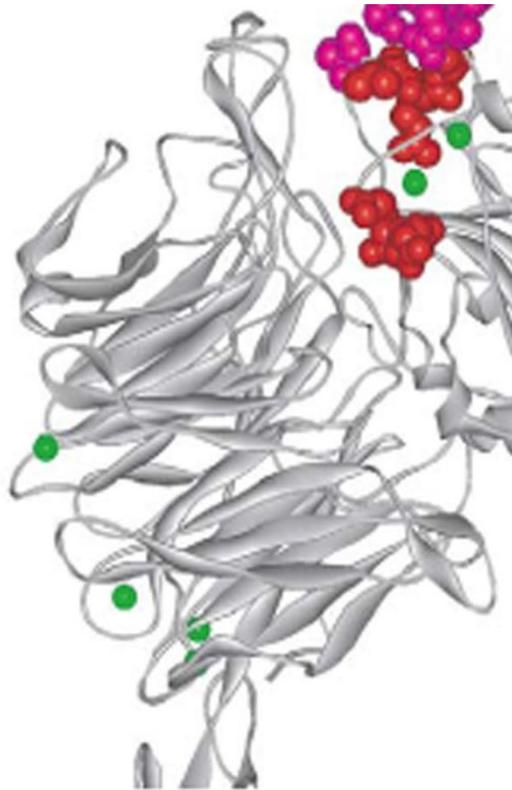


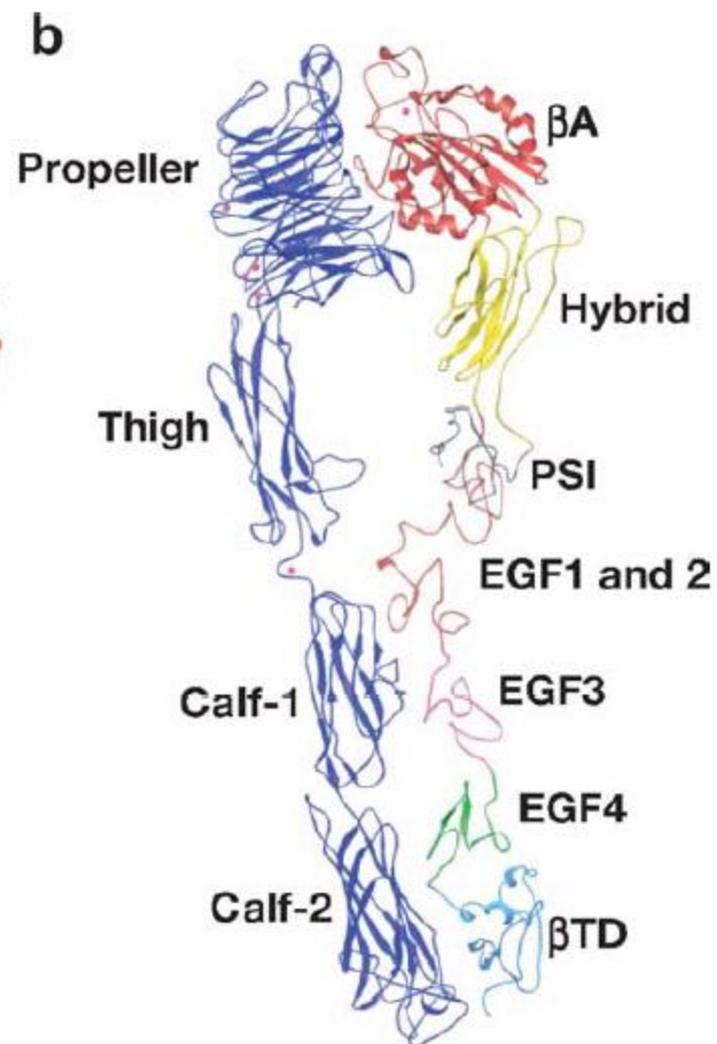
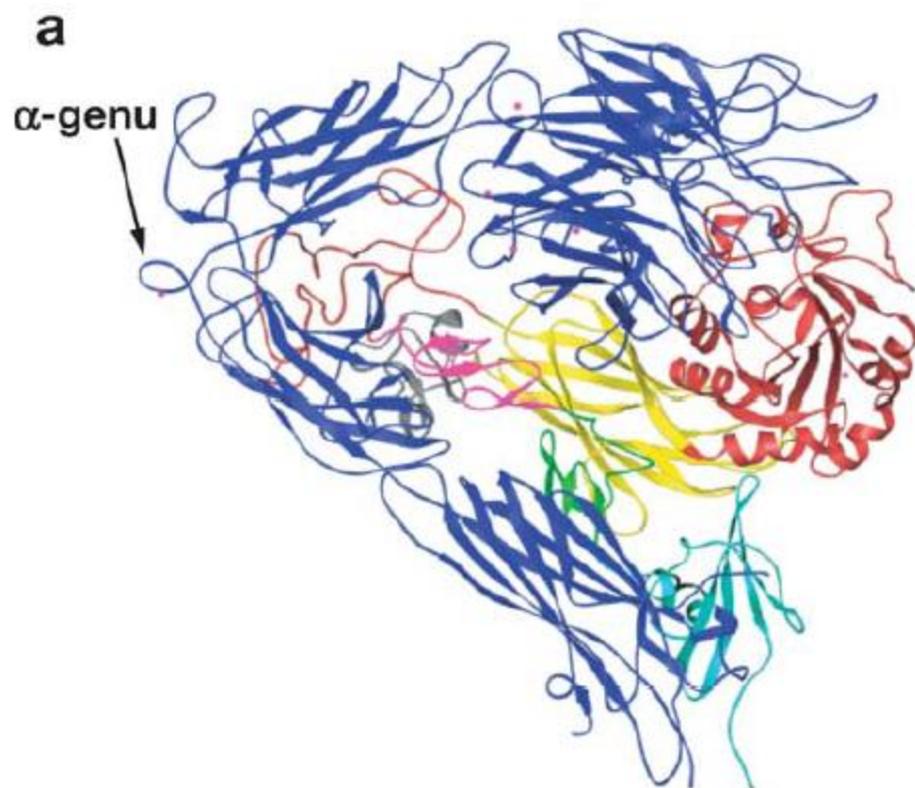
SPRINGER AND WANG, FIG. 2. Integrin architecture. (A) Organization of domains within the primary structure. Some  $\alpha$  subunits contain an I domain inserted in the position denoted by the dotted lines. Cysteines and disulfide bonds are shown as lines below the stick figures. Red and blue asterisks denote  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  binding sites, respectively. (B) Arrangement of domains within the three-dimensional crystal structure of  $\alpha_v\beta_3$  (Xiong *et al.*, 2001). Each domain is color coded as in A. (C) The structure in (B) with an I domain added.

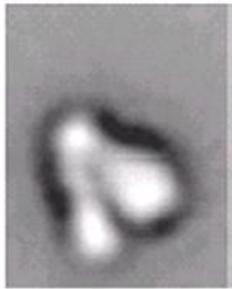
# Ectodominio dell'integrina $\alpha V\beta 1$



# $\beta$ -propeller / subunità $\beta$ delle proteine G



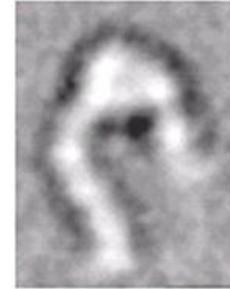




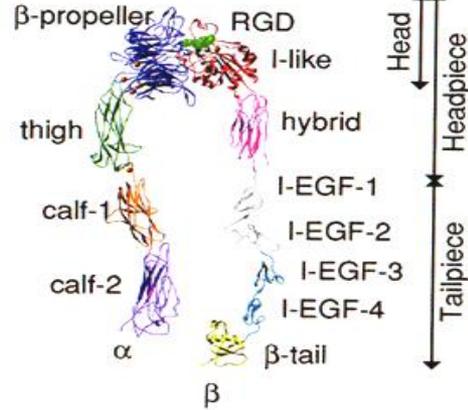
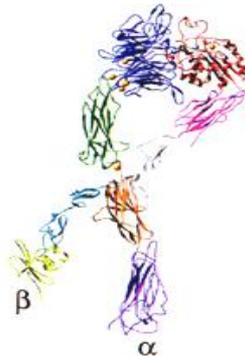
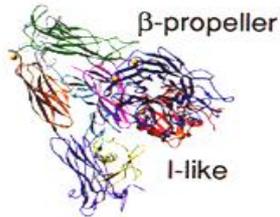
A



