

Uloga integrina u međustaničnoj komunikaciji i prijenosu signala

Božić, Tanja

Undergraduate thesis / Završni rad

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:334466>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ULOGA INTEGRINA U MEĐUSTANIČNOJ KOMUNIKACIJI I
PRIJENOSU SIGNALA

INTEGRIN FUNCTION IN CELL COMMUNICATION AND
SIGNALLING

SEMINARSKI RAD

Tanja Božić

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: Doc. dr. sc. Maja Matulić

Zagreb, 2011.

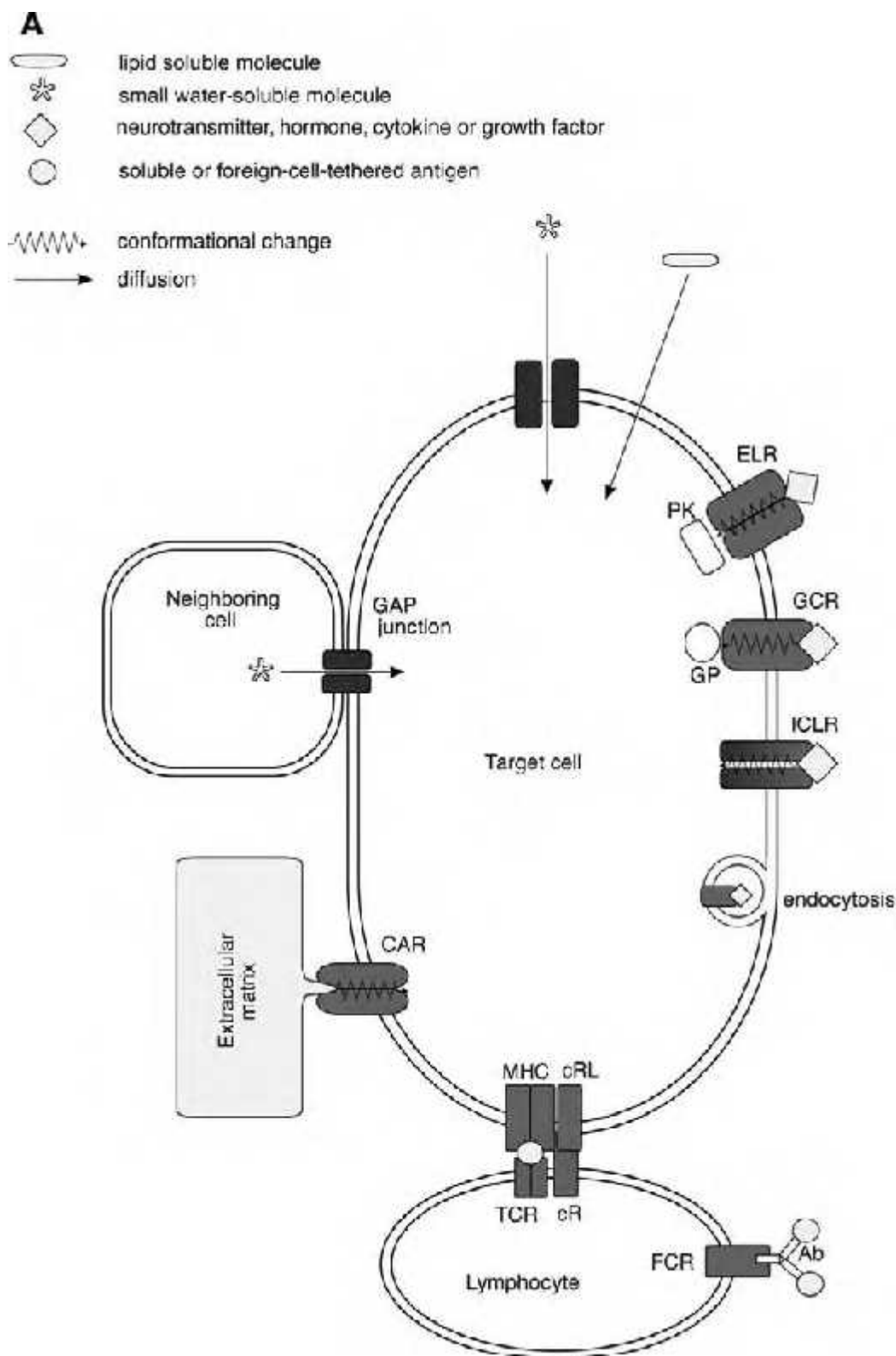
UVOD	2
Osnovni principi stanične signalizacije	2
INTEGRINI- UVOD	5
Evolucijski aspekt integrina i njihova važnost	5
STRUKTURNA OSNOVA INTEGRINA U REGULACIJI I SIGNALIZACIJI	7
Struktura α I-domene i konformacijske promjene	8
Model vezanja liganda za glavu integrina	10
α i β nožice i citoplazmatska domena	10
Model dvosmjerne signalizacije	12
BIOLOŠKA ULOGA INTEGRINA	14
Integrini u staničnoj adheziji, organizaciji citoskeleta i pokretljivosti	14
Anatomija matrične adhezije	15
Integrini i citoskelet: strukturna povezanost i prijenos signala	16
Uloga integrina u metastaziranju	19
Integrini, apoptoza i stanično preživljenje	21
Regulacija stanične proliferacije putem integrina	23
Uloga integrina u imunološkom sustavu	24
SAŽETAK	27
SUMMARY	28
LITERATURA	29

UVOD

Pojedinačne stanice i mnogostanični organizmi trebaju «osjećati» okolinu i reagirati na nju. Samostalna stanica (pa čak i «primitivna» bakterija) mora biti sposobna pronaći nutrijente, razlikovati svjetlost od tame, izbjegavati toksine i predatore. Ako će takva stanica imati bilo koji oblik „socijalnog života“ mora biti sposobna komunicirati s drugim stanicama. U mnogostaničnim organizmima stvari su mnogo kompleksnije. Stanice moraju razlikovati višestruke signale koje primaju od ostalih stanica kako bi mogle koordinirati svoje ponašanje. Primjerice, stanice u embrionalnom razvoju razmjenjuju signale kako bi odredile koju specijaliziranu funkciju će stanica usvojiti, koju će poziciju zauzeti u animalnom organizmu te hoće li preživjeti, podijeliti se ili odumrijeti. U tom razdoblju stanice također segregiraju, migriraju te agregiraju u tkiva i organe. Kasnije raznoliki signali upravljaju rastom organizma, održavanju homeostaze i ponašanju. U odrasloj dobi vaskularne endotelne stanice te fibroblasti migriraju kod zacjeljivanja rana, leukociti migriraju kao odgovor na infekciju, a tumorske stanice putuju za vrijeme metastaziranja (Beckerman 2005).

Osnovni principi stanične signalizacije

Početak signalnog događaja se uglavnom temelji na interakciji između molekula iz ekstracelularnog matriksa (ECM) i membranskog prostora. Različite molekule mogu služiti kao izvanstanični signali (Sl.1.): hormoni, citokini, faktori rasta i neurotransmiteri, koji se mogu izlučiti iz distalnih ili susjednih stanica; antigeni i antitijela, koji slobodno cirkuliraju tjelesnim tekućinama ili su vezani za leukocite ili strane stanice (npr. bakterije); male topive molekule (<1000 Da) kao što su ioni ili metaboliti; te ECM. Makromolekule koje su odgovorne za prijenos molekularnih signala u ciljanu stanicu su transmembranski proteini. Jedina iznimka su signalne molekule koje su topive u lipidima (npr. steroidni hormoni, dušikov monoksid, NO) i mogu se slobodno kretati u lipidnom dvosloju stanice. Male topive molekule se mogu transportirati putem membranskih kanala i nosača te tijesnih spojeva između stanica. Veće topive molekule ili filamenti iz ECM-a zahtijevaju specifičnu interakciju s transmembranskim receptorima i koreceptorima za prijenos signala preko membrane.



Slika 1. Paradigma transmembranske signalizacije: vrste signalnih molekula i mehanizmi interakcije. ELR= „enzyme linked receptor“ (enzimski vezan receptor); GCR= „G-coupled receptor“ (receptor povezan G-proteinom); ICLR= „iron-channel-linked-receptor“ (receptor vezan Fe-kanalom); PK= protein kinaza; GP= G protein; Ab= „antibody“ (antitijelo); MHC= „major histocompatibility complex“ (glavni kompleks histokompatibilnosti); TCR= „T-cell receptor“ (T-stanični receptor); FCR= Fc receptor; cR= „coreceptor“ (koreceptor); cRL= „coreceptor ligand“ (ligand za koreceptor); CAR= „cell adhesion receptor“ (receptor za staničnu adheziju) (Preuzeto iz: Bradshaw i Dennis 2003).

Transmembranski receptorski protein prolazi intramolekularnu konformacijsku promjenu ili promjenu u kvarternoj strukturi (npr. dimerizaciju) nakon vezanja s izvanstaničnim signalom. Takav signalni receptor može biti kovalentno ili nekovalentno povezan s nekim ionskim kanalom koji će omogućiti promjenu prometa iona preko stanične membrane ili s nekom unutarstaničnom komponentom, koja se aktivira i inducira signalnu kaskadu u stanici. Dok je signalni proces putem ionskih kanala trenutan i kratkotrajan, enzimski vezani receptori pokazuju spor i kompleksan molekularan mehanizam, kojim mogu postići veliki amplifikacijski efekt. Na kraju se utječe na ekspresiju gena ili neke druge stanične aktivnosti koje će rezultirati staničnim odgovorom na primljeni signal.

Iznimno je važna dobra regulacija i koordinacija signalnih događaja. Bilo koja interakcija između receptora i liganda je određena lokalnom efektivnom koncentracijom signalne molekule te konstantom disocijacije. Različiti faktori mogu kontrolirati koncentraciju signalnih molekula, npr. enzimska razgradnja ili njihovo privremeno skladištenje. Gustoća membranskih receptora se može mijenjati endocitozom. Fizikalno- kemijska i geometrijska svojstva aktivnog mjesta receptora (koji određuje konstantu disocijacije) se mogu izmijeniti interakcijom s lokalnom okolinom. Promjena fizioloških uvjeta ili vezanje efektorske molekule iz citosola, membrane ili izvanstaničnog prostora (npr. ion, metabolit ili neki drugi protein) mogu dramatično promijeniti afinitet vezanja liganda za receptor. Do promjene afiniteta kompleksa receptor-ligand najčešće dolazi zbog konformacijske promjene ili promjene u elektrostatskom potencijalu dodirne površine između receptora i liganda. Afinitet nekih kompleksa je mali, pa su potrebni dodatni proteini ili koreceptori za stabilnost ili aktivaciju (Bradshaw i Dennis 2003).

INTEGRINI

Integrini su glavni receptori mnogostaničnih organizama za staničnu adheziju za proteine ekstracelularnog matriksa i adheziju između stanica. Osim toga, integrini su transmembranski povezani s citoskeletom i aktiviraju mnoge unutarstanične signalne puteve. Integrini i njihovi ligandi igraju značajnu ulogu u razvoju, imunološkom odgovoru, prometu leukocita, homeostazi i tumorima. Često su razlog mnogih genetičkih i autoimunih bolesti u ljudi. Oni su također receptori mnogih virusa i bakterija (Hynes 2002).