B

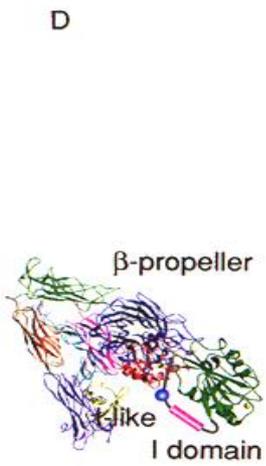


C



$\alpha V \beta 3$

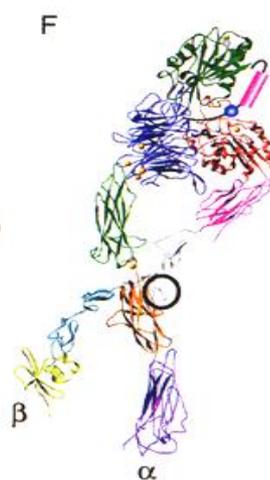
$\alpha L \beta 2$



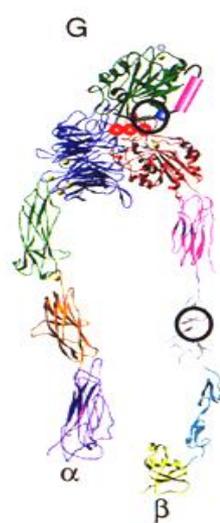
D



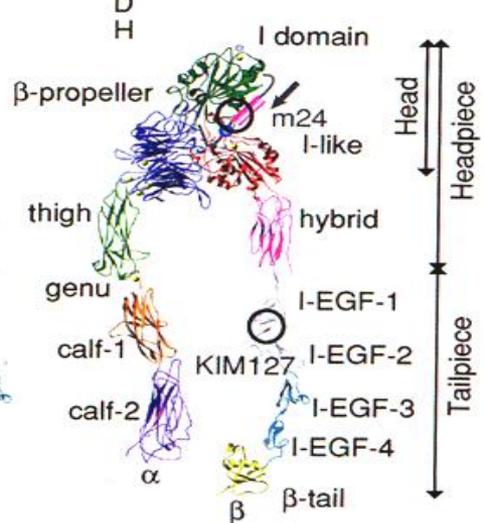
E



F



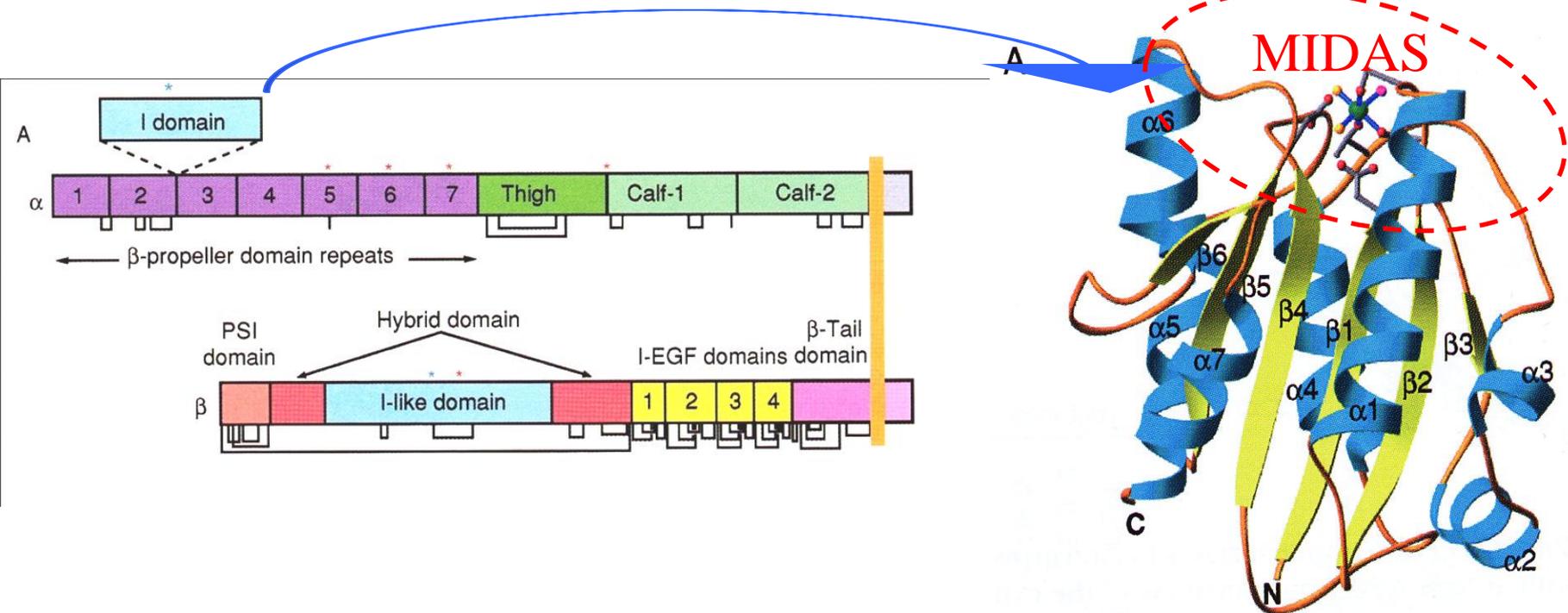
G



H

# Subunità $\alpha$ , dominio I ( $\alpha A$ ):

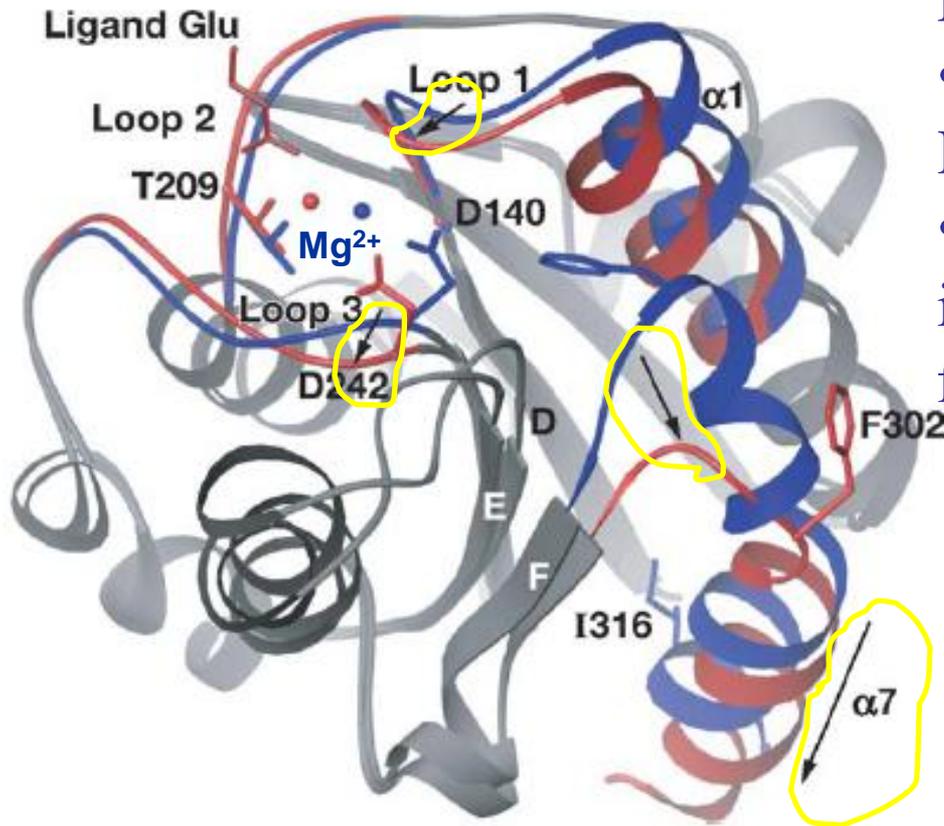
Dominio GTPase-like, con un sito di legame per il ligando (MIDAS, metal ion-dep. adhesion site)



- \* siti legame  $Ca^{2+}$
- \* siti legame  $Mg^{2+}$

7  $\alpha$  eliche  
6  $\beta$  filamenti

## Il dominio I esiste in due conformazioni

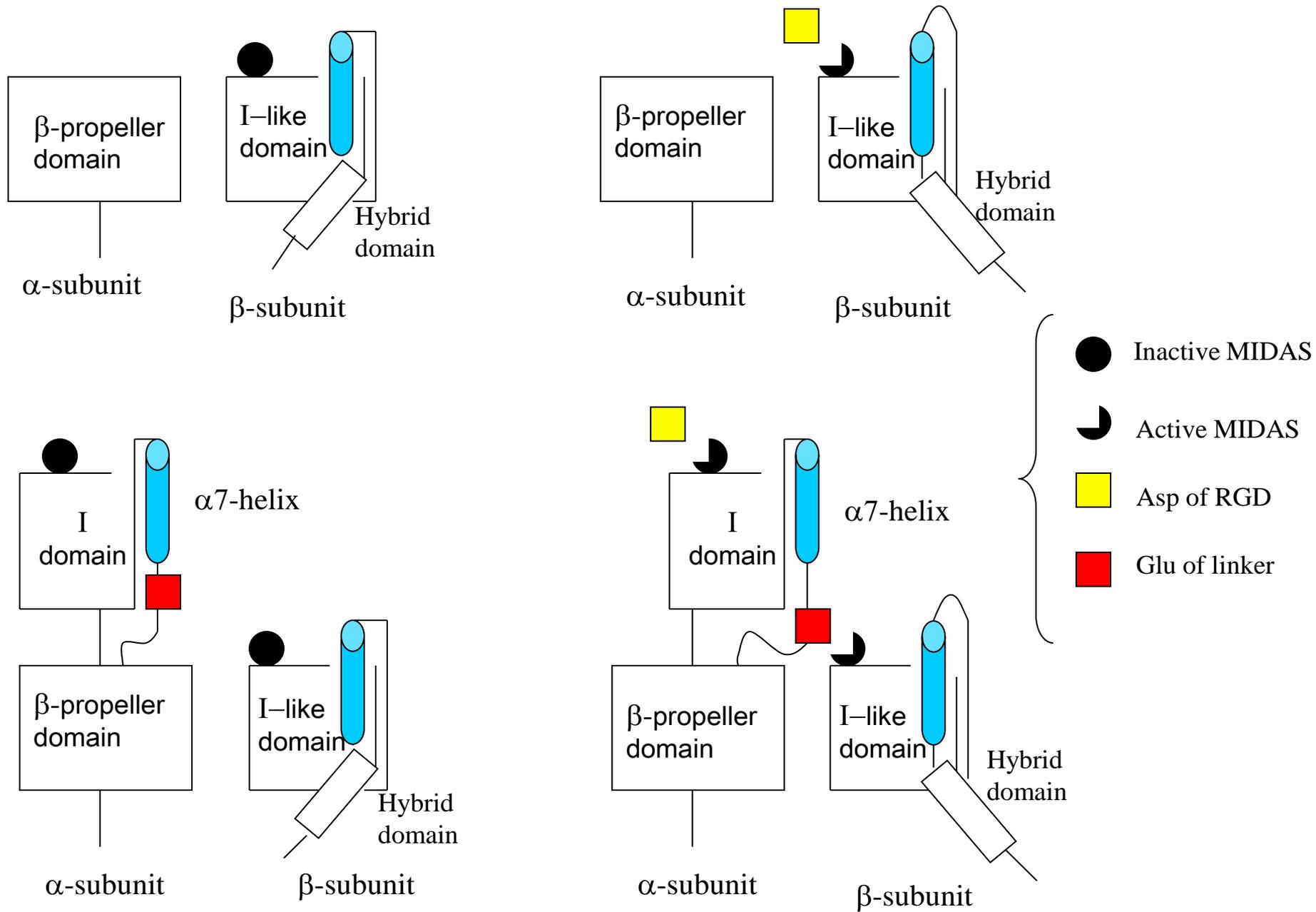


### Dominio chiuso:

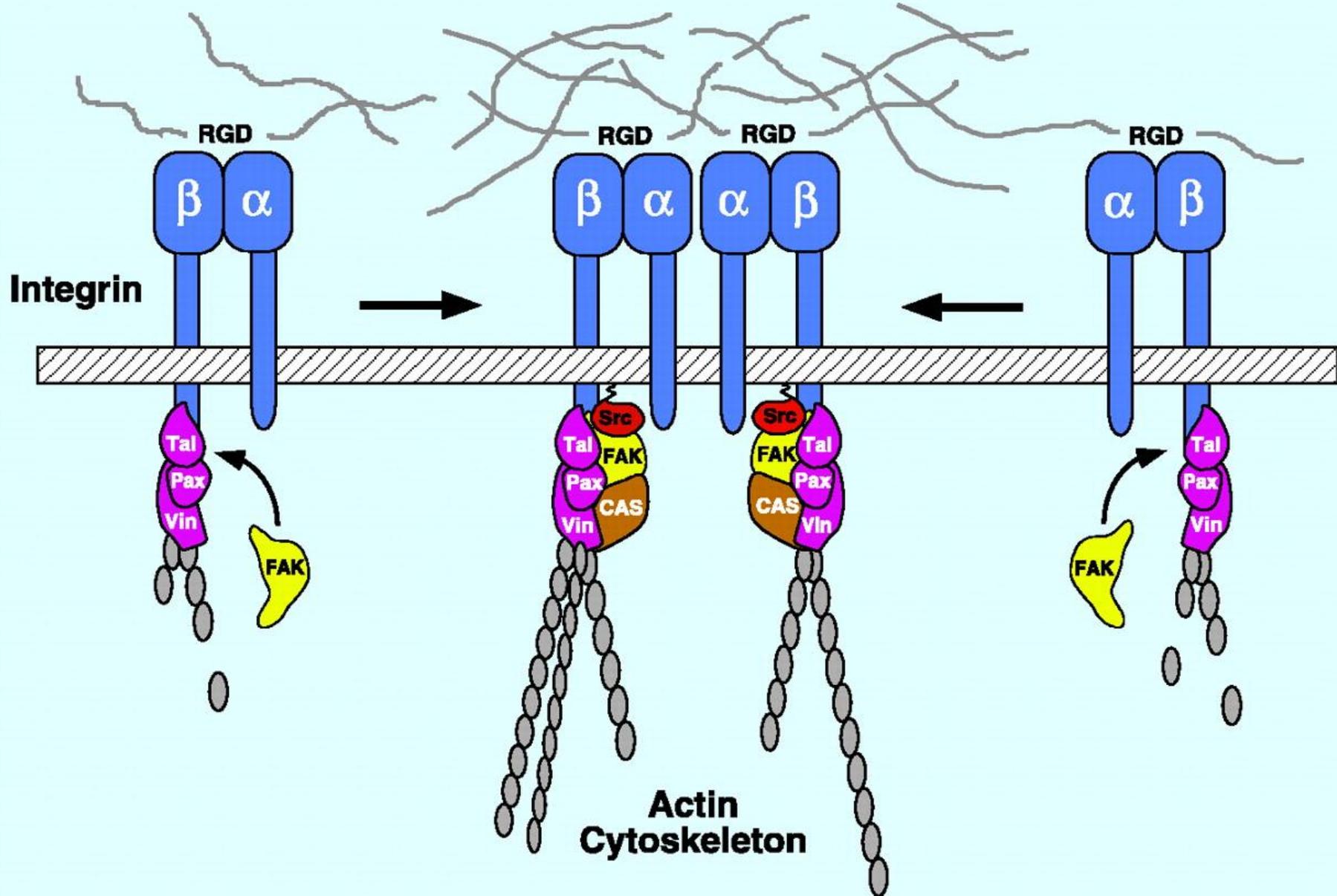
- Lega  $Mg^{2+}$  tramite loop 1, 2, 3 +  $H_2O$
- Loop bF-a7 è stabilizzato da interazioni idrofobiche con foglietto b centrale

### Dominio aperto con ligando

- Loop 1,2 3 si riarrangiano, in seguito a stiramento dell'elica 7 che perde due giri
- Glu /Asp del ligando sostituisce  $H_2O$  nella coordinazione di  $Mg^{2+}$



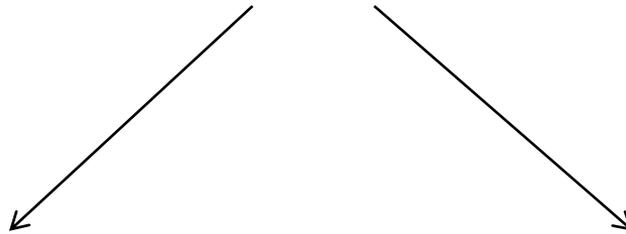
**Matrix**



# Vinculina

ABP: Actin binding protein: lega F-actina

Reclutata da



$\alpha$ -catenina

talina

Giunzioni aderenti

Adesioni focali

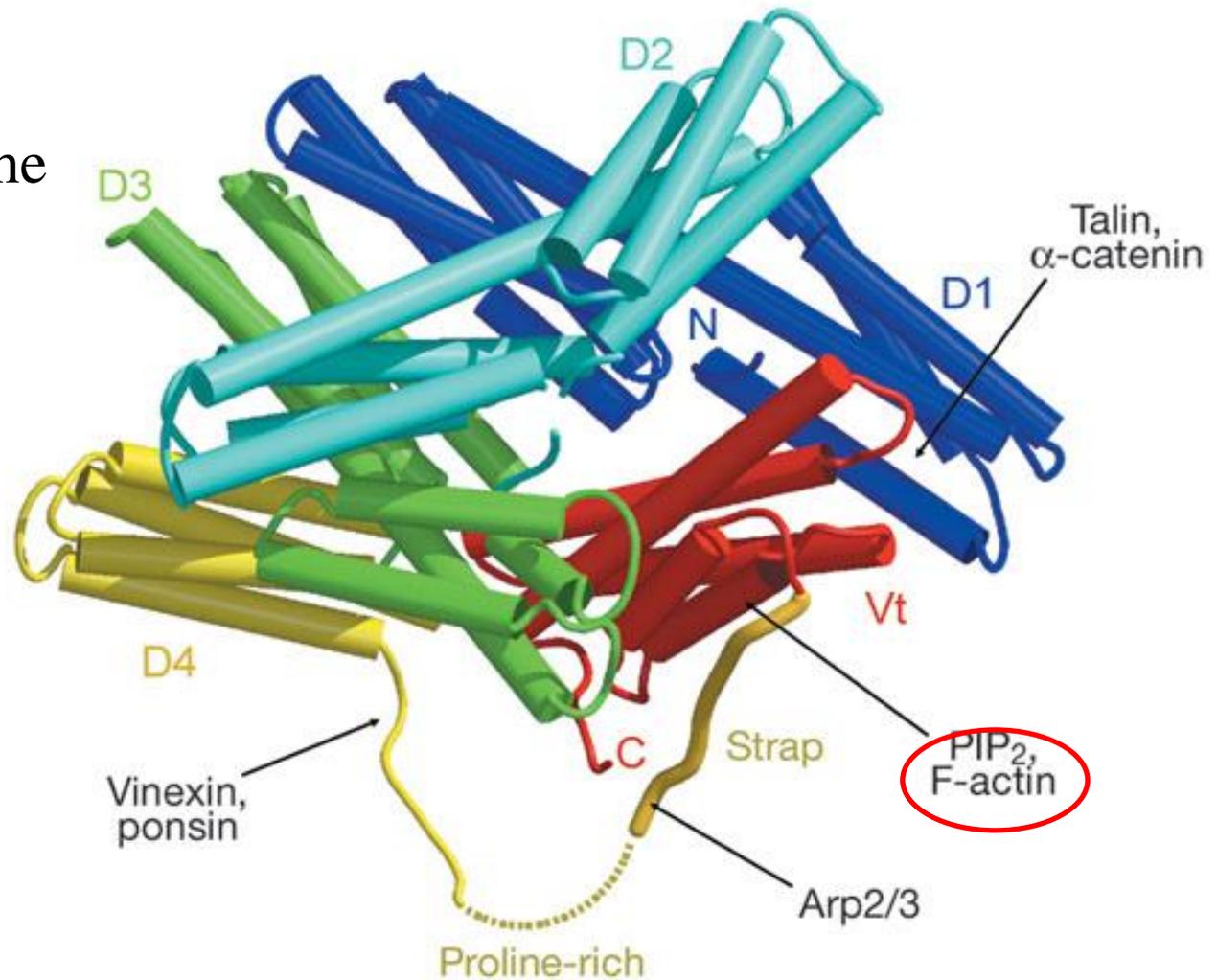
# Vinculina (inattiva, autoinibita)

Fascio di fasci di  $\alpha$ -eliche

D1-4: testa

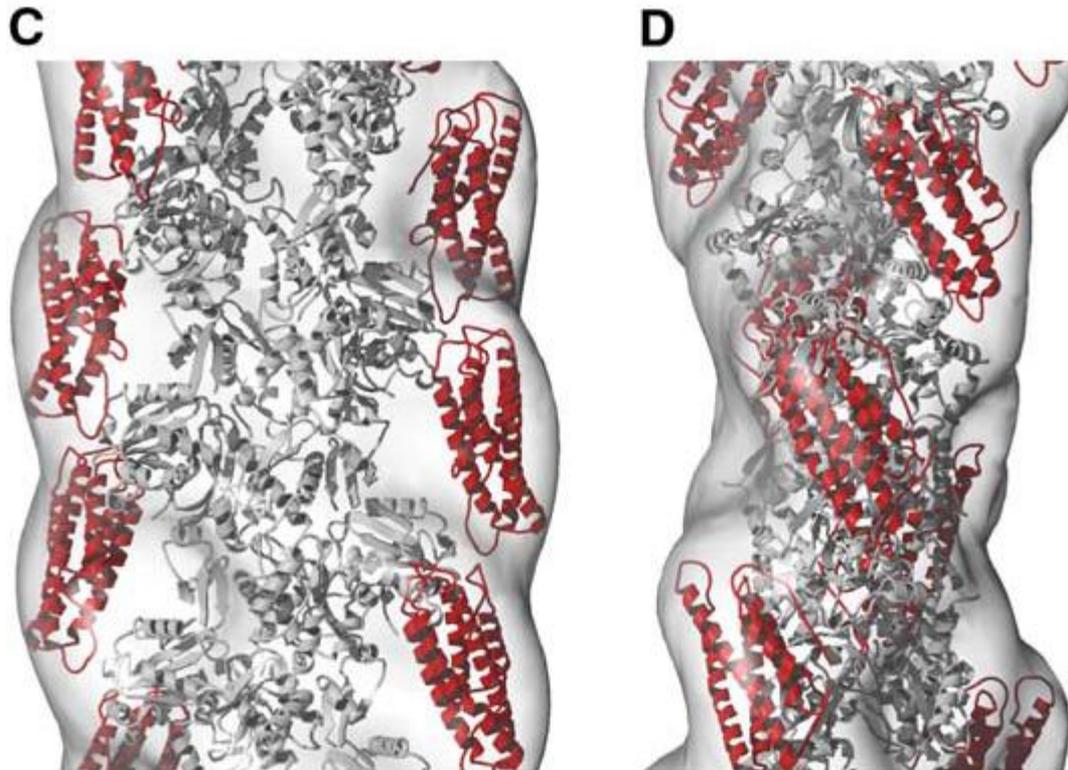
D5 (Vt): coda

5  $\alpha$ -eliche

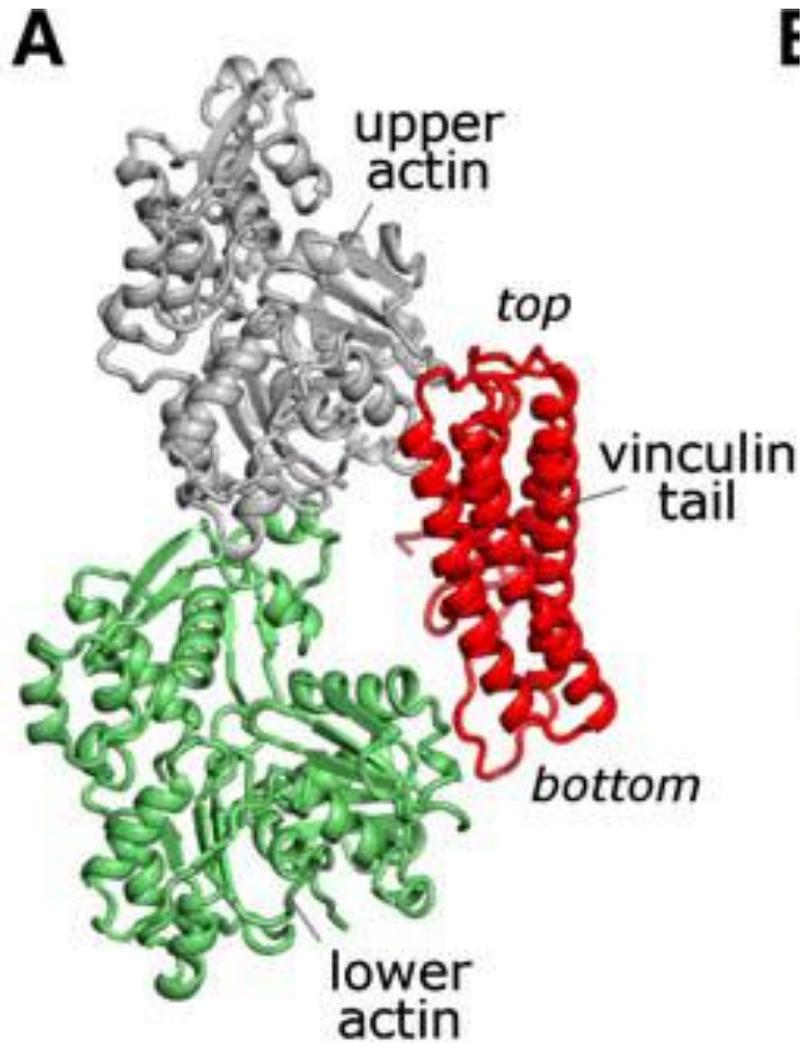


# Vinculina – Actina

Vt interagisce con due monomeri di actina

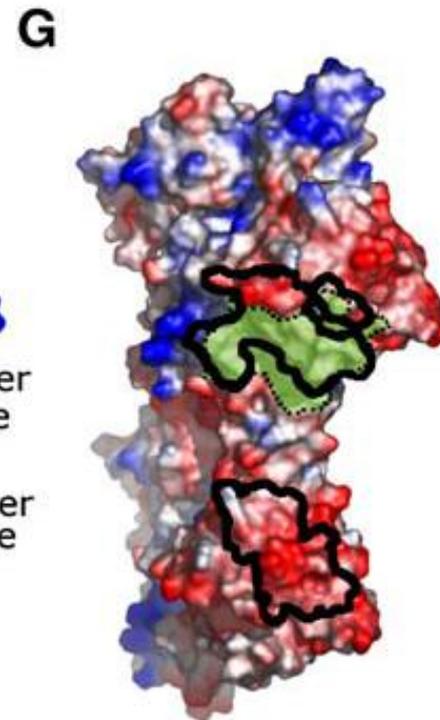
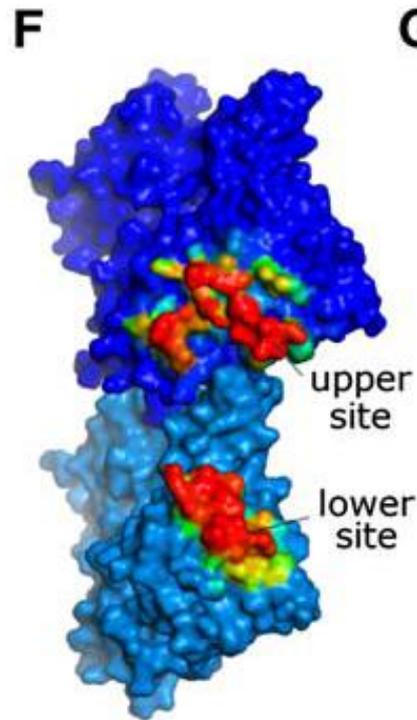
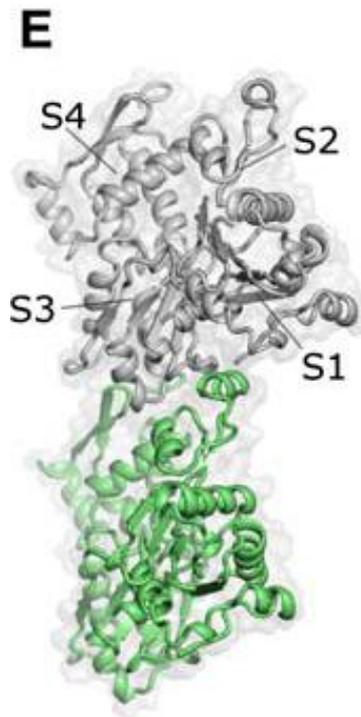