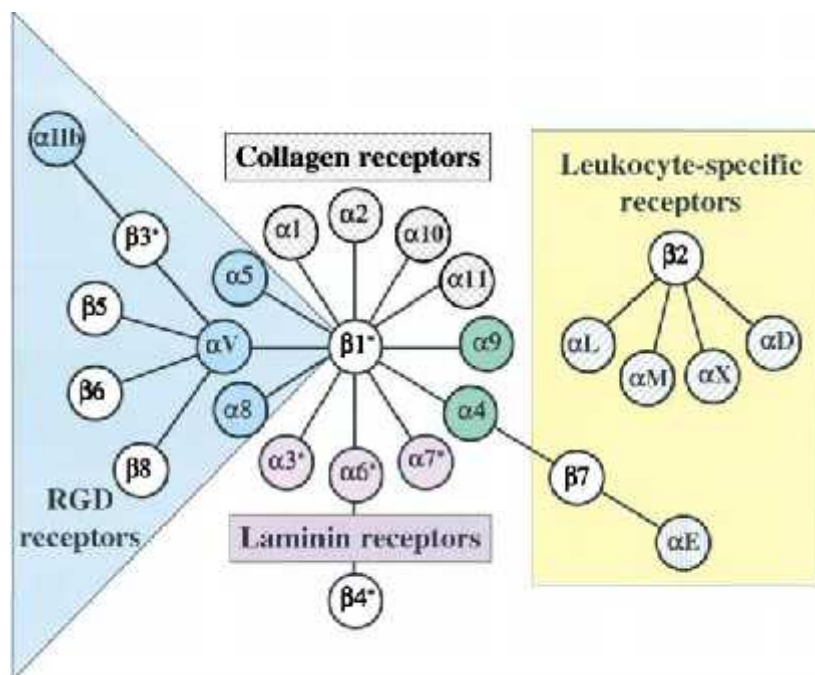
Evolucijski aspekt integrina i njihova važnost

Integrini su ograničeni na podcarstvo metazoa. Homolozi nisu pronađeni u biljkama i gljivama. Međutim, kod prokariota su pronađene homologne sekvence domena koje čine α i β podjedinicu integrina (Johnson i sur. 2009). Najstariji bilateralni organizmi su imali barem dva $\alpha\beta$ heterodimera. Kralježnjaci su proširili integrine na dva seta (Sl. 2.). Jedan set prepoznaje tripeptidnu sekvencu RGD¹ u molekulama kao što su fibronektin i vitronektin u kralježnjaka, te tigrin kod roda *Drosophila*. Drugi set je odgovoran za adheziju na laminin iz bazalne membrane. Slika 2. prikazuje kompletan set integrina u sisavaca. Obuhvaća 8 β podjedinica i 18 α podjedinica koje se, kako je do sada poznato, spajaju u 24 različita integrina. Kralježnjaci imaju set kolagenskih receptora s I/A domenom ($\alpha1$, $\alpha2$, $\alpha10$, $\alpha11$) te par srodnih integrina ($\alpha4\beta1$ $\alpha9\beta1$) koji prepoznaju proteine iz ECM-a i površinske stanične protureceptore iz superporodice Ig.

Većina integrina prepoznaje relativno kratke peptidne motive. Ključna aminokiselina je obično kisela. Specifičnost za neki ligand se oslanja na obje podjedinice nekog $\alpha\beta$ heterodimera. Sva 24 integrina pokazuju specifičnu funkciju koja je neophodna. Njihova važnost se očituje iz fenotipa kojeg pokazuju miševi kojima je genetičkom manipulacijom onemogućena ekspresija pojedinih integrina („knockout“). Pokazalo se da inaktivacijom pojedinih integrina može doći do kompletne blokade preimplantacijskog razvoja ($\beta1$), značajnih razvojnih defekata ($\alpha4$ $\alpha5$ αv , $\beta8$), perinatalne letalnosti ($\alpha3$, $\alpha6$, $\alpha8$, αv , $\beta4$, $\beta8$),

¹ RGD- tripeptidna sekvenca aminokiselina: Arg-Gly-Asp.

poremećaja u funkciji leukocita (α_L , α_M , α_E , β_2 , β_7), u upali (β_6), održavanju homeostaze (α_{IIb} , β_3 , α_2), remodeliranju kostiju (β_3), angiogenezi (α_1 , β_3) i dr. (Hynes 2002).

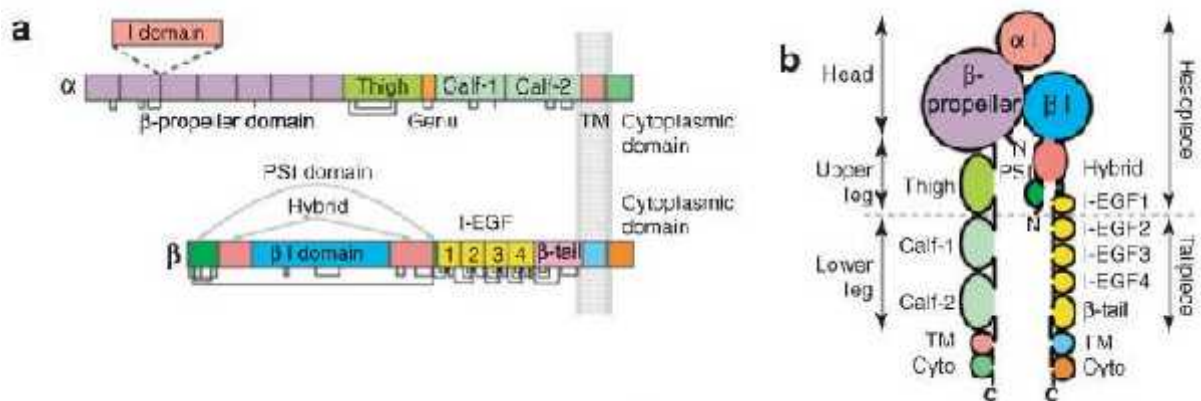


Slika 2. Integrini su $\alpha\beta$ heterodimeri. Na slici su prikazane podjedinice integrina kod sisavaca i njihova asocijacija. 8 β podjedinica se može složiti s 18 α podjedinica, tvoreći tako 24 različita integrina. Oni se mogu razmatrati u nekoliko subfamilija koje se temelje na evolucijskim odnosima, specifičnost za neki ligand, te u slučaju β_2 i β_7 integrina, ograničenost na bijele krvne stanice. Sive α podjedinice sadže I/A domenu. Zeleno obojane su ograničene na svitkovce (α_4 i α_9), ljubičaste α podjedinice su specifične za laminine, a plave α podjedinice su karakteristične za RGD receptore. Zvezdice ukazuju na citoplazmatske domene koje se dorađuju (Preuzeto iz: Hynes 2002).

STRUKTURNA OSNOVA INTEGRINA U REGULACIJI I SIGNALIZACIJI

Integrini koji sudjeluju u adheziji su glikozilirani heterodimeri. Sastoje se od nekovalentno vezanih transmembranskih α i β podjedinica. Svaka od podjedinica se sastoji od velike izvanstanične domene (N-terminus, koji sadrži >700 aminokiselinskih ostataka), koja se označava kao glava integrina. Iz glave svake podjedinice se pružaju nožice, koje završavaju transmembranskom domenom (>20 aminokiselinskih ostataka). Integrin završava kratkom citoplazmatskom domenom (C-terminus, koji sadrži 13-70 aminokiselinskih ostataka), a označava se kao citoplazmatski rep (Sl. 3.b).

Glava integrina se sastoji od tzv. domene β -propelera α podjedinice sastavljene od 7 lopatica. β -propeler je u bliskom kontaktu s β podjedinicom, tzv. I-domenom. U nekim integrinima je ubačena I-domena i u β -propeler α podjedinice (Sl. 3.a) (Bradshaw i Dennis 2003).



Slika 3. Shematski prikaz opće strukture integrina. **a)** Prikazana je organizacija domena integrina u primarnoj strukturi. Neke α podjedinice imaju umetnutu I-domenu na mjestu naznačenom crtanim linijama. Linije ispod pravokutnika ukazuju na disulfidne mostove. **b)** Shema kvaterne strukture integrina. Integrini se sastoje od glave, noge te citoplazmatskog repa. Glavu čine I-domene u obje podjedinice te β -propelera u α podjedinici. Nožica se sastoji od gornje i donje nožice, s obzirom na mjesto savijanja integrina. Gornju nožicu α podjedinice čini domena „thigh“, a β podjedinice hibrid i I-EGF1. Donju nožicu α podjedinice čini domene „Calf-1“ i „Calf-2“, a β podjedinice I-EGF2-4 i β -rep. Crtkana linija naznačuje mjesto savijanja integrina. Slijed domena u α i β podjedinicama prati organizaciju domena u primarnoj strukturi (slika a) (Preuzeto iz: Luo i sur. 2007).

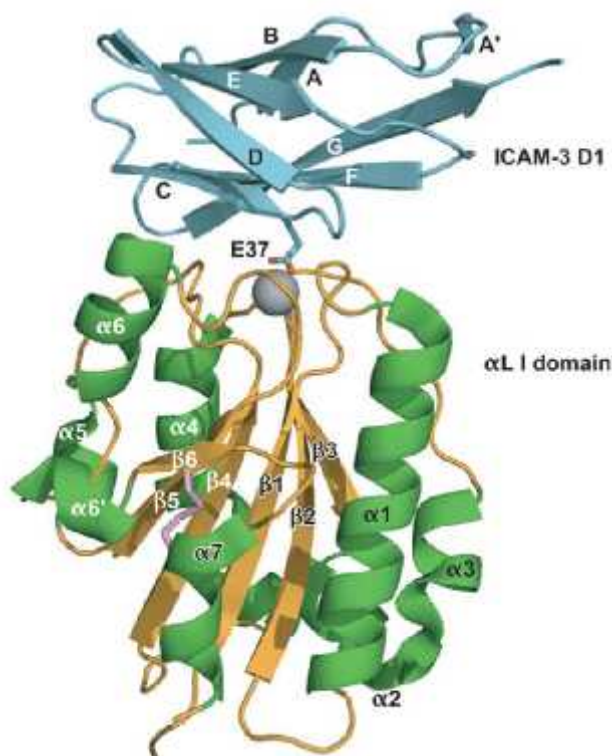
Struktura α I-domene i konformacijske promjene

Prva kristalizirana domena integrina bila je I/A-domena. Polovica integrina sisavaca sadrži ovu domenu. Naziv je dobila po pojavi insercije 200-ak aminokiselina (I=inserted) u α -podjedinicu ili po A domeni (A) von Willebrandovog faktora. I-domena je glavna vezna domena za ligand u integrinima koji je imaju. Iznimno je važno poznavati njezinu strukturu jer je ona temelj razumijevanja konformacijske regulacije i vezivanje liganda u gotovo svim integrinima.