# Vinculina - Actina

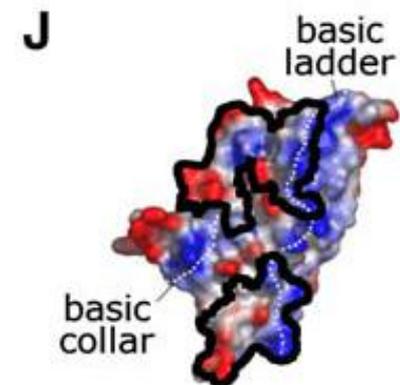
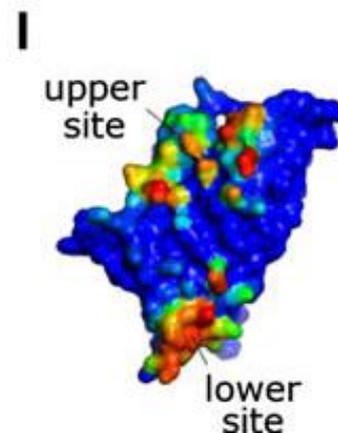
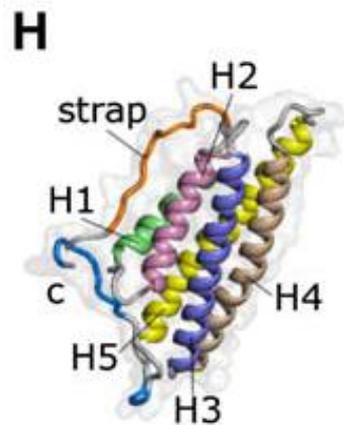


# Vinculina - Actina

actina



Vinculina  
Vt





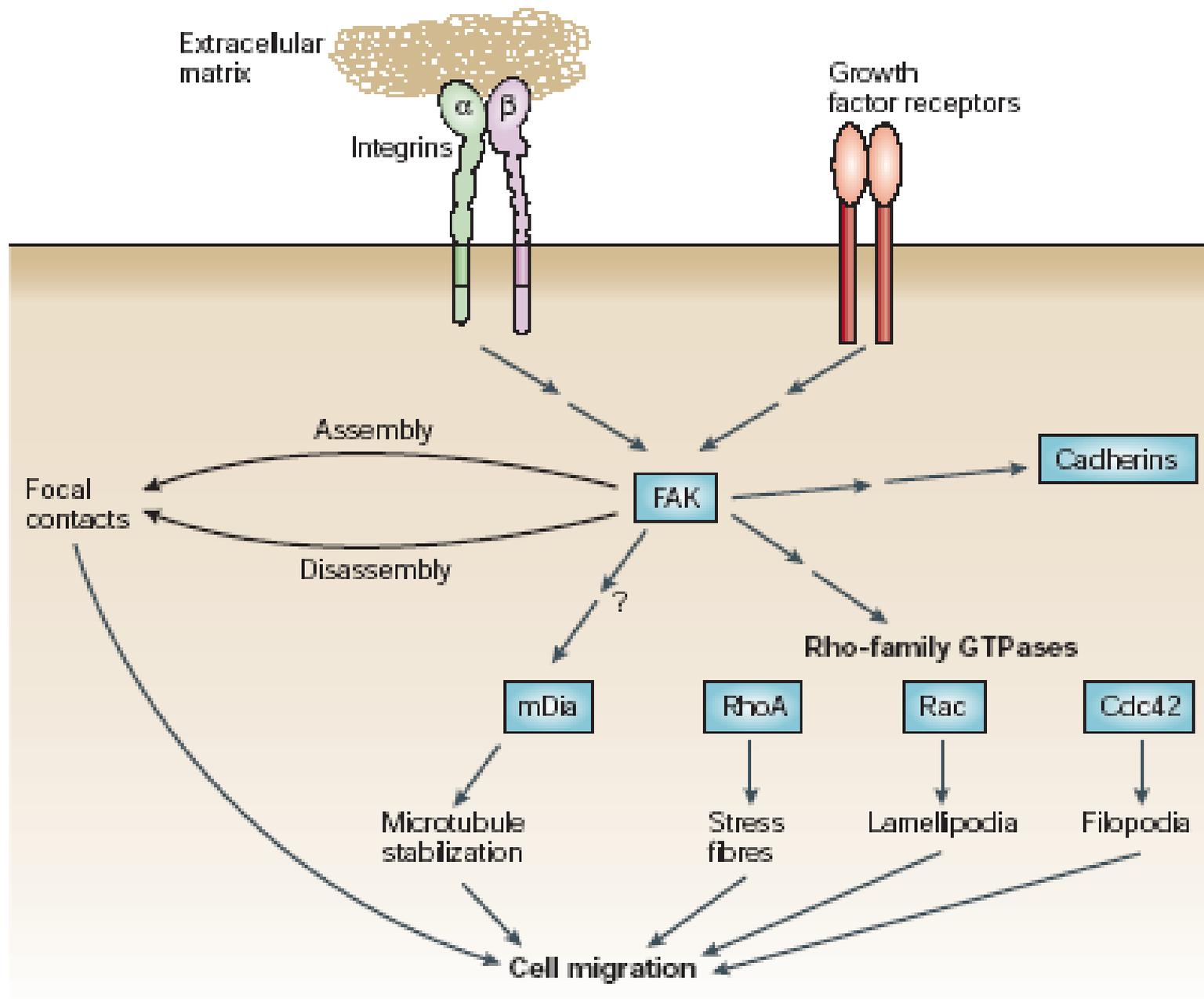
# Adesioni focali

- integrine ( $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ )
- altre proteine di membrana: sindecani, lailina (lega ialuronani)
- proteine di membrana con funzione enzimatica
  
- proteine linker che legano le integrine all'actina: vinculina, talina, tensina, filamina,  $\alpha$ -actinina
- altre proteine della placca citoplasmatica, spesso con funzione di signalling (tyr cinasi, ser/thr cinasi, fosfatasi)

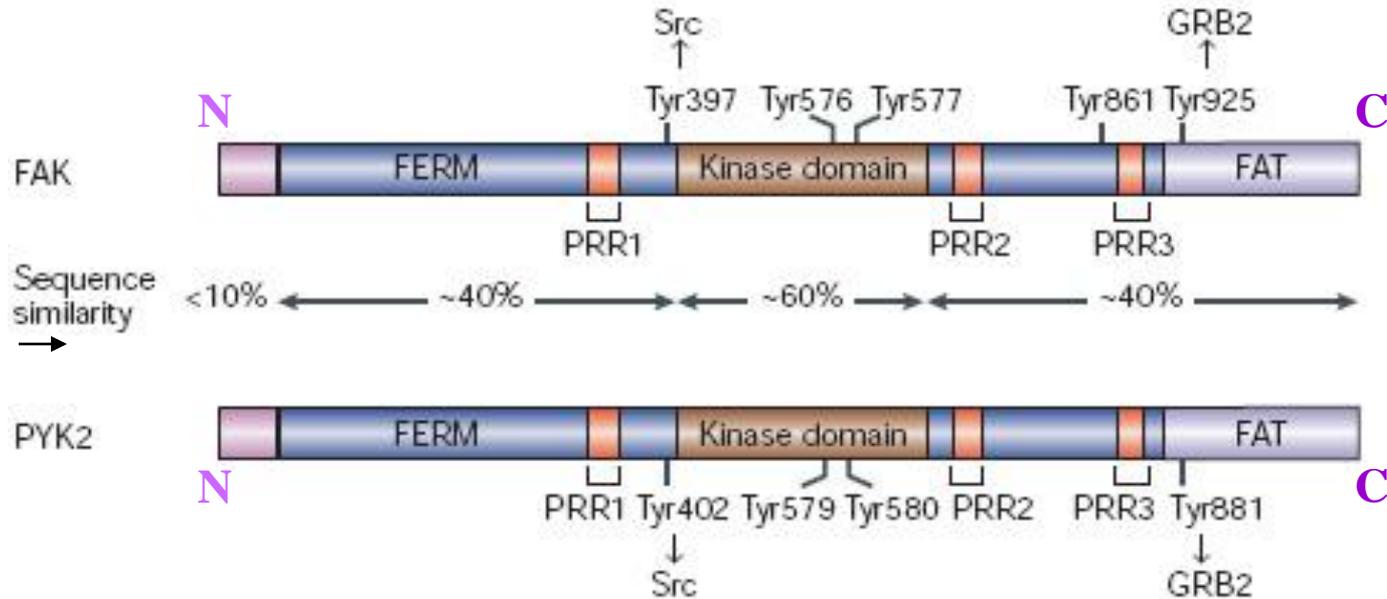


**FAK**

cinasi di adesione focale



## Famiglia FAK di proteine tirosina cinasi non recettoriali:

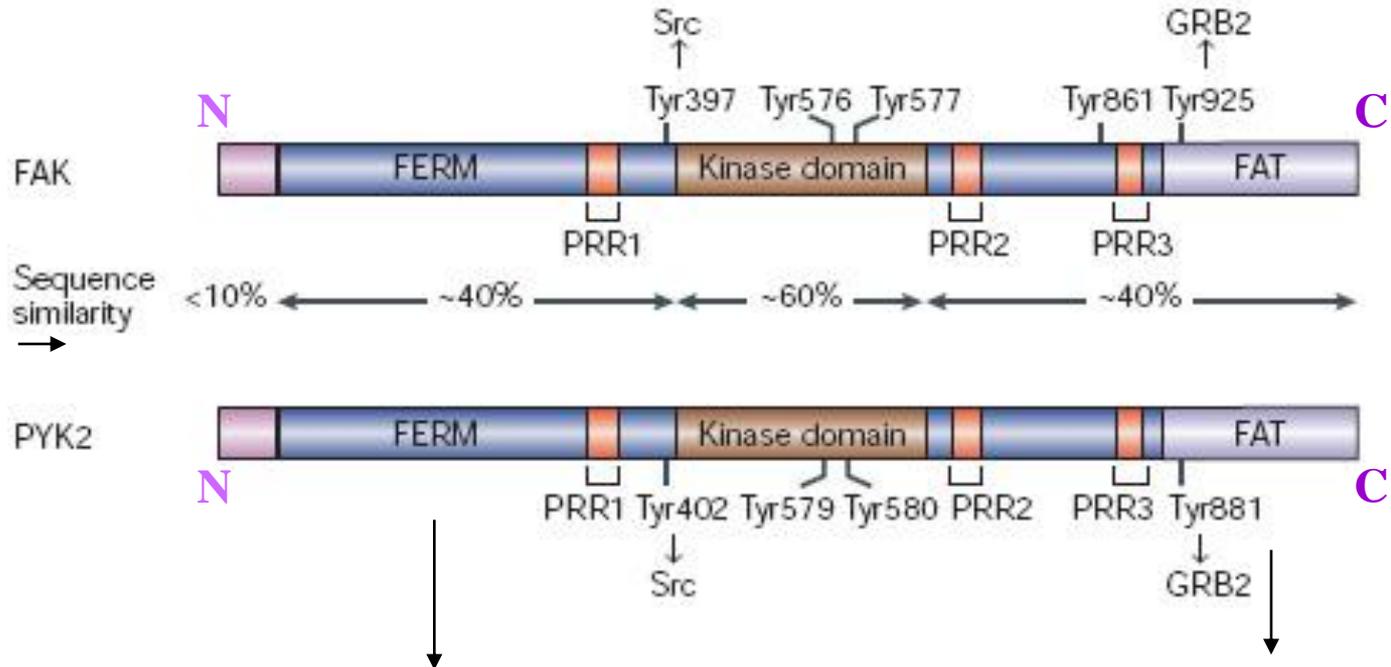


FAK : 125 kDa, espressa nella maggior parte dei tessuti, conservata nell'evoluzione, principalmente localizzata a livello delle adesioni focali