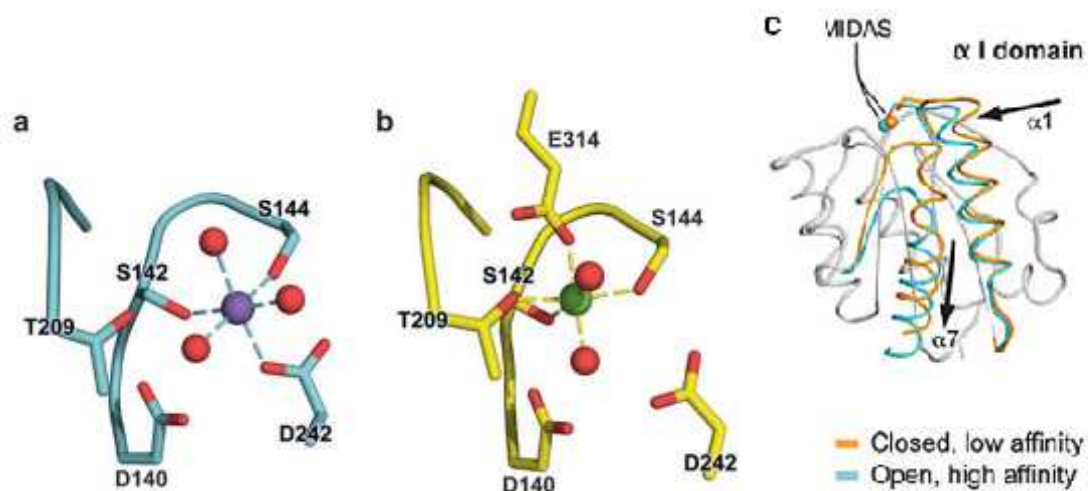
I-domena ima strukturu Rossmanovog zavoja, čija se srž sastoji od paralelnih β ploča okruženih amfipatskim α uzvojnica. Dijelovi β ploče alterniraju s α uzvojnica, tako da uzvojnice omataju domenu u smjeru suprotnom od kazaljke na satu kada se gleda s „gornje“ strane. Gornja strana I-domene je definirana veznim mjestom za bivalentni kation, koji veže Mg^{2+} (Sl. 4.). Pet bočnih ogranaka, koji se nalaze na tri različite petlje, koordiniraju Mg^{2+} . Prva, $\beta 1-\alpha 1$ petlja sadrži tri koordinacijska bočna ogranka, Asp-Xaa-Ser-Xaa-Ser ili DXSXS. Druga petlja sadrži Thr, a treća petlja donira Asp. Kako je ova struktura važna za vezanje liganda dobiva naziv MIDAS („metal ion-dependent adhesion site“ - adhezijsko mjesto ovisno o metalnom ionu) (Sl. 5.a i b).

I-domena β podjedinice je homologa I-domeni α podjedinice. Njezina struktura je nešto kompleksnija, jer ima još dva dodatna segmenta. Jedan segment pomaže u stvaranju vezne površine s β -propelerom, a drugi segment je poznat kao SDL („specificity-determining loop“ – petlja koja određuje specifičnost), budući da sudjeluje u vezanju liganda.

I-domene su kristalizirane u tri strukturne konformacije: zatvorenoj, prijelaznoj i otvorenoj. Promjena koordinacije u MIDAS-u je popraćena promjenom okosnice petlji koje nose koordinacijske aminokiseline. Petlje $\beta 1-\alpha 1$ i $\beta 4-\alpha 5$ također nose aminokiseline koje su u direktnom kontaktu s ligandom i njihov pomak povećava komplementarnost s ligandom. Petlja $\beta 6-\alpha 7$ prolazi najveći pomak iako nije u direktnom kontaktu s MIDAS-om. Kako se mijenja položaj $\beta 6-\alpha 7$ petlje, tako se i C-terminus $\alpha 7$ -uzvojnice pomiče niz I-domenu za 7 Å (Sl. 5.c). Pomak $\alpha 7$ -zavojnice je važna poveznica za prijenos konformacijskog signala između MIDAS-a α I-domene i ostalih domena integrina. Ovaj pomak je također dovoljan za prijelaz I-domene u stanje većeg afiniteta za ligand (Luo i sur. 2007).



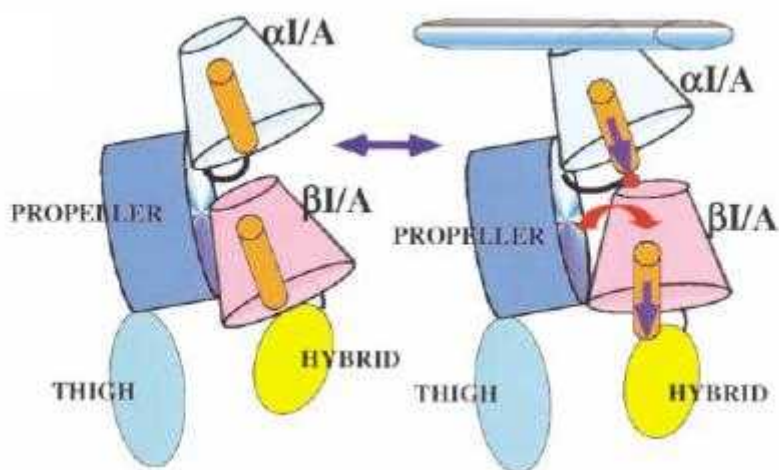
Slika 4. Struktura α L I-domene u kompleksu s ligandom ICAM-3 (Intercelularna adhezijska molekula na koju se vežu integrini) (boje cijan). Označene α uzvojnice su prikazane zelenom bojom i alterniraju s dijelovima β ploče koje su prikazane u smeđoj boji. Mg^{2+} je istaknut kao siva sfera. Prikazan je i ključni bočni ogranak za vezanje liganda s integrinom, Glu37. Ljubičastom bojom je označena mutacija koja stabilizira otvorenu konformaciju (Preuzeto iz: Luo i sur. 2007).



Slika 5. a) Struktura zatvorene konformacije MIDAS mjesta u α M integrinu. Mg^{2+} je koordiniran s pet bočnih ogranaka (Asp140-Ser142-Ser144; Thr209; Asp242) s 3 MIDAS petlje. **b)** Otvorena konformacija MIDAS I-domene. Dodatni Glu314 koordinira Mg^{2+} . Mg^{2+} je prikazan ljubičastom i zelenom sferom, a crvenim sferama je naznačen koordinacijski kisik iz vode. **c)** Prikazana je konformacijska promjena α I-domene. Sivom bojom su prikazani nepokretni elementi. Metalni ion zatvorene konformacije je žuta sfera, a otvorene konformacije cijan boje. Strelice naznačuju pomak petlji i $\alpha 7$ i $\alpha 1$ uzvojnica. Položaj uzvojnica u zatvorenoj konformaciji je u žutoj boji, a u otvorenoj konformaciji u cijan boji (Preuzeto iz: Luo i sur. 2007).

Model vezanja liganda za glavu integrina

Integrin $\alpha 2\beta 1$ sadrži α I-domenu. Njegov ligand je kolagen, koji se veže na vezno mjesto α I-domene. Kao što je već ranije spomenuto, vezanje liganda uzrokuje pomak MIDAS-a, petlje $\beta 6-\alpha 7$ i spuštanje C-terminalne $\alpha 7$ -uzvojnice za 7 Å. $\alpha 7$ -uzvojnica je povezana s petljom koja sadrži konzervirani Glu. Smatra se da ovaj Glu predstavlja



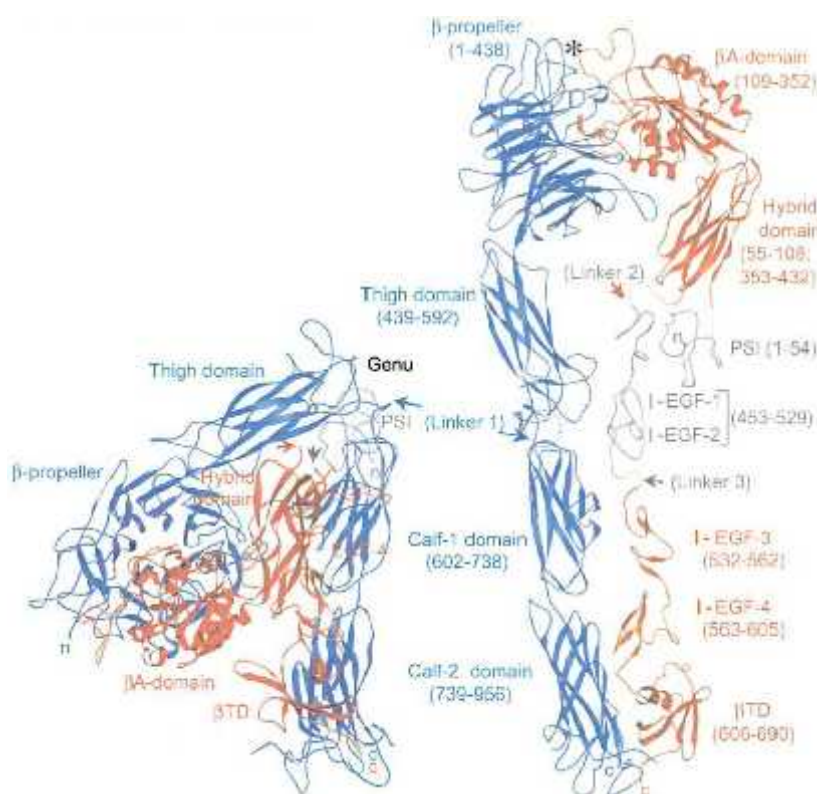
Slika 6. Prikazuje hipotetski model vezanja liganda za glavu integrina koji sadrži I-domenu. Kolagen se veže na I-domenu. Vezanje liganda uzrokuje spuštanje C-terminalne $\alpha 7$ -uzvojnice (gornji narančasti štapić). Konzervirani Glu (crvena točka) se veže za β I-domenu (roza) te se konformacijski signal rotacijom prenosi do hibridne domene (Preuzeto iz: Hynes 2002).

intramolekularni ligand koji se veže u MIDAS mjesto β I-domene i uzrokuje njezinu rotaciju od β -propelera. Na taj način se konformacijski signal dalje prenosi na hibridnu domenu i ostale domene integrina (Sl. 6.) (Hynes 2002).

α i β nožice i citoplazmatska domena

Nožica α podjedinice je smještena C-terminalno od β -propelera i se sastoji od 3 β -sendvič domene. Gornja nožica se sastoji od „bedrene“ domene, a donja nožica od „list-1“ i „list-2“ domene. Između „bedrene“ i „list-1“ domene nalazi se petlja koja veže Ca^{2+} i predstavlja zglobov u α podjedinici. Ovo je ključno mjesto u α podjedinici koje omogućava savijanje integrina (Sl. 7.).

Građa nožice u β podjedinici je nešto složenija. β I-domena ja umetnuta u hibridnu domenu, koja formira gornju nožicu β podjedinice. Dok je hibridna domena umetnuta u domenu pleksin/semaforin/integrin (PSI), koja je također dio gornje nožice (Sl. 3.a, b). Preostali dio nožice je sastavljen od 4 domene nalik na epidermalni faktor rasta („*epidermal growth factor*“- I-EGF) i domene β -repa. Utvrđeno je da je koljeno u β podjedinici smješteno između EGF-1 i EGF-2. Koljena u α i β podjedinici su smještene blizu jedna drugoj i njihova geometrija omogućava ispružanje glave (Sl. 7. i Sl. 8.) (Luo i sur. 2007).



Slika 7. Alfa podjedinica integrina je u plavoj boji, a beta u crvenoj. Lijevo je prikazana struktura neligiranog, inaktivnog $\alpha\beta 3$ integrina. Kristalografska struktura ukazuje na savinuće („genu“), koje se u α podjedinici nalazi između „bedrene“ i „list-1“ domene (Linker 1), a u β podjedinici između domene I-EGF1 i I-EGF2 (Linker 2 i Linker 3). Glava (β -propeler i β I-domena) je savinuta prema C-terminusu nožice integrina. Na desnoj strani je prikazan ispružen, aktiviran integrin (Preuzeto iz: Hynes 2002).

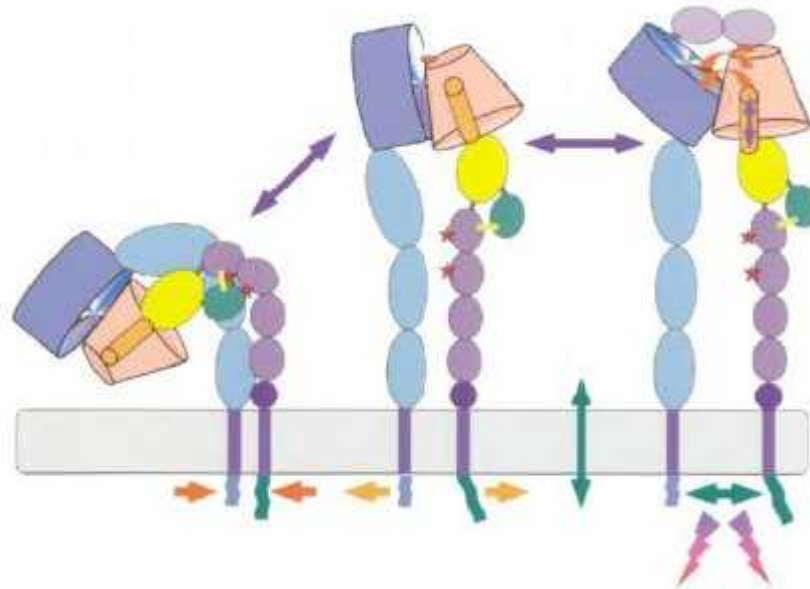
Usprkos činjenici da je citoplazmatska domena mnogo manja od ekstracelularnog dijela, ona igra važnu ulogu u funkciji integrina. Citoplazmatska domena je mjesto interakcije integrina s citoskeletom i unutarstaničnim signalnim molekulama. Interakcijom različitih proteina s citoplazmatskim repom može se utjecati na strukturu i funkciju ekstracelularnih domena. Mnoge činjenice ukazuju da repovi α i β podjedinica međusobnim djelovanjem mogu kontrolirati aktivacijsko stanje integrina (Hynes 2002). Istraživanja su pokazala da integrini u inaktivnom stanju imaju α citoplazmatsku domenu vrlo blizu β citoplazmatskoj

domeni. Kada je integrin u aktiviranom stanju te domene su razmaknute. Obje citoplazmatske podjedinice imaju malo sličnosti u sekvenci, što ukazuje na različitost proteina koje vežu, te na različitu funkciju koju obavljaju (Luo i sur. 2000).

Model dvosmjerne signalizacije

Vezanje izvanstaničnog liganda potiče razdvajanje citoplazmatske domene. Na ovaj način se omogućuje interakcija s citoskeletom i drugim signalnim molekulama. Ovakav način prijenosa signala usmjeren je izvana prema unutra te se naziva „outside-in“ signalizacija. Nasuprot tome, moguće je i prvotno razdvajanje citoplazmatskih α i β podjedinica vezanjem nekog unutarstaničnog aktivatora. Ova informacija o promjeni konformacije se prenosi kroz molekulu do glave integrina, aktivirajući vezno mjesto za ligand. Ovaj smjer prijenosa signala ide iz unutrašnjosti stanice prema van, pa se naziva „inside-out“ signalizacija. Ovakav povezan prijenos signala kroz molekulu je dvosmjeran, te je u alosteričkoj ravnoteži (Calvete 2004).

Savijena konformacija integrina je stabilizirana dodirnim površinama između glave i donje nožice, između α i β nožica te između α i β transmembranske i citoplazmatske domene (Sl. 7. i Sl. 8.). Niti jedna od ovih interakcija nije čvrsta i svako uznemirenje može usmjeriti ravnotežu prema ispruženoj, aktiviranoj konformaciji integrina. Vezanje efektorske molekule za citoplazmatski rep α ili β podjedinice dovodi do njihovog razdvajanja. Ta konformacijska promjena potiče na razdvajanje donjih α i β nožica. Razdvajanje donjih nožica destabilizira interakciju između glave i donje nožice i uzrokuje ispružanje integrina (Sl. 8.) (Luo i sur. 2007).



Slika 8. Smatra se da je integrin u savijenoj konformaciji inaktivan. Može se aktivirati ili vezanjem liganda za glavu ili djelovanjem efektorske molekule na citoplazmatsku domenu, što dovodi do ispružanja integrina. Promjena orijentacije β -propelera (tamno plavi valjak) i β I-domene (ružičasti krnji stožac) dovodi do spuštanja α 7-uzvojnice (narančasti štapić) i djelovanje na hibridnu domenu (žuto). Hibridna domena je povezana s EGF-1 (ljubičasto) domenu preko domene PSI (zeleno), koja stvara disulfidni most s EGF-1. Izravnavanje nožica i njihovo razmicanje otkriva aktivacijske epitope na EGF domenama (crvene zvjezdice). Konformacijske promjene se prenose duž molekule do citoplazmatskih domena koje ste također razdvajaju. Razdvajanje citoplazmatskih repova je popraćeno s promjenom u stukturi koja omogućava vezanje s unutarstaničnim proteinima i prijenos signala (munje). Sve konformacijske promjene su reverzibilne i mogu djelovati u oba smjera (Peuzeto iz: Hynes 2002).

BIOLOŠKA ULOGA INTEGRINA

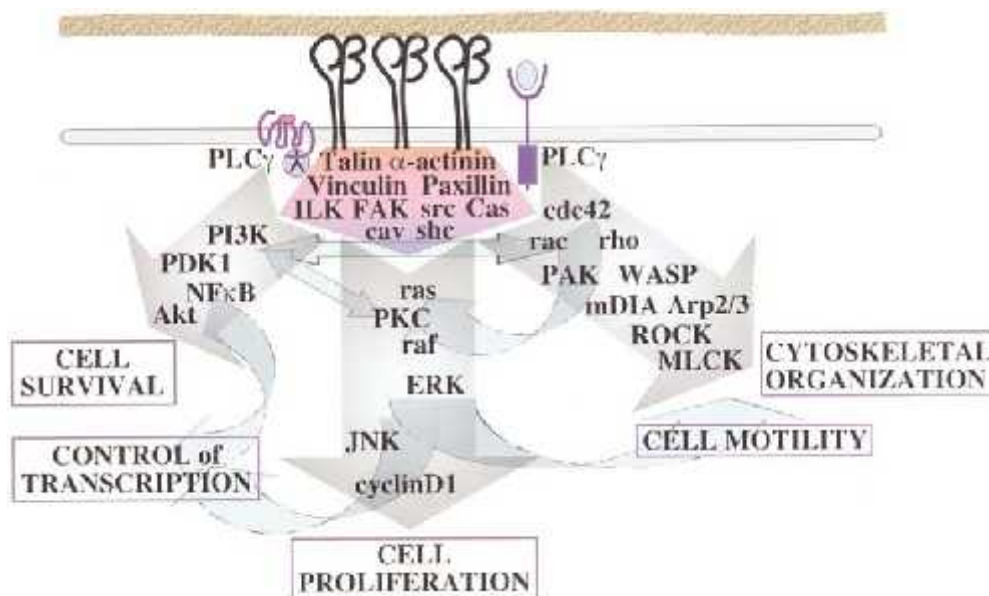
Osnovna funkcija integrina, osim kao adhezijskih receptora, jest osigurati mehanički čvrstu vezu između stanica i ECM-a. Ova funkcija se očituje kroz interakciju integrina s bazalnom membranom. Integrini su također važni za organizaciju citoskeleta. Jednako bitna uloga integrina je i stanična pokretljivost te prijenos signala. U imunološkom sustavu služe za vezanje limfocita za endotel i u prepoznavanju antigena (Kinashi 2005). Adhezijska sposobnost integrina za vezanje za fibrinogen uključena je u formiranju krvnih ugrušaka prilikom ranjavanja. S druge strane, matrična adhezija je uključena u regulaciju razgradnje matriksa i predstavlja važnu signalnu platformu koje privlače proteine za regulaciju aktivnosti malih GTPaza, proteinskih i lipidnih kinaza te adaptorskih proteina. Nadalje, integrini mogu transaktivirati mnoge receptorske tirozin kinaze, kao što su Met, receptor za vaskularni endotelni faktor rasta, receptor za epidermalni faktor rasta i dr. Vezanje integrina i topivih liganda ili prekomjerna ekspresija integrina mogu inhibirati proliferaciju i dovesti do programirane stanične smrti. S druge strane, integrini mogu utjecati na preživljavanje stanica i sačuvati stanicu od apoptoze. Isto tako treba istaknuti ulogu integrina u kontroli staničnog ciklusa (Sl. 9.) (Wiesner i sur. 2005).

Integrini u staničnoj adheziji, organizaciji citoskeleta i pokretljivosti

Kako bi se očuvao integritet mnogostaničnih organizama, organizam mora dobro regulirati oblik i pokretljivost stanice. Eukarioti su razvili mehanizam kojim kontroliraju staničnu adheziju i pokretljivost kao odgovor na izvanstanične signale (faktori rasta, interakcije između stanica, interakcije između stanice i ECM-a). Utvrđeno je da normalne stanice koje su u organizmu pričvršćene za podlogu, u suspenziji nisu sposobne za proliferaciju. Zbog toga se one smatraju stanicama „ovisnim o usidrenju“ (Miranti i Brugge 2002).

Integrini vežu ligande iz izvanstaničnog matriksa. Oni su klasificirani u tri skupine receptora: receptori RGD koji vežu komponente iz izvanstaničnog matriksa sa tripeptidnom sekvencom Arg-Gly-Asp (npr. fibronektin, vitronektin); lamininski receptori; kolagenski receptori. Osim integrina koji vežu elemente iz ECM-a, integrin $\beta 2$ podskupine posreduje u

interakciji između stanica, tako da vežu protureceptore s površine druge stanice (Wiesner i sur. 2005).