PYK2: espressa ad alti livelli nel cervello, molto meno nel fegato, nel rene, nella milza, nel polmone e nelle cellule di origine ematopoietica, principalmente localizzata a livello perinucleare

Mediano il signalling di integrine e RTK per la regolazione di adesione, morfologia e movimento

# Famiglia FAK



protein **4.1-ezrin-radixin-moesin** domain  
(legano glicoproteine di membrana al  
citoscheletro di actina)

**focal adhesion targeting**

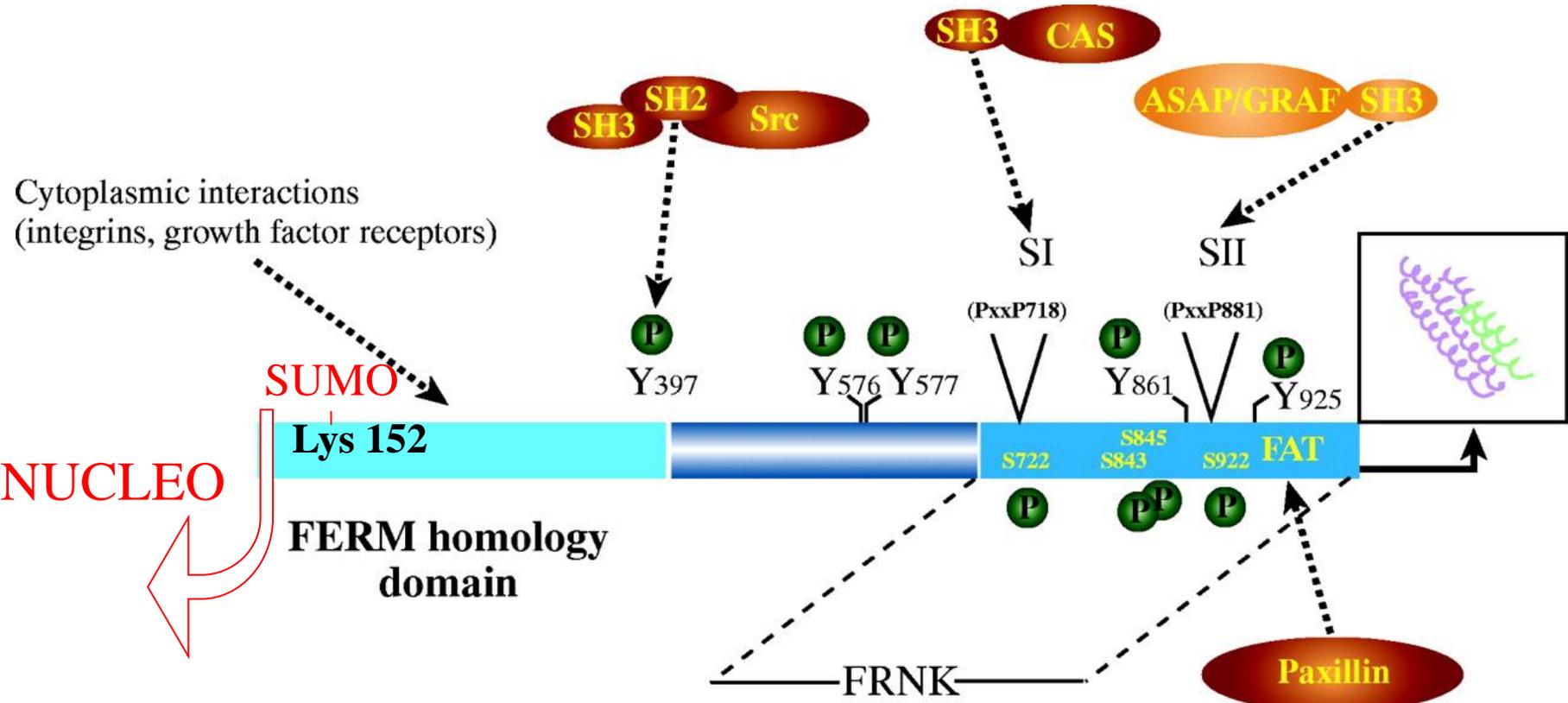


**FRNK**

**FAK related non kinase**

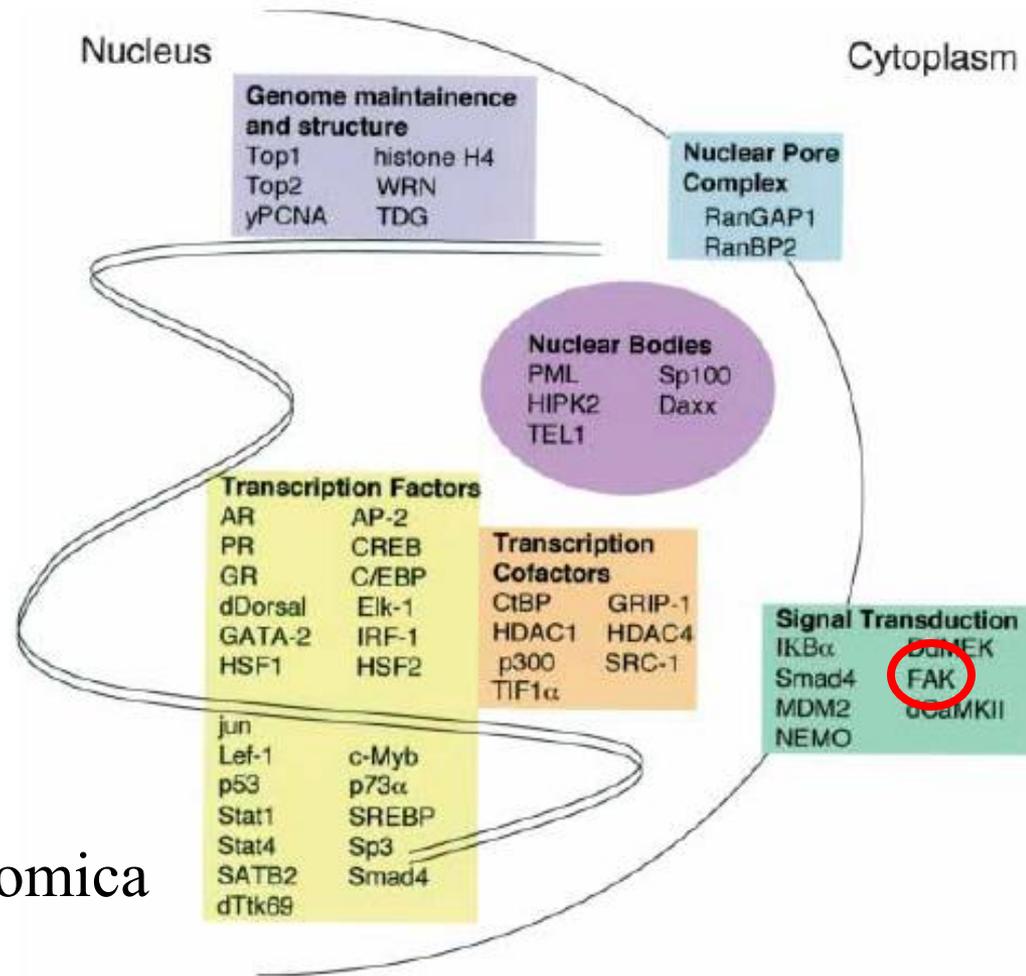
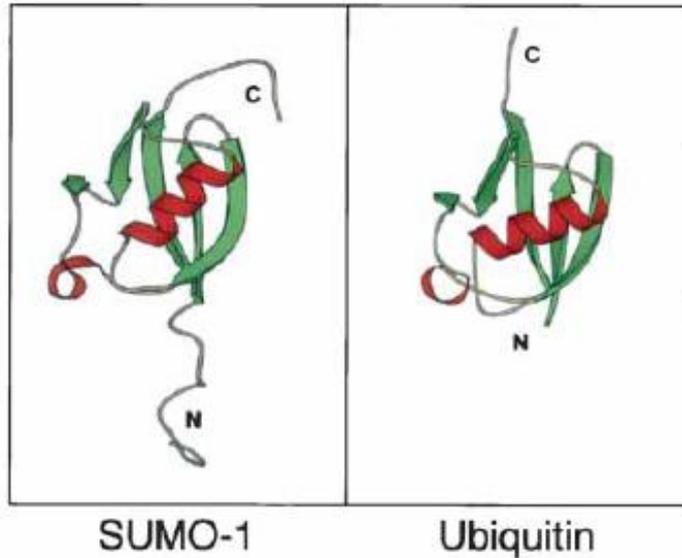
# FAK

cinasi di adesione focale



# Sumoilazione: modificazione post-traduzionale

SUMO: small ubiquitin-like modifier



- Regolazione della trascrizione
- Struttura della cromatina
- Mantenimento dell'integrità genomica
- Trasduzione del segnale

## SUMO:

20 kDa, legata covalentemente ad un residuo di Lys  
ad opera di una ligasi PIAS1