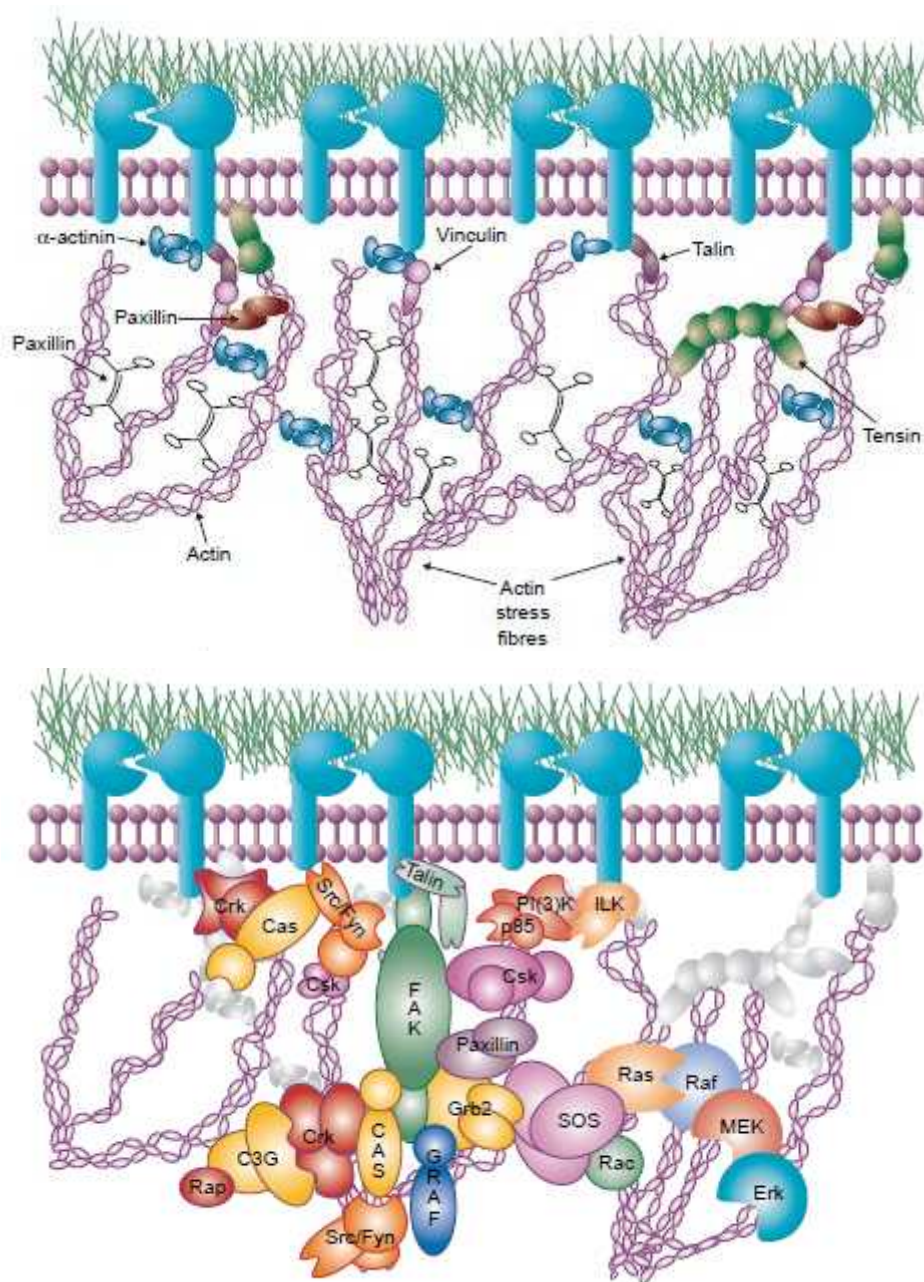
Slika 9. Shema objedinjuje uloge integrina. Na mjestu akumulacije integrina se formira matrična adhezija. Integrini se izvanstaničnim globularnim dijelom vežu za elemente ECM-a. U unutrašnjosti stanice se formira mreža različitih proteina za povezivanje, adaptorskih proteina te aktivacijskih proteina, preko kojih se signal usmjerava prema kontroli stanične proliferacije, pokretljivosti, organizaciji citoskeleta, transkripcije i preživljavanju stanice (Peuzeto iz: Hynes 2002).

Anatomija matrične adhezije

Matrične adhezijske veze su visoko dinamične strukture koje se formiraju oko nakupine aktiviranih integrina. Razlikuje se nekoliko tipova matričnih adhezijskih veza: fokusni kompleksi, fokusne adhezijske veze, fibrilarne adhezijske veze i podosomi. Fokusni kompleksi su mali, točkasti matrični adhezijski kompleksi. Pronađeni su u stanicama koje migriraju, i naročito su koncentrirani u membranskim izdancima. Oni mogu nestati ili sazrijeti u veće strukture- fokusne adhezijske veze. Te strukture su prisutne u mirujućim stanicama ili u stanicama koje se vrlo malo pokreću. Ovo su uobičajena vezna mjesta tenzijskih niti za staničnu membranu. Fibrilarne adhezijske veze nastaju adhezijom $\alpha 5 \beta 1$ integrina za fibronektin. One uređuju fibronektinske niti u paralelnoj orijentaciji u odnosu na aktinske niti. Podosomi su pronadjeni u osteoklastima ili stanicama hematopoetskog porijekla kao što su neutrofili, te su jedini oblik matrične adhezijske veze prisutne u ovim stanicama (Wiesner i sur. 2005).

Integrini i citoskelet: strukturna povezanost, prijenos signala i stanična pokretljivost

Utvrđeno je da je 50-ak proteina privremeno ili stabilno lokalizirano u fokusnim adhezijskim vezama. One se razlikuju ovisno o agregaciji integrina, vezanom ligandu i polimerizaciji aktina, pa tako okupljaju različite proteine. Kako imaju višestruke vezne domene, mogu stvarati interakcije s drugim proteinima. Na ovaj način stvaraju mrežu proteina u kojoj je vrlo teško pratiti slijed događaja vezanih uz njihovu agregaciju ili prijenos signala



Slika 10. Fokusna adhezijska veza. Gornja slika prikazuje proteine koji se prvi agregiraju na fokusnoj adheziji: talin, vinkulin, α -aktin, paksilin, tenzin, aktinske stresne niti. Na donjoj slici su prikazani brojni signalni proteini koji su povezani s integrinima ili su njima aktivirani. FAK se veže za integrin i privlači dodatne signalne proteine, formirajući složenu signalnu mrežu koja je usko povezana s citoskeletom (Peuzeto iz: Miranti i Brugge, 2002).

od integrina (Sl. 10.) (Miranti i Brugge 2002).

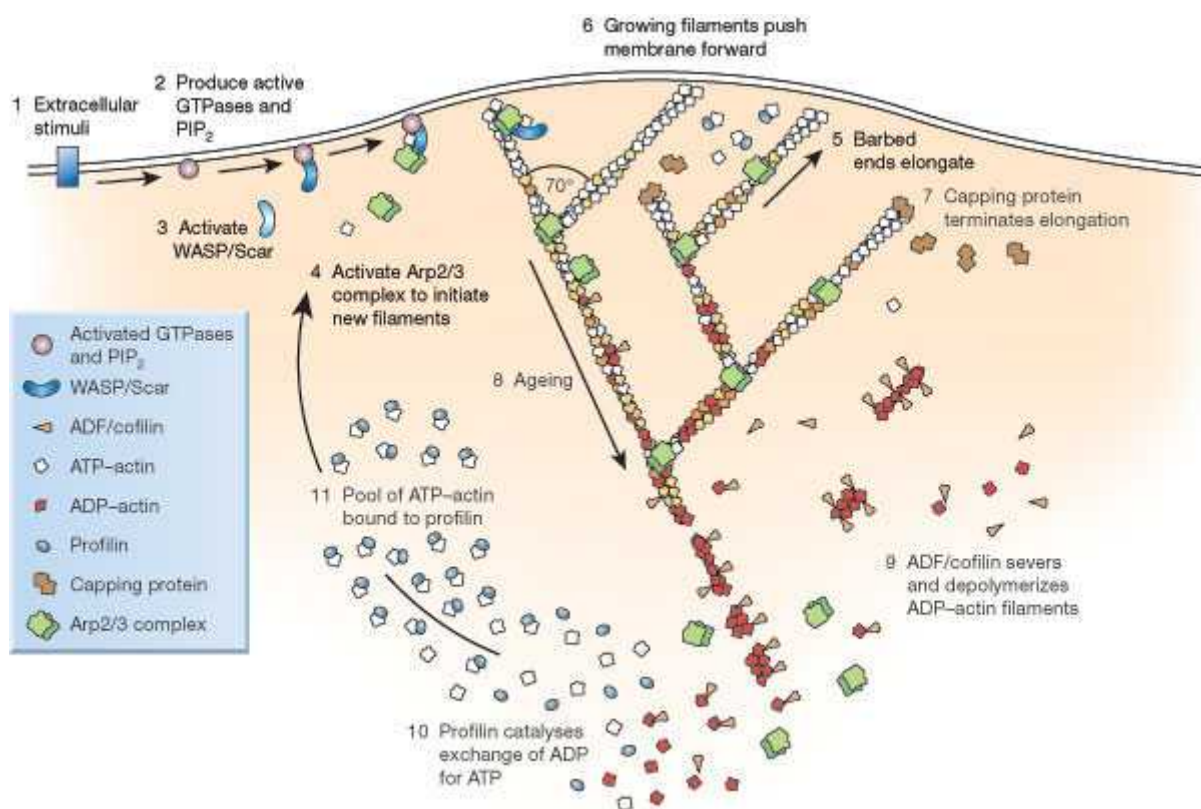
Talin je protein koji veže F-aktin i igra važnu ulogu u aktivaciji integrina. Globularna glava talina se sastoji od domene 4.1 („four-point-one“), ezrin, radiksin, moiezin (FERM) i veže se za citoplazmatski rep $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ i $\beta 5$ integrina s visokim afinitetom i nešto slabije za $\beta 7$ integrin. On je jedan od prvih proteina u formiranju fokusne adhezijske veze. Trenutačni model aktivacije integrina talinom se zasniva na pozitivnoj povratnoj sprezi. Uz talin, u fokusnu adhezijsku vezu se privlači i PIPKI γ (PIP kinaza γ) koja fosforilira PIP (fosfatidilinozitol fosfat). Na taj način se lokalno generira PIP₂, koji zajedno s talinom aktivira vinkulin i aktin-vezni protein. Vinkulin stabilizira i potpomaže agregaciju integrina, tako da međusobno poveže F-aktin iz obližnjih fokusnih kompleksa.

FAK (fokusna adhezijska kinaza) je tirozin kinaza koja igra centralnu ulogu u signalizaciji putem integrina. Kinazna domena je smještena u središtu enzima. N-terminus sadrži domenu homolognu FERM-u, koja veže citoplazmatski rep $\beta 1$ integrina. Karboksilni kraj sadrži veznu domenu FAT („Focal adhesion target“) s veznim mjestima za paksilin i talin. Aktivacija integrina uzrokuje aktivaciju FAK-a, što dovodi do autofosforilacije u Y397. Time se stvara visoko afinitetno vezno mjesto za kinaze iz obitelji Src- SFK („Src family kinases“). FAK i Src mogu fosforilirati vezni protein p130Cas, koji se preko SH3 domene veže za C-terminus bogat prolinom, na enzim FAK. Drugo vezno mjesto koje je bogato prolinom veže protein Rho-GAP² GRAF (Wiesner i sur. 2005). Ovi događaji mogu biti značajni za dinamiku fokusnih adhezijskih veza i za staničnu migraciju. Na to ukazuju fibroblasti bez proteina FAK koji su defektni u spomenutim procesima. Iako FAK nije nužan za formiranje fokusnih adhezijskih veza, njegova aktivacija pomoću integrina je ovisna o polimerizaciji aktina i kontrakciji aktomiozina. Citoskeletni procesi mogu biti prijelomne točke u indukciji nakupljanja FAK-a i ostalih signalnih proteina (Miranti i Brugge 2002).

Proteini iz obitelji malih GTPaza, uključujući Rho, Rac i Cdc42, sudjeluju u indukciji polimerizacije aktina, formiranju fokusnih kompleksa, lameliopodija i filopodija. Adhezija na ECM uzrokuje, preko integrina, vezanje GTP-a na Rho, Rac i Cdc42, što ih prevodi u aktivan oblik. Smatra se da je aktivacija ovih GTPaza ključan događaj za regulaciju stanične adhezije, širenje i pokretljivost posredovana integrinima (Miranti i Brugge 2002).

²Rho-GAP $\rightarrow$ „Rho GTPase Activating Protein“, spada u obitelj GRAF.