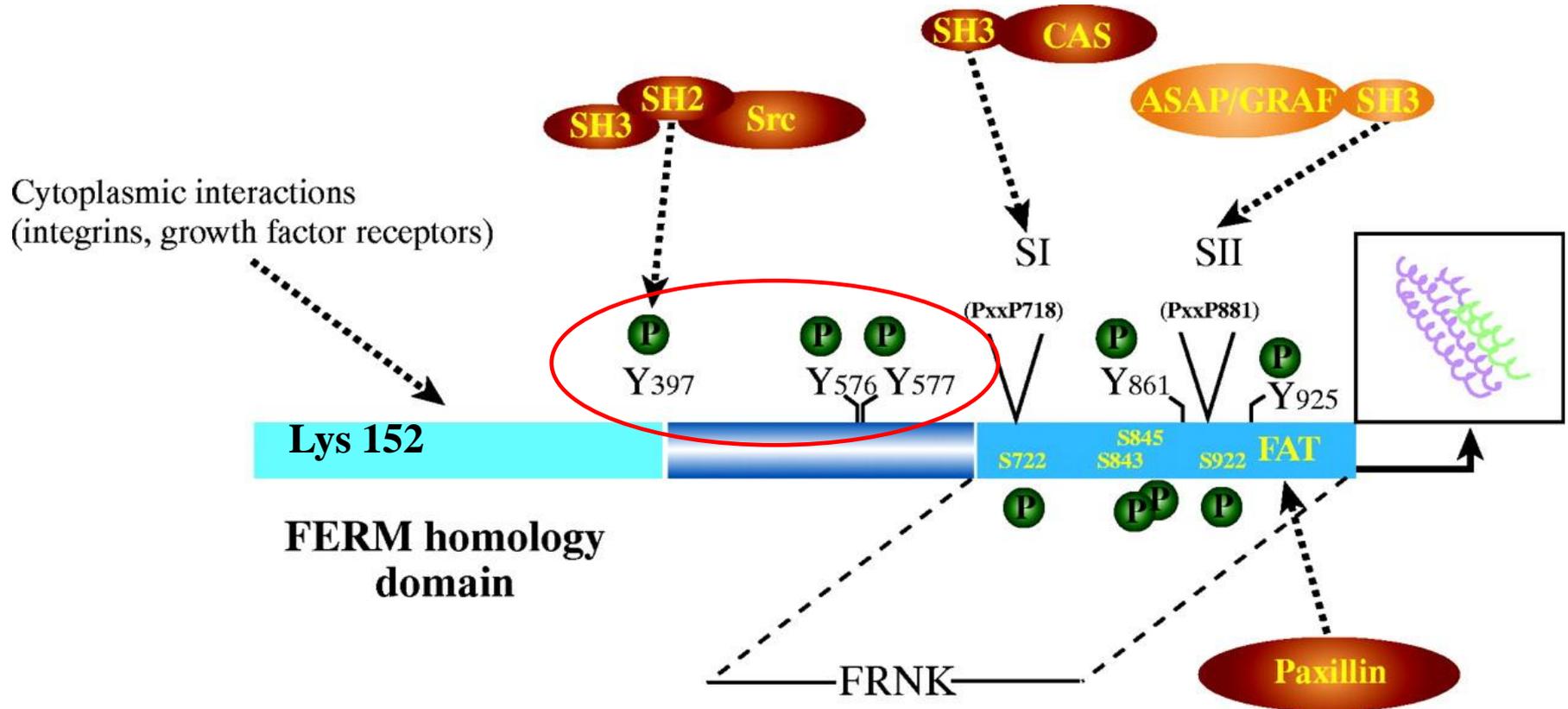
aa idrof. - **K** - X - E/D

FAK sumoilata su Lys152:

- Aumenta la frazione di FAK nucleare, funzione?
- Favorisce l'autofosforilazione di Tyr397

# FAK

cinasi di adesione focale



# Dominio cinasico di FAK

clustering delle integrine



autofosforilazione Tyr-397 di FAK



reclutamento e attivazione di Src (SH2)  
attraverso

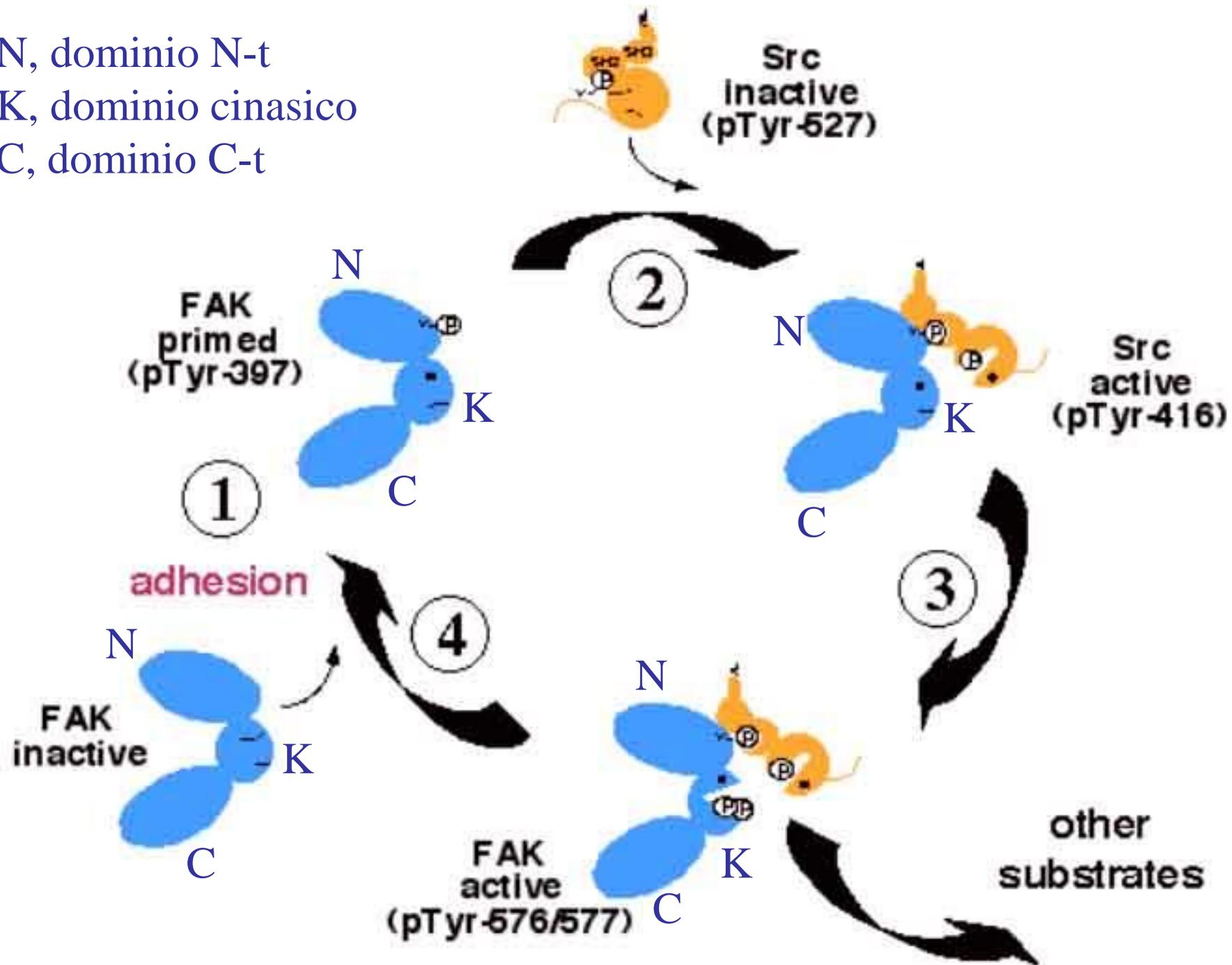
la formazione di un complesso cinasico



Src fosforila Tyr 576 e Tyr 577 di FAK



N, dominio N-t  
K, dominio cinasico  
C, dominio C-t



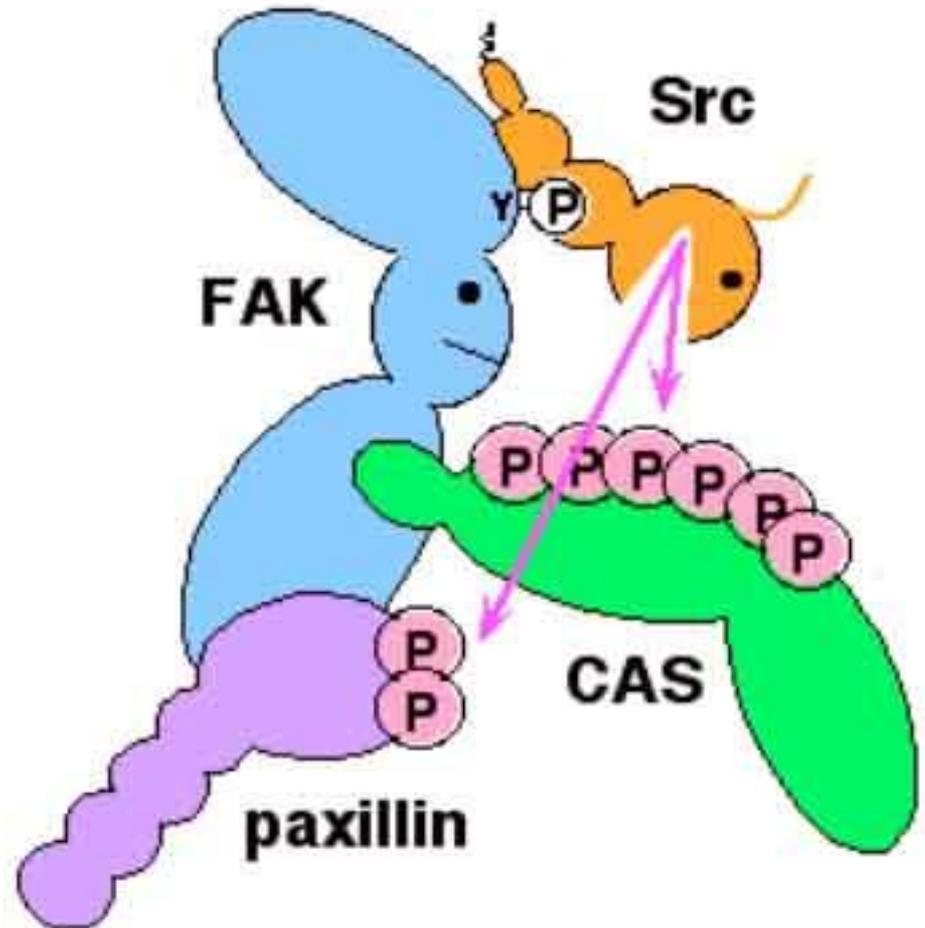
Il complesso FAK/Src  
attivato fosforila anche  
p300/Cas e paxillina