Da bi se stanice mogle kretati, potrebno je stvoriti direktnu mehaničku silu te kontrolirati staničnu adheziju i njezinu napetost. Aktinski filamenti su glavni gradivni elementi za stvaranje membranskih izbočina (lameliopodija). U staničnoj pokretljivosti posreduje i sustav stanične adhezije za matriks te tenzijski filamenti. Ključan protein za stvaranje ove mreže je kompleks Arp2/3. Arp2/3 ima jedinstveno svojstvo indukcije autokatalitičkog grananja aktinskih filamenata. Kako bi se balansiralo stvaranje membranskih izdanaka postoje molekule zaštite aktinskih krajeva („capping“) koji djeluju antagonistički u odnosu na Arp2/3. Prijenos signala putem integrina direktno aktivira različite aktivatore Arp2/3 kompleksa iz obitelji WASp/Scar³. Fosforilacijom tirozina Y291 i Y256 na WASp-u i N-WASp-u povećava njihov potencijal za aktivaciju nukleacije aktina (Sl. 11.). Y291 i Y256 se također može fosforilirati pomoću kinaza iz obitelji Src. Kako FAK i ostali protein iz matričnog adhezijskog kompleksa mogu privući SFK, i na taj način osigurati pristanište za aktivatore nukleacije aktina, oni se mogu smatrati odgovornima za formaciju podosoma (Wiesner i sur. 2005).



Slika 11. Vanjski uzročnik (1) aktivira signalni put koji vodi do aktivacije GTPaznih proteina (2). Oni aktiviraju Wiskott-Aldrich sindrom protein (WASp) (3) koji aktiviraju Arp2/3 kompleks. Na kraju postojećeg aktinskog filamenta, Arp2/3 inicira novu granu filamenta (4). Filament brzo raste (5) pa gura staničnu membranu prema

³ Obitelj WASp/Scar aktivatora se dijeli na dvije subfamilije N-WASp i njegov hematopoetska izoforma WASp te tri WAVE/Scar proteina 1, 2 i 3.

naprijed (6). Protein „pokrivanja“ se veže na rastući kraj filameta te na taj način terminira njegovu polimerizaciju (7). Depolimerizacijski faktor aktina (ADF)/kofilin depolimerizira ADP filamente, uglavnom u „starijim“ regijama filameta (8, 9). Profilin zamjenjuje ADP za ATP na disociranim podjedinicama aktinskog filameta (10). ATP-aktin se veže na profilin i obnavlja zalihu podjedinica za polimerizaciju novog filameta (11) (Preuzeto iz www.nature.com).

Uloga integrina u metastaziranju

Kako bi tumori mogli metastazirati i rasti, oni moraju migrirati u okolna tkiva. Širenjem u različite organe, predstavljaju glavni uzrok smrti u pacijenata s rakom. Da bi stanice raka mogle migrirati, a epitelne stanice sudjelovati u angiogenezi, one razvijaju izmijenjen integrinski afinitet i avidnost⁴ prema izvanstaničnom matriksu. Fenotipska promjena se očituje promijenjenom ekspresijom površinskih membranskih molekula (integrini), otpuštanjem proteaza u ECM, te odlaganjem novih ECM molekula. Kao posljedica navedenih promjena mijenja se genska ekspresija, organizacija citoskeleta, stanična adhezija i preživljenje. Novonastale okolnosti rezultiraju povećanom invazijom i mobilnosti stanica raka, te boljom prilagođenosti na različit mikrookoliš.

Tijekom migracije, stanice oblikuju lameliopodije kojima se hvataju za ECM, a istovremeno na zadnjem dijelu stanice oslobađaju već postojeće veze s ECM-om. Ovakvo ponašanje omogućuje stanicama pomicanje prema naprijed. Stvaranje lameliopodija je inducirano polimerizacijom aktinskih podjedinica i potpomognuto lokalnim smanjenjem membranske napetosti (Raucher i Sheetz 2000). Uloga integrina u stvaranju lameliopodija objašnjena je u prethodnom poglavlju.

Integrini su također uključeni u regulaciji aktivnosti proteolitičkih enzima koji razgrađuju bazalnu membranu- barijeru prema okolnim tkivima te acelularan potporanj za stanice. Građena je od proteina ECM-a uključujući laminin, kolgen i proteoglikane. Razaranje bazalne membrane je važan histološki marker prijelaza tumorskih stanica u invazivne stanice raka. One aktiviraju i izlučuju različite proteaze koje su specifične za proteine ECM-a. Da bi došlo do lokalne razgradnje bazalne membrane nije potrebna samo ekspresija proteaza ECM, nego i inhibitora istih proteaza. Razlog je taj, što bi bez inhibitora došlo do prekomjerne razgradnje izvanstaničnog matriksa i time se onemogućilo kretanje stanica.

⁴ Integrinska avidnost- povećanje u sveukupnoj snazi stanične adhezije, koje je uzrokovano nakupljanjem integrina u multimerne komplekse.

Npr. enzimi matričnih metaloproteaza (MMP), MMP-2 i MMP-9 imaju najveću enzimsku aktivnost za kolagen tipa IV, koji je glavna sastavnica bazalne membrane. Smatra se da su integrini uključeni u aktivaciju MMP-a. MMP se izlučuje kao inaktiviran zimogen (proMMP). Da bi se proMMP aktivirao, nužno je proteolitičko cijepanje izvanstaničnim proteazama. MMP-2 se aktivira na staničnoj površini pomoću multimernog kompleksa koji se sastoji od MMP-2, membranskog tipa-1 MMP-a (MT1-MMP) te tkivni inhibitor metaloproteinaza 2 (TIMP2). Istraživanja melanoma, glioma i angiogenetskih epitelnih stanica ukazuju da u aktivaciji MMP-2 sudjeluje integrin $\alpha\beta3$. Isprva se C-terminus MMP-2 veže za TIMP2 i asocira u kompleks s MT1-MMP. MT1-MMP cijepa amino kraj proMMP-2 i dobiva se intermedijerni oblik koji se veže za integrin $\alpha\beta3$ na staničnoj površini. Na ovaj način se aktivira MMP-2 i njegova proteolitička aktivnost je lokalizirana izvan stanice. Tijekom invazije, integrin $\alpha\beta3$ ne funkcionira samo kao adhezijski receptor, već kao aktivator proteaza i sudjeluje u njihovoj lokalizaciji na izvanstaničnoj strani membrane.

Važno je dobro kontrolirati razgradnju ECM-a, jer bi u suprotnome bila otežana ili inhibirana pokretljivost stanica na proteinima ECM-a. Stanice raka reguliraju razgradnju negativnom povratnom spregom. MMP-2-ovisna generacija hemopeksin fragmenata (PEX) blokira aktivaciju proteaza tako da kompetira s MMP-2 za vezanje za integrin $\alpha\beta3$ (Hood i Chersesh 2002).

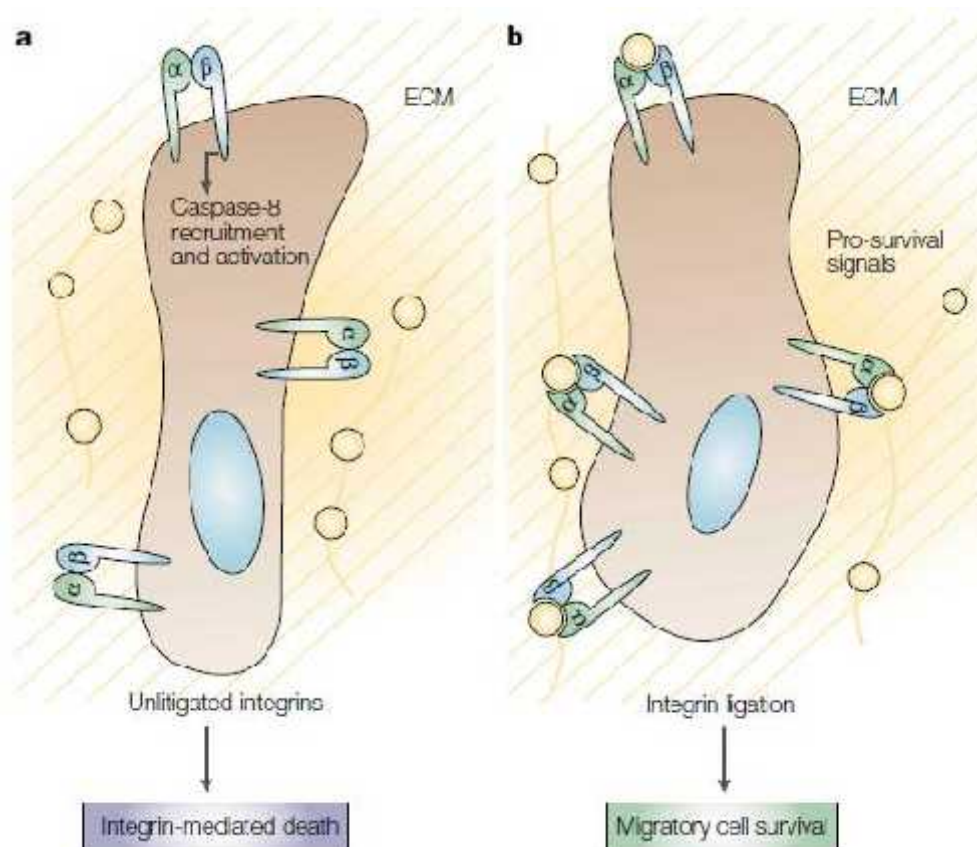
Rast tumorskih stanica za vrijeme karcinogeneze je ovisan o njihovoj sposobnosti da reguliraju adheziju prema ECM-u i susjednim stanicama. Mogućnost razvijanja lijekova koji blokiraju migracijske i invazivne sposobnosti pruža novi pristup liječenja malignih bolesti. Kako integrini igraju važnu ulogu u staničnoj adheziji, preživljenju, migraciji, angiogenezi (važni faktori karcinogeneze), privlače pažnju kao potencijalne mete protiv stanica raka ($\alpha\beta3$, $\alpha5\beta1$). Nekoliko je pristupa inhibicije integrina: onemogućavanje vezanja liganda, promjena ekspresije integrina itd. Anti-integrini se često kombiniraju s drugim anti-tumorskim lijekovima. Metastaziranje je složen proces, ovisan o mnogo faktora, a integrini su samo jedan od mnogih receptora koji su uključeni u procesu metastaze. Istraživanje puteva, koji su intrinzični za migracijski i invazivni fenotip stanica raka, obećava razvijanje novih, boljih i efektivnijih lijekova u terapiji protiv raka (Cox i sur. 2010).

Integrini, apoptoza i stanično preživljenje

Kada su stanice, koje su ovisne o usidrenju, lišene mogućnosti vezanja za ECM, one ulaze u programiranu staničnu smrt. Taj proces je poznat pod pojmom *anoiks*. Pojedini integrini, poput $\alpha\beta3$, mogu inducirati apoptozu te spriječiti invaziju stanica, poput jetrene metastaze i angiogeneze. Naime, kada stanice eksprimiraju određene integrine, a u matriksu nedostaje odgovarajući ligand, one ulaze u programiranu staničnu smrt posredovanu integrinima (IMD- „integrin-mediated death“). Primjerice, ekspresija $\alpha\beta3$ integrina na stanicama u kolagenom gelu koji nema ligand za $\alpha\beta3$. U tom slučaju dolazi do privlačenja kaspaze-8 na membranu te njezine aktivacije i slijedi stanična smrt (Sl. 12.a).