Attivazione di Rac

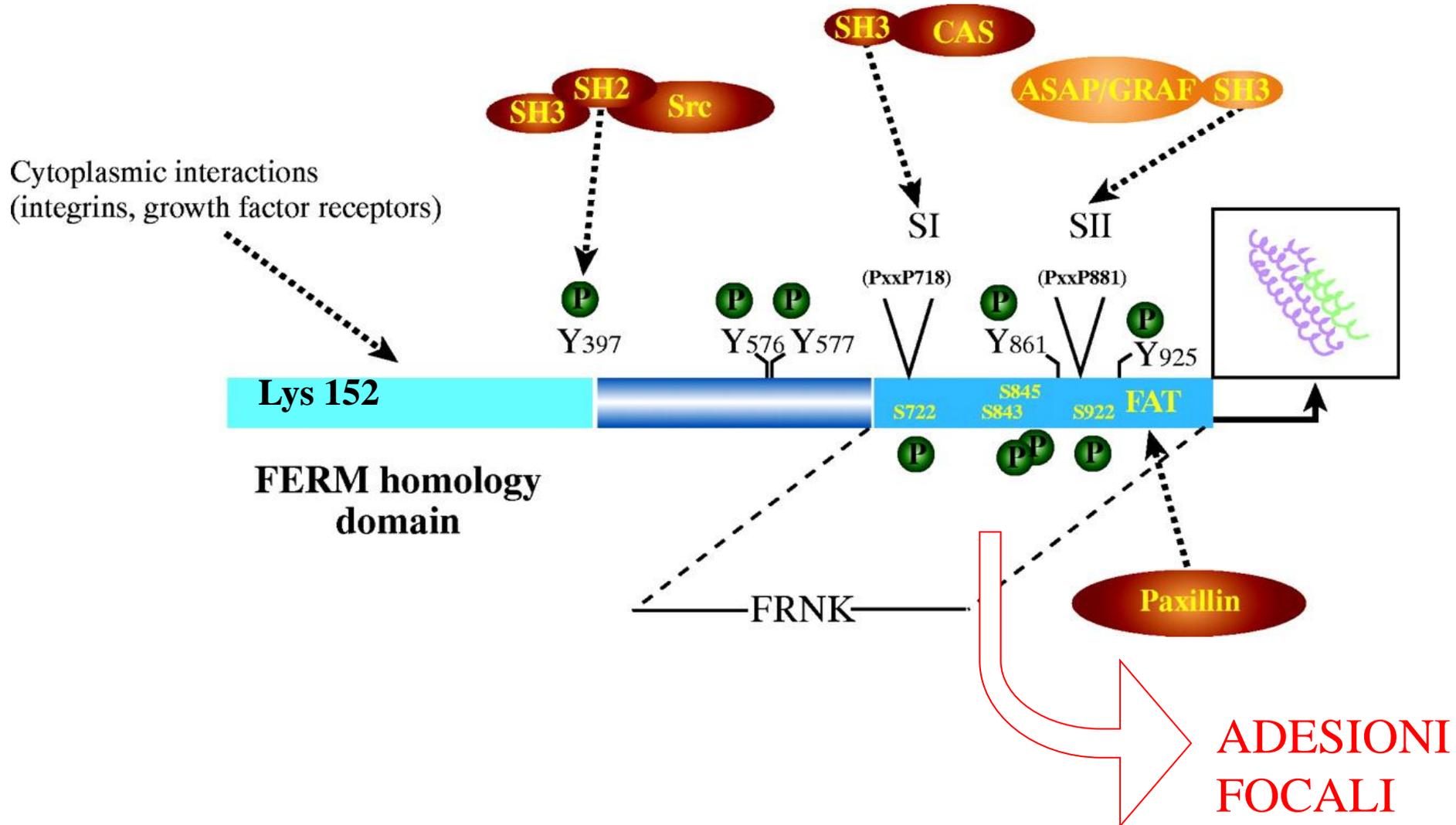


Formazione lamellipodi, migrazione cell

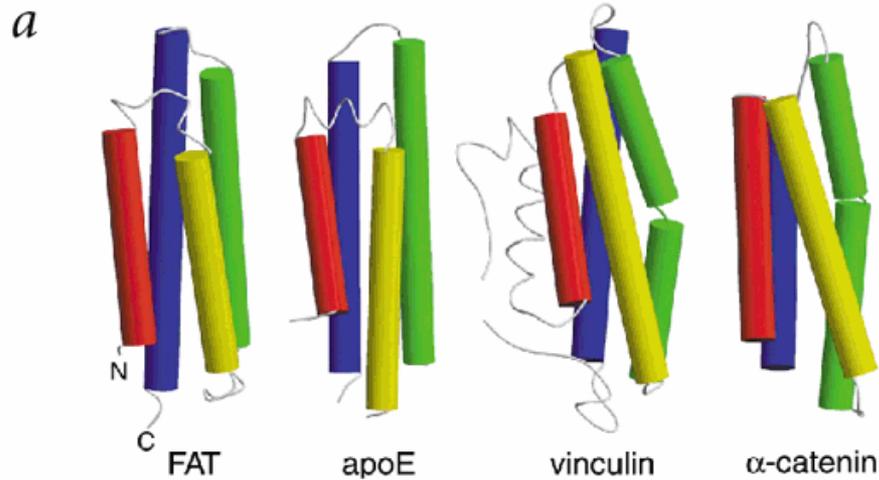


# FAK

cinasi di adesione focale



# Dominio FAT di FAK:



- 140 aa, fascio di 4  $\alpha$  eliche antiparallele, unite da corti segmenti (~  $\alpha$  catenina)
- Core idrofobico, altamente conservato
- Superficie esposta, meno conservata, ad eccezione di due zone idrofobiche :

HP1  
 $\alpha 2 \alpha 3$

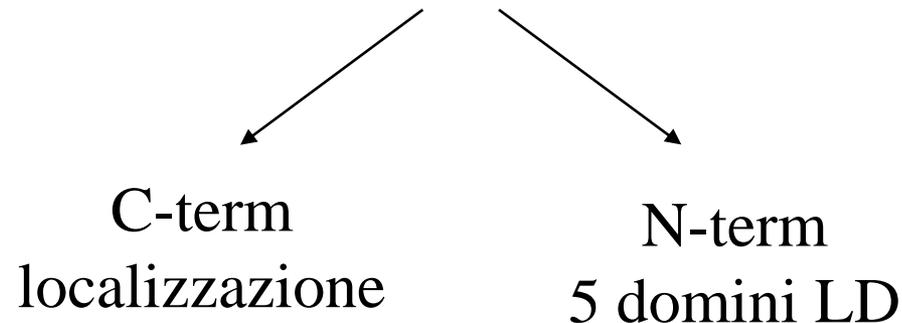
HP2  
 $\alpha 1 \alpha 4$

Legame con paxillina

# Paxillina

proteina adattatrice

- Può legare direttamente integrina  $\alpha 4$  (reclutamento FAK?)
- Può essere fosforilata su Tyr (Src)



# Paxillina

5 motivi LD:  
Seq LDXLLXXL,  
separate da regioni  
Pro/Ser-rich



Struttura  $\alpha$  elica



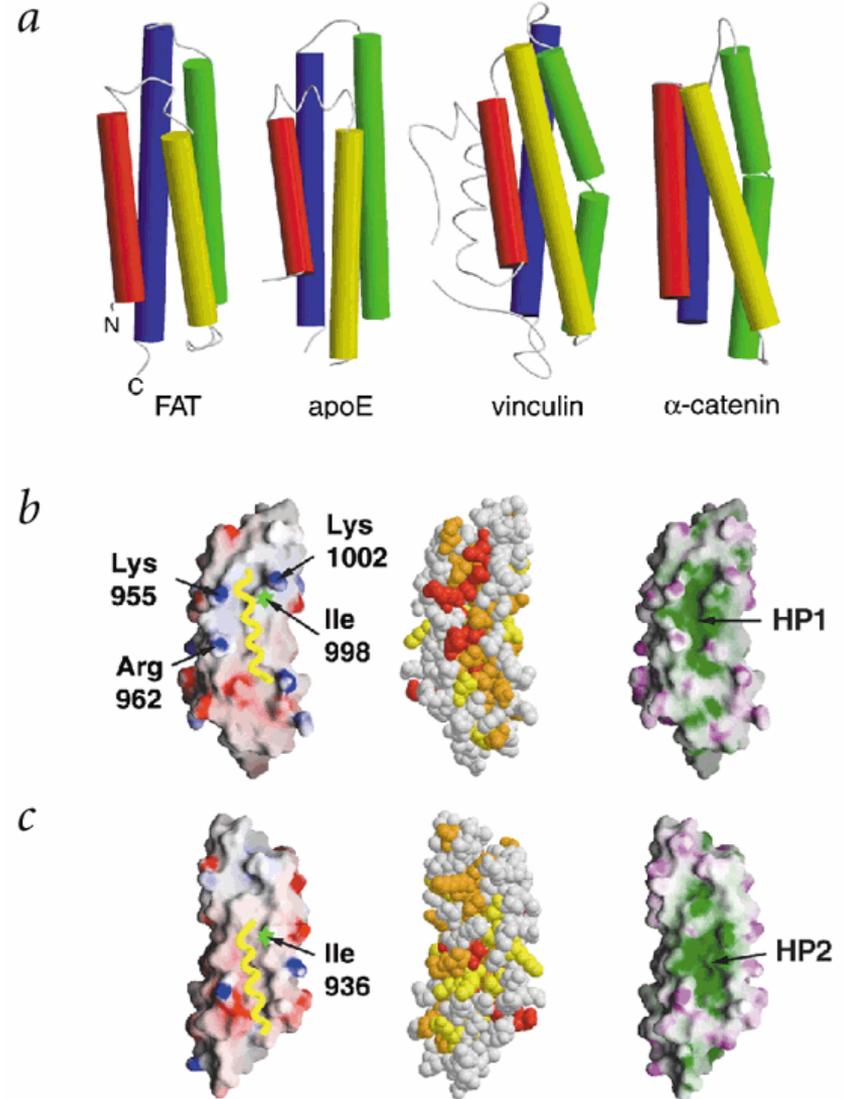
LD2 si inserisce nel fascio (FAT) in  $c$   
corrispondenza di HP1

Fascio di 5 eliche

LD4 interagisce con HP2?

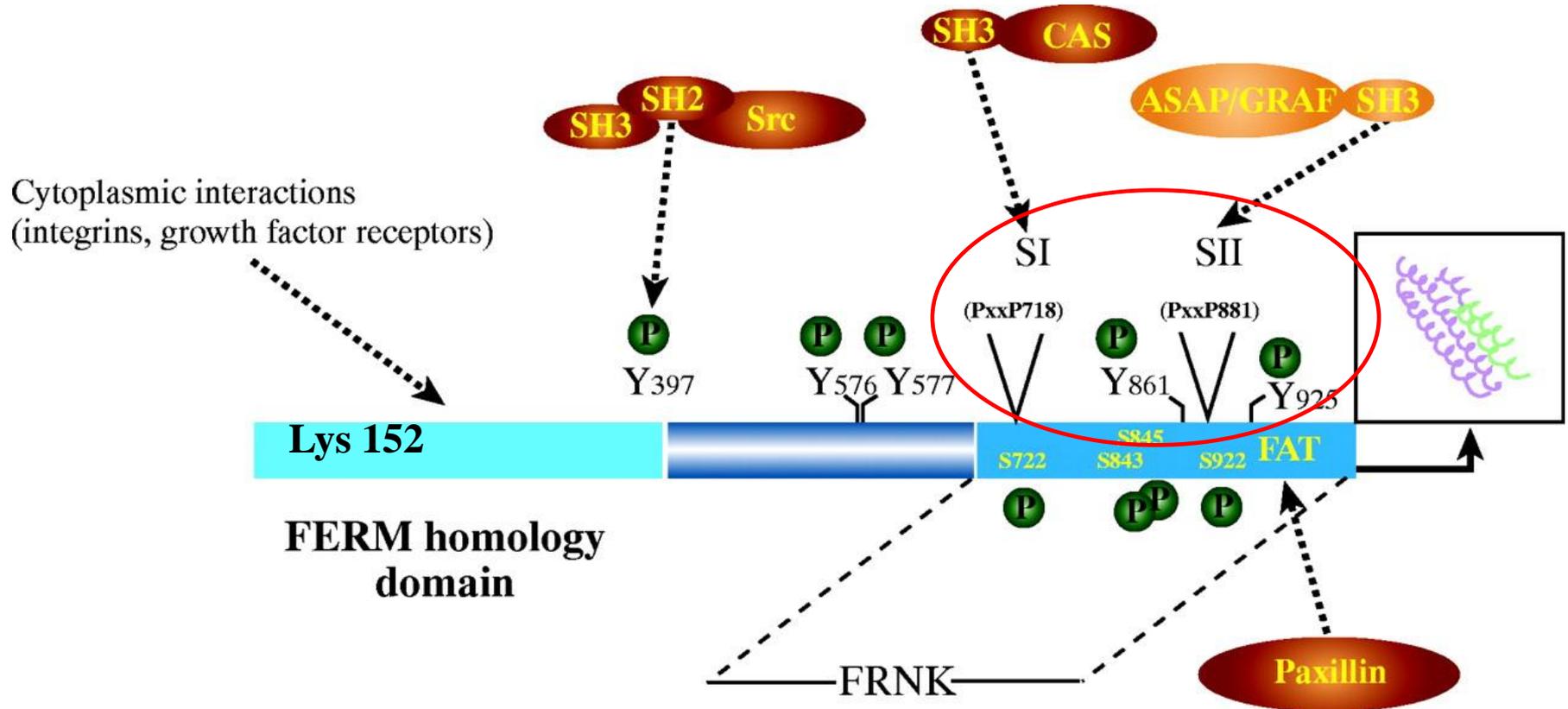
Siti di legame multipli: aumento avidità?

Formazione di complessi di maggior  
dimensioni?