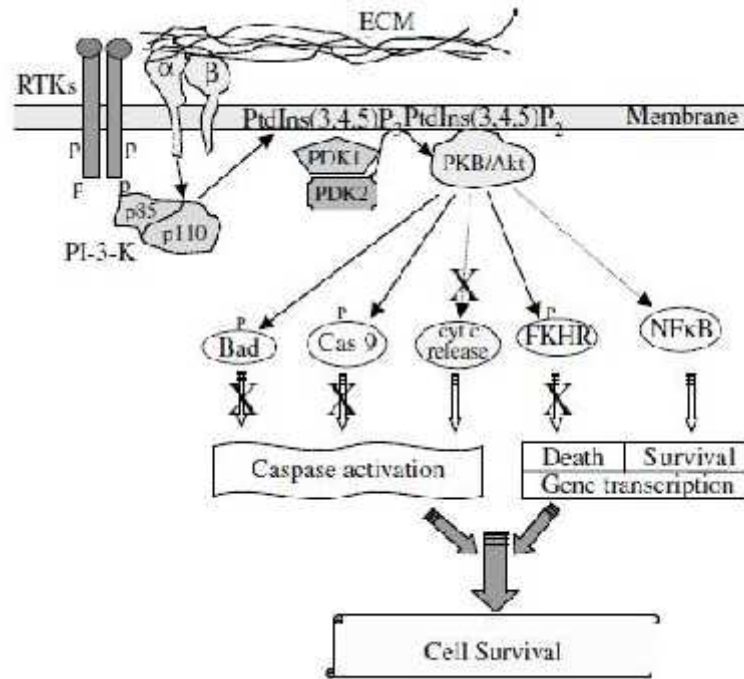
Stanice raka koje uspješno vežu integrinske ligande iz novog tkiva, potiču nekoliko mehanizama za suzbijanje apoptoze i preživljavanje (Sl. 12.b) (Hood i Cheresch 2002). Proteini koji su poznati da sudjeluju u mehanizmu preživljenja su mitogeno aktivirane proteinske kinaze (MAPK ili ERK), nuklearni faktor κB (Nf κB), Bcl-2, proteini nalik na Bcl-2, PI-3 kinaza i PKB/Akt. Efektorske molekule koje sudjeluju u indukciji apoptoze su c-Jun kinaza (JNK), p38-kinaza, Bad, proteini nalik na Bad te proteini iz porodice kaspaza.

Ključnu ulogu u mehanizmu staničnog preživljenja igraju PI3K i njegov nizvodni efektor PKB/Akt, koji je serin-treonin kinaza. Kada se receptor za tirozin kinazu aktivira, PI3K odlazi do fosfotirozinskih ostataka receptora i tamo biva aktiviran. Nadalje, PI3K proizvodi PI(3,4,5)P₃ i PI(3,4)P₂ koji stimuliraju 2-fosfoinozimid ovisnu protein kinazu 1 i 2 (PDK1 i PDK2). One fosforiliraju Thr308 i Ser473 na PKB/Akt. Aktivirana PKB/Akt fosforilira različite nizvodne proteine, što rezultira preživljavanjem stanice. Ako fosforilira Bad (efektor apoptoze), on se inaktivira i onemogućuje se njegovo vezanje za Bcl-2. Fosforilacijom kaspaze-9 se inhibira njezina proteolitička aktivnost i potiče se stanično preživljavanje. PKB/Akt također može fosforilirati FKHR, transkripcijski faktor iz obitelji Forkhead, što rezultira smanjenom ekspresijom gena koji potiču apoptozu. Osim toga, pokazano je da PKB/Akt može spriječiti otpuštanje citokroma c s mitohondrija i tako pridonijeti preživljenju (Sl. 13.). Sam mehanizam tog procesa još je nepoznat.



Slika 12. Jedna od prepreka tumorskih stanica za uspostavljanje metastaze je sposobnost ECM-a da pokrene staničnu smrt posredovanu integrinima (IMD). Svaki integrin veže različitu skupinu ECM molekula. Sastav ECM-a je tkivno specifičan. Stoga ECM upravlja preživljenjem stanica s obzirom na integrine koji su eksprimirani na stanicama koje okupiraju novo tkivo. **a)** Ukoliko stanica migrira kroz mikrookoliš koji ne sadrži supstrat za integrine, citoplazmatski rep integrina β privlači kaspazu-8 i inducira staničnu smrt. **b)** Ako ECM sadrži odgovarajući ligand za integrine s površine invadirajuće stanice, onda se aktivira mehanizam za preživljenje. Ovo je razlog zašto neki tipovi raka uspostavljaju metastazu u određenim organima (Preuzeto iz: Hood i Cheresch, 2002).

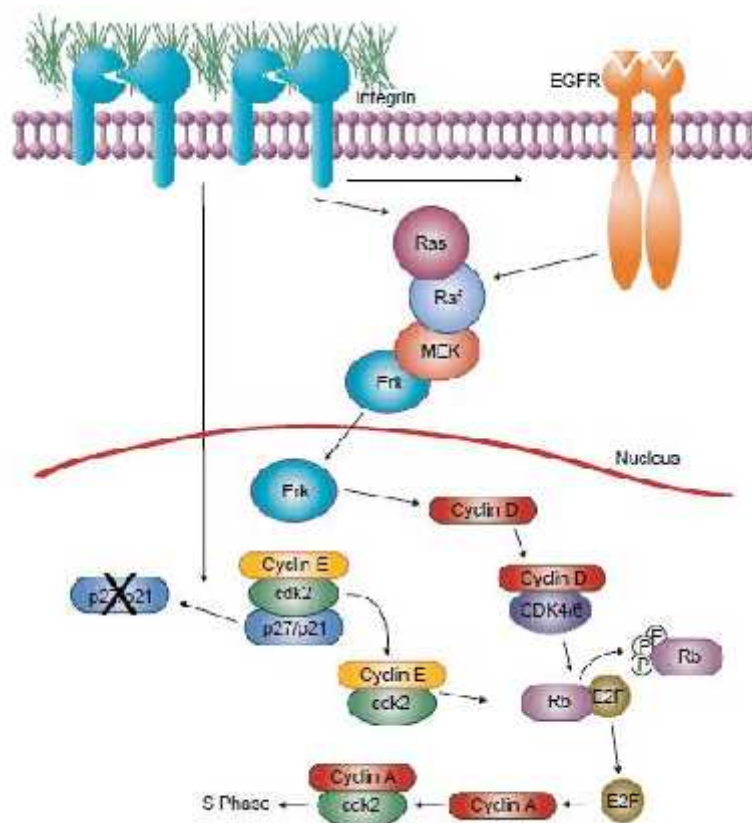
Neka istraživanja sugeriraju da FAK, putem PI3K i PKB/Akt mehanizma, regulira subcelularnu lokalizaciju proteina Bax, tako da spriječi redistribuciju na mitohondrijskoj membrani. Osim toga, sposobnost FAK-a da potakne formiranje Cas/Crk kompleksa također pridonosi staničnom preživljenju. Neke druge studije ukazuju da integrini upotrebljavaju PI3K/Akt put kako bi potpomogli preživljenje u odsustvu faktora rasta (Parise i sur. 2000).



Slika 13. Mehanizam preživljenja putem PI3K/Akt. PKB/Akt fosforilacijom negativno regulira faktore koji potiču apoptozu (Bad, kaspaza-9, FKHR). PKB/Akt pozitivno regulira NF-kB (faktor preživljenja). Angažman nekih integrina (poput $\alpha 5\beta 1$) poboljšava signalizaciju faktora rasta putem receptora za tirozin kinaze (RTK) (Preuzeto iz: Parise i sur. 2000).

Regulacija stanične proliferacije putem integrina

Kroz povijest se pokušalo odgovoriti na pitanje, koje su faze staničnog ciklusa ovisne o povezanosti stanice s ECM-om. Takva regulacijska točka nije pronađena. Međutim, zaključeno je da postoji više koraka u staničnom ciklusu koji zahtijevaju staničnu adheziju. Najprije je pronađeno da stanice u suspenziji, koje su tretirane faktorom rasta, imaju blokiranu proizvodnju ciklina A. Kasnije su ustanovili, da je aktivacija ciklin ovisnih kinaza (Cdk), koje su uključene u napredovanje G1 faze te inicijaciji S faze, kontrolirana događajima koji su ovisni o integrinima. To podrazumijeva indukcija i translokaciju ciklina D i ciklina A, degradaciju p27 i p21 (Sl. 14.). Pretpostavlja se nekoliko mehanizama putem kojih integrini ostvaruju regulaciju proliferacije. To su poboljšanje signala putem faktora rasta. Zatim, privlačenjem proteina na kompleks membrana/citoskelet ili poboljšavanjem nuklearne translokacije Erk-a (Miranti i Brugge 2002).



Slika 14. Kooperacija integrina i faktora rasta u regulaciji stanične proliferacije. Za prijenos signala do Ras/Raf/Mek/Erk nužne su stanična adhezija i faktori rasta. Aktivacija Erk-a i njegova nuklearna translokacija rezultira povećanom transkripcijom gena za ciklin D1. Ekspresija ciklin D1 inducira aktivaciju cdk4/6 kinaze. Integrini također djeluju u degradacijskom mehanizmu, koji degradira negativne regulatore stanične proliferacije p21 i p27. Time se omogućuje aktivacija ciklin E-cdk2 kompleksa. Ukupni efekt je hiperfosforilacija retinoblastoma (Rb), što uzrokuje otpuštanje EsF s DNA i omogućuje transkripciju ciklina A. Za ulazak u S fazu je potreban kompleks Ciklin A/cdk2 (Preuzeto iz: Miranti i Brugge 2002).

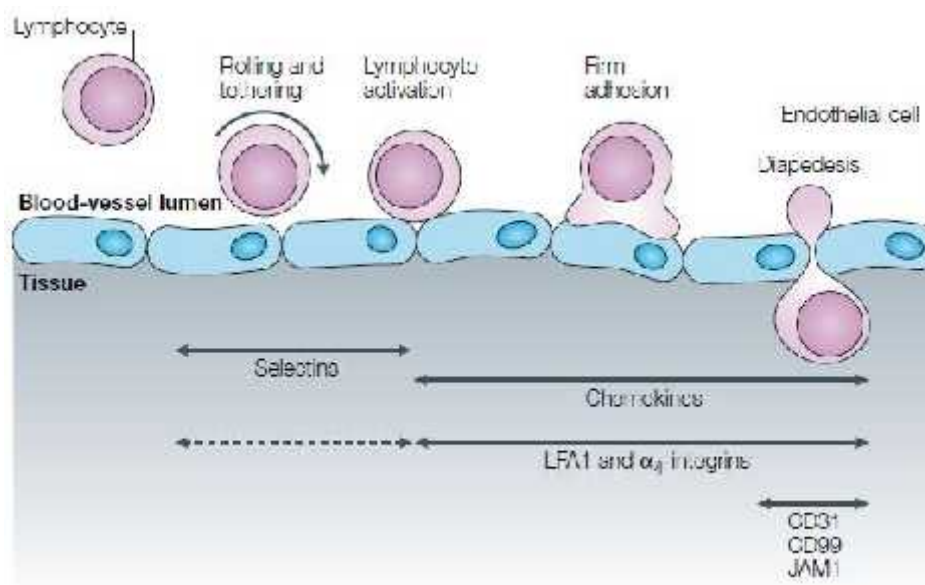
Uloga integrina u imunološkom sustavu

U imunološkom sustavu integrini imaju važnu ulogu u mnogim procesima: vezanje leukocita za endotelne stanice i antigen-prezentirajuće stanice (APC- poput makrofaga i dendritičkih stanica), u citotoksičnom ubijanju te ekstravazaciji limfocita u tkiva. Integrini koji su eksprimirani na limfocitima, poput $\beta 2$ integrina LFA-1 („lymphocyte function-associated antigen 1“; $\alpha L\beta 2$), $\alpha 4$ integrina VLA4 („very late antigen 4“; $\alpha 4\beta 1$ integrin) te $\alpha 4\beta 7$, važni su za pravilno funkcioniranje imunoloških stanica.