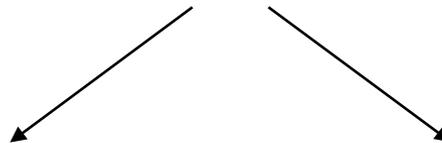
# FAK

cinasi di adesione focale



# Dominio C-terminale di FAK

contiene domini Pro-rich = siti di riconoscimento per domini SH3



Sito I



p130Cas

Proteina adattatrice multifunzionale

Substrato di Src

Attiva Rac sui lamellipodi

Sito II



GRAF (GAP di Rho)

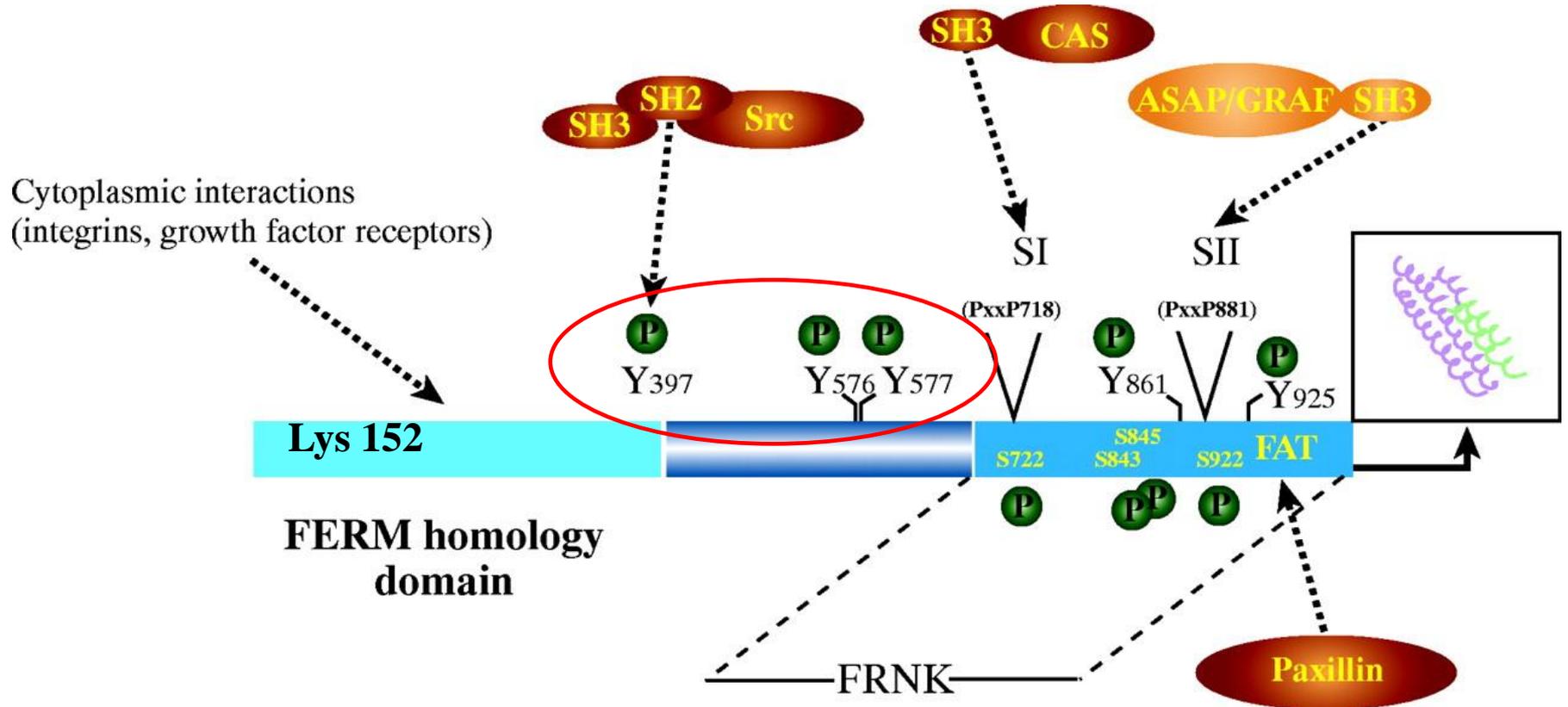
ASAP1 (GAP di Arf1)

Riorganizzazione del citoscheletro:

Turnover delle adesioni focali

# FAK

cinasi di adesione focale



Tyr-397—P

Promuove inoltre il reclutamento di altre proteine con domini SH2:

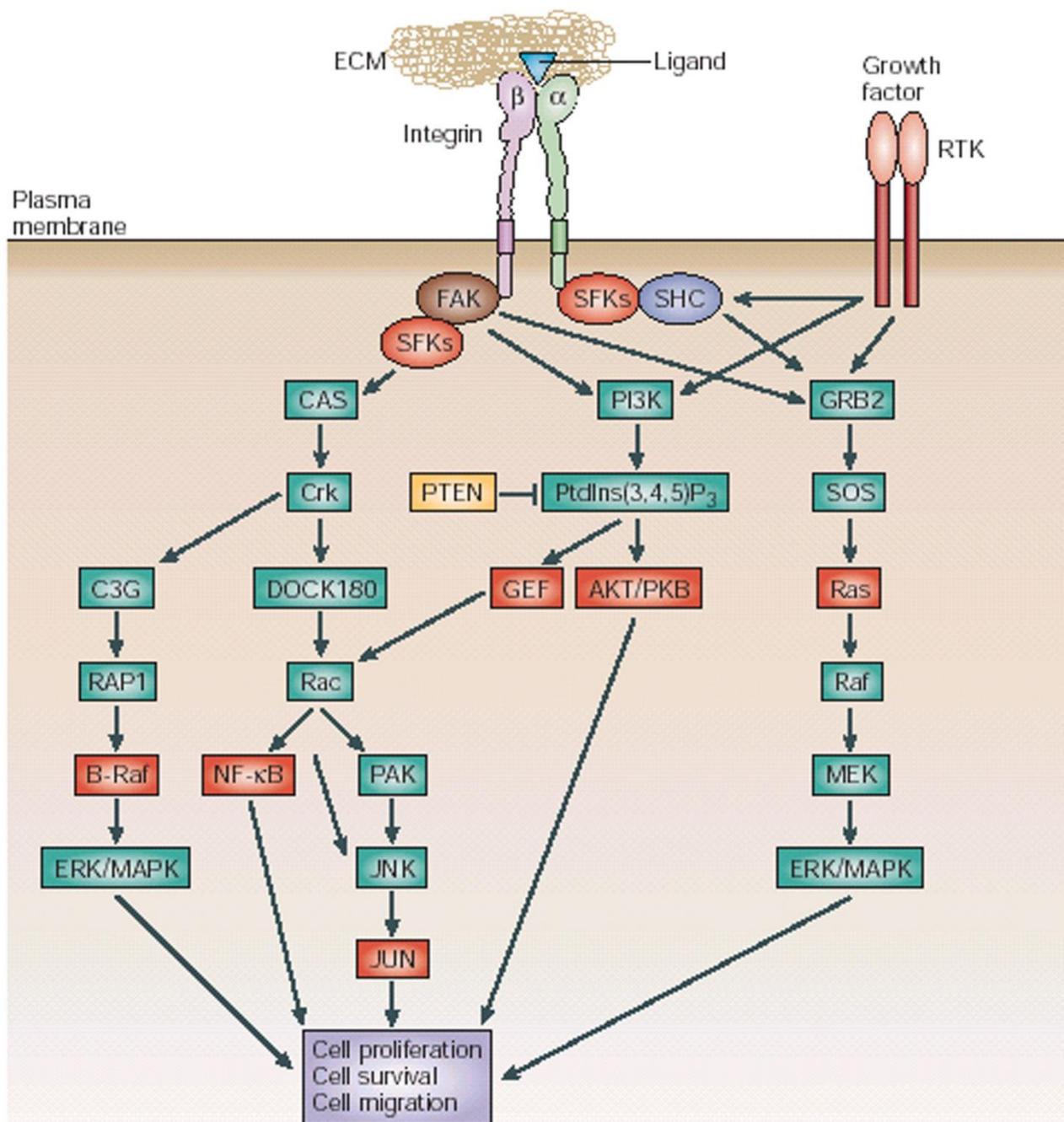
- PI3K
- fosfolipasi C- $\gamma$
- fattore GRB7 (Growth Receptor Binding protein 7)

Tyr-397—P

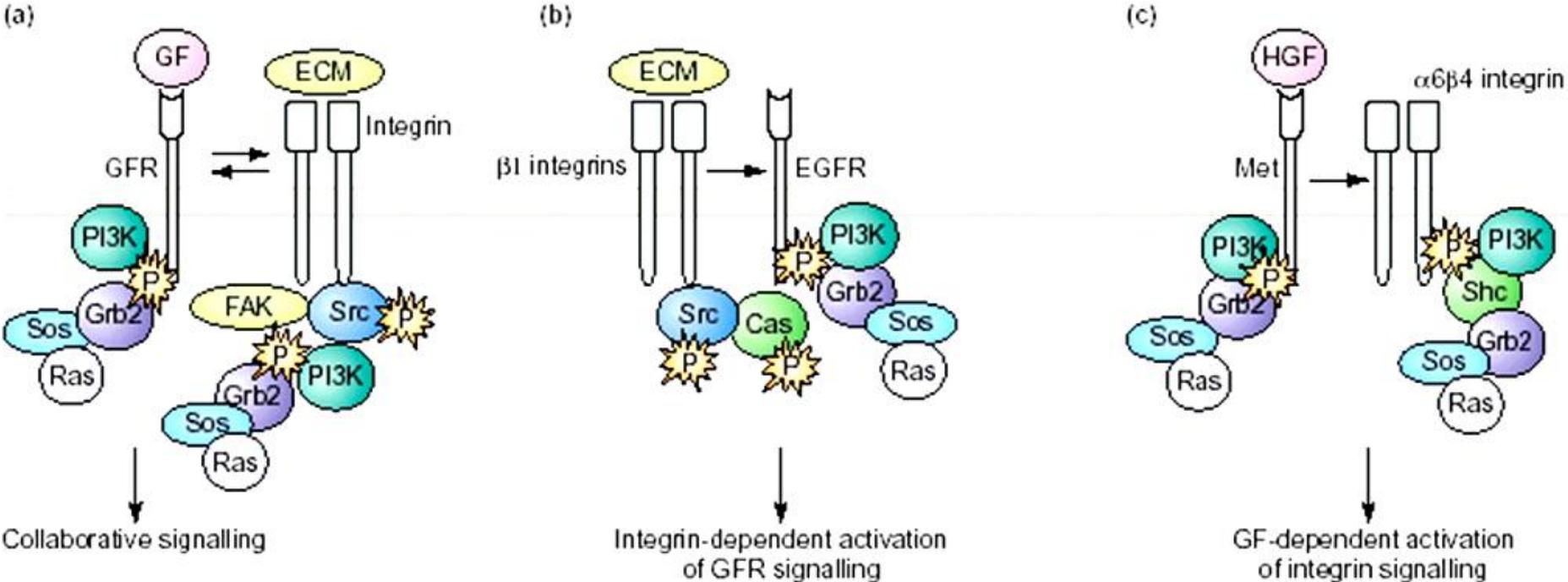
Tyr-925—P

- fattore GRB2/SOS: attivazione cascata Ras/MAPK  $\rightarrow$  sopravvivenza

## Box 1 | Integrin signalling



# Integrine e recettori per i fattori di crescita



proliferazione

morte

differenziamento

## Adesione e cancro

sopravvivenza

migrazione

Le molecole dell'adesione: possibili target antitumorali

## Caderine:

Downregolazione

Perdita



invasività

## Integrine:

Cooperazione con GFR



Proliferazione  
sopravvivenza

## FAK:

Overespressione di FAK  
(amplificazione genica)



Sopravvivenza  
Migrazione invasività

Ras, Src, Rho...:  
oncogeni



Proliferazione  
differenziamento

# Bibliografia

Springer T.A, J. Wang “The Three-Dimensional Structure of Integrins and their Ligands, and Conformational Regulation of Cell Adhesion”, *Advances in Protein Chemistry* (2004) 68:29-63.

M.A. Arnaout, B. Mahalingam, and J.-P. Xiong “Integrin Structure, Allostery, and Bidirectional Signaling” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (2005) 21:381–410.

Wenjun Guo and Filippo G. Giancotti, “INTEGRIN SIGNALLING DURING TUMOUR PROGRESSION”, *Mol. Cell Biol.* (2004) 5:816-826.

Geiger B. et al. “Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk”, *Mol. Cell Biol.* (2001) 2:793-805.

Mitra S.K. et al. “Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility”, *Mol. Cell Biol.* (2005) 6:56-68.

Comoglio P.M. et al. “Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: breaking the rules” *Curr. Opin. Cell Biol.* (2003) 15:565-571.

Mandy E.W. et al. “Three-Dimensional Structure of Vinculin Bound to Actin Filaments”, *Molecular Cell* (2006) 21: 271–281.