Prilikom prolaska kroz periferne limfne čvorove, naivni T-limfociti reagiraju s endotelom, HEV („high endothelial venules“). Taj proces se sastoji od sljedećih koraka: kotrljanje, zaustavljanje, čvrsta adhezija i dijapedeza (Sl. 15.). Kotrljanje se pospješuje

ekspresijom L-selektina (poznat kao CD62L) u limfocitima. Nasuprot selektina, LFA1 i α_4 su važni u stvaranju čvrstih kontakata limfocita s HEV-om i Peyerovim pločama. Kemokini (CCL21, CXCL12, CXCL13), koji su lokalizirani na apikalnoj membrani endotela, povećavaju avidnost integrina i zaustavljanje limfocita. Stimulacija primarnih T-limfocita s kemokinima uzrokuje nakupljanje LFA1 i VLA4 ($\alpha_4\beta_1$ integrin), što korelira s pojačanom adhezijom. Znanstvenici smatraju da je ekstenzija LFA1 integrina prvi korak u zaustavljanju limfocita, pošto postaju dostupni za vezanje za ICAM1. Nakon čvrstog vezanja limfocita, počinje provlačenje limfocita između intercelularnih spojeva endotelnih stanica- dijapedeza. Na intercelularnim spojevima se akumuliraju adhezijske molekule CD31, CD99 ili JAM1⁵, preko kojih se odvija dijapedeza (Sl. 15.) (Kinashi 2005).

Naivni T-limfociti kratkotrajno kontaktiraju s antigen prezentirajućim stanicama kada uđu u limfoidna tkiva. Proces je olakšan pomoću kemokina i adhezijskih molekula- integrina. Ova kratkotrajna aktivacija integrina omogućava limfocitima da prepoznaju antigene. Nakon prepoznavanja antigena, ligacijom T-staničnog receptora (TCR) preko glavnog histokompatibilnog kompleksa (MHC), dolazi do redistribucije TCR-a i LFA1 na mjestu prepoznavanja. LFA1 se translocira u periferiju, a TCR u središte. Na ovaj način se formira imunološka sinapsa karakteristične strukture (Sl. 16.)- vanjski LFA1 prsten formira pSMAC⁶ te okružuje centralnu nakupina TCR-a, koja formira cSMAC⁷



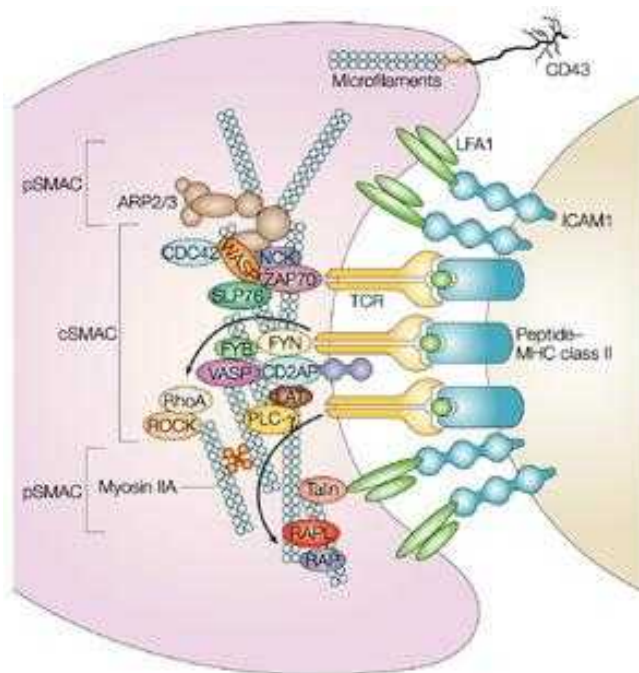
Slika 15. Slika prikazuje adhezijsku kaskadu od kotrljanja do dijapedeze. Selektini, koji se eksprimiraju na staničnoj membrani limfocita, vežu se slabim interakcijama za glikoproteine s površine epitelnih stanica. Ovo

⁵ JAM1- „junctional adhesion molecule 1“ – spojna adhezijska molekula 1.

⁶ pSMAC- „peripheral supramolecular activation cluster“- periferna supramolekularna aktivacijska nakupina.

⁷ cSMAC- „central supramolecular activation cluster“- centralna supramolekularna aktivacijska nakupina.

inducira kotrljanje limfocita i njihovo zaustavljanje. Kemokini, koji su asocirani na apikalnoj membrani epitelnih stanica, induciraju aktivaciju LFA-1 i $\alpha 4$ integrina (ekspimirani u limfocitima). Time se povećava integrinska avidnost i pojačava se njihovo vezanje za ICAM, MADCAM1 ili VCAM1⁸ molekule. Posljedica toga je čvrsta adhezija limfocita (zarobljavanje). Adherirani limfociti putuju niz endotel i konačno migriraju između endotelnih stanica u tkivo. Provlačenje limfocita se obično događa kod intercelularnih spojeva, gdje su lokalizirane adhezijske molekule CD31, CD99 ili JAM1, i provode dijapedezu (provlačenje stanica) (Preuzeto iz: Kinashi 2005).



Slika 16. Imunološka sinapsa. LFA1 je periferno smješten i ima oblik prstena. U središtu se nakupljaju TCR koji preko MHC klase II prepoznaju antigen. Podno sinapse se smješta jezgra i mikrotubularni organizacijski centar (MTOC). Iz MTOC zrače niti mikrotubula i oni su savijeni na mjestu pSMAC, što upućuje na moguću povezanost s LFA1 (Preuzeto iz: www.nature.com).

⁸ ICAM- „intercellular adhesion molecules“. MADCAM1- „mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1“. VCAM1- „vascular cell-adhesion molecule 1“.

SAŽETAK

Primanje informacija iz neposredne okoline, kao i slanje informacija drugim stanicama, neizbježan je proces u živome svijetu. Mnogostanični organizmi imaju složenu zadaću, a to je uskladiti i regulirati prijenos signala između susjednih stanica, kako bi se održala homeostaza. Molekula koja ima važnu ulogu u obosmjernom prijenosu signala, iz okoline u stanicu i obratno, jesu integrini. To su heterodimerni, transmembranski receptori ograničeni na mnogostanične organizme. Građeni su od globularne, ekstracelularne glave, nožica i kratkog citoplazmatskog repa. Integrini se nalaze u tri alosteričke konformacije: inaktivna, savijena konformacija, intermedijarna i aktivna, ispružena konformacija. Vezanjem liganda za glavu integrina dolazi do konformacijske promjene, koja se prenosi duž molekule do citoplazmatske domene. Isto tako je moguće aktivirati vezno mjesto u glavi integrina, vezanjem efektorske molekule za citoplazmatski rep. Ovakav prijenos signala je dvosmjernan. Integrini su uglavnom adhezijski receptori, koji se vežu za proteine ekstracelularnog matriksa (ECM), pa je njihova osnovna funkcija stanična adhezija. Osim toga, oni sudjeluju u vezanju i remodeliranju citoskeleta, a time i pokretanju stanica. Kako je proces metastaze ovisan o staničnom usidrenju, očito je da integrini igraju važnu ulogu u invaziji stanica raka. Značajni su za indukciju apoptoze, ali isto tako pomažu u staničnom preživljenju. Nadalje, bitni su za staničnu proliferaciju, vezanje limfocita za endotel i prepoznavanju antigena. Očito je da su integrini važne molekule, koje sudjeluju u mnogim staničnim procesima. Oni su „senzori“ koji nadgledaju zbivanja u okolini i prenose signale u stanicu usmjeravajući njezino ponašanje.

SUMMARY

Receiving information from the environment, as well as sending information to another cell is an inevitable process in the living world. Multicellular organisms have a complex task to coordinate and control signal transmission among neighbouring cells in order to maintain homeostasis. Integrins are important molecules which are involved in bidirectional signaling, from the environment to the cell and vice-versa. Integrins are heterodimer transmembrane receptors restricted to multicellular organisms. They are composed of a globular extracellular head domain, leg domain and short cytoplasmic domain. Integrins reside in three allosteric conformations: inactive bent conformation, intermediate and active extended conformation. Ligand binding to integrin head domain induces conformational change which is transmitted along the molecule to the cytoplasmic domain. It is also possible to activate the ligand binding site on the integrin head by effector binding to cytoplasmic tail. This kind of signal transfer is bidirectional. As they are generally adhesion receptors binding to proteins of extracellular matrix (ECM), main integrin function is cellular adhesion. Additionally, they participate in cytoskeleton binding and remodelling, thereby in cell migration. As metastasis is dependent on cellular anchorage it is evident that integrins play an important role in cancer cell invasion. Integrins are significant for apoptosis induction and help in cell survival. Furthermore, they are important for cell proliferation, lymphocyte binding to endothelial cells and antigen recognition. Obviously, integrins are important molecules included in many cellular processes. They are „sensors“ which monitor events in the environment and transmit signals to direct cellular behavior.

LITERATURA

1. Beckerman M, (2005) Molecular and Celular Signaling. U: Cell Adhesion and Motility. Springer, New York, pp. 221-226.
2. Bradshaw R A, Dennis E A, (2003) Handbook of Cell Signaling. U: Molecular Sociology. I. M. A. Nooren, J. M. Thornton, Academic Press, California, pp. 21-23. U: Structural Basis of Integrin Signaling. R. C. Liddington, Academic Press, California, pp. 168-170.
3. Calvete J J, (2004) Structures of Integrin Domains and Concerted Conformational Changes in the Bidirectional Signaling Mechanism of $\alpha\text{IIb}\beta 3$, *Exp Biol Med*, **229**: 732-744.
4. Cox D, Brennan M, Moran N, (2010) Integrins in therapeutic targets: lessons and opportunities, *Nature*, **9**: 804-820.
5. Hood J D, Cheresch D A, (2002) Role of integrins in cell invasion and migration, *Nature*, **2**: 91-100.
6. Hynes R O, (2002) Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines, *Cell*, **110**: 673-687.
7. Johnson M S, Lu N, Denessiouk K, Heino J, Gullberg G, (2009) Integrins during evolution: evolutionary trees and model organisms, *Biochim Biophys Acta*, **1788**: 779-89.
8. Kinashi T, (2005) Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes, *Nature*, **5**: 546-559.
9. Liu A, Calderwood D A, Ginsberg M H, (2000) Integrin cytoplasmic domain-binding proteins, *J Cell Sci*, **113**: 3563-3571.
10. Luo B-H, Carman C V, Springer T A, (2007) Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling, *Annu Rev Immunol*, **25**: 619-647.
11. Miranti C K, Brugge J, (2002) Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction, *Nat Cell Biol*, **4**: 83-90.
12. Parise L V, Woen Lee J, Juliano R L, (2000) New aspects of integrin signaling in cancer, *Semin Cancer Biol*, **19**: 407-414.
13. Pollard T D, (2003) The cytoskeleton, cellular motility and reductionist agenda, *Nature*, **422**: 741-745.
14. Raucher D, Sheetz M P, (2000) Cell Spreading and Lamellipodial Extension Rate is Regulated by Membrane Tension, *J Cell Biol*, **148**: 127-136.

15. Wiesner S, Legate K R, Fässler R, (2005) Integrin-actin interactions, *Cell Mol Life Sci*, **62**: 1081-1099.

Web:

1. http://www.nature.com/nature/journal/v422/n6933/fig_tab/nature01598_F1.html
2. http://www.nature.com/nri/journal/v4/n2/fig_tab/nri1268_F4.html