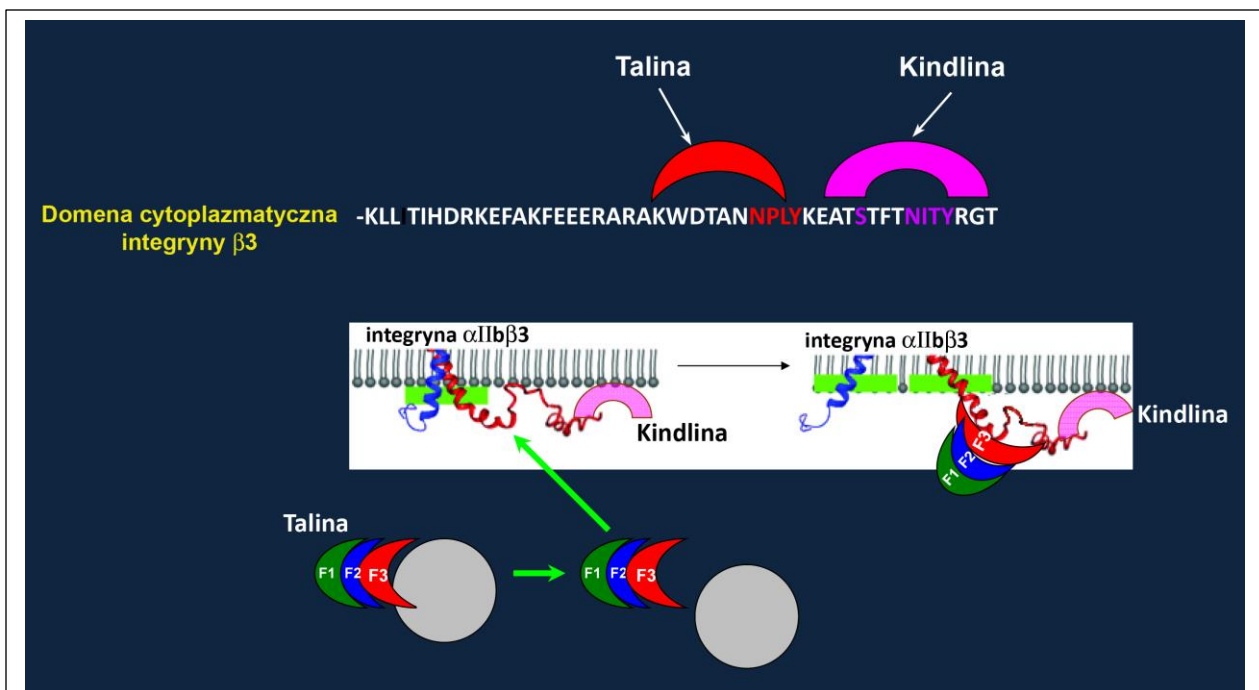


Dr Katarzyna Białkowska

Streszczenie wykładu: ROLA KINDLINA W PRZEKAZYWANIU SYGNAŁÓW PRZEZ INTEGRYNY W PROCESACH FIZJOLOGICZNYCH I PATOLOGICZNYCH

Integryny to rodzina transbłonowych receptorów adhezyjnych, składających się z dwóch podjednostek α i β , których głównym zadaniem jest odbieranie i przekazywanie sygnałów przez błonę komórkową w obu kierunkach. Integryny, białka wiążące się do domen cytoplazmatycznych integryn i ligandy integrynowe odgrywają ważną rolę w procesach fizjologicznych i patologicznych. Ze względu na bardzo dużą różnorodność ligandów, są zaangażowane w podstawowe dla funkcjonowania organizmu procesy, takie jak utrzymywanie homeostazy, odpowiedź immunologiczna, angiogeneza, gojenie się ran, inwazja nowotworowa, czy aktywacja płytek krwi.

Sygnały powstające wewnątrz komórki i wiązanie białek do domeny cytoplazmatycznej powodują przejście integryny w stan zdolny do wiązania ligandu na skutek zmian konformacyjnych wewnątrz jej cząsteczki (*inside-out signaling*). Wiązanie ligandów macierzy zewnątrzkomórkowej indukuje również zmiany w strukturze cząsteczki integryny, które są przekazywane do wnętrza komórki (*outside-in signaling*).



Ryc. 1. Kindlina i talina uczestniczą w w aktywacji typu 'inside-out'.

Aktywacja integryn zależy od interakcji taliny z motywem NPLY747 (zaznaczonym na sekwencji domeny cytoplazmatycznej $\beta 3$ integryny na czerwono) oraz dodatkowymi aminokwasami położonymi bliżej błony komórkowej. Kindlina umożliwia aktywację przez oddziaływanie z regionem C-końcowym integryny $\beta 3$ poprzez motywy TS⁷⁵²T i NITY⁷⁵⁹ (zaznaczone na sekwencji domeny cytoplazmatycznej $\beta 3$ integryny na fioletowo).

Model aktywacji *inside-out* zakłada, że do przejścia integryny w stan aktywny nie jest wymagane przyłączenie ligandu. Aktywacja typu *inside-out* przebiega z udziałem wewnątrzkomórkowych białek związanych ze szkieletem cytoplazmatycznym: kindliny i taliny.

Kindliny (inaczej: fermityny) to rodzina konserwatywnych ewolucyjnie białek (Kindlina-1, -2 i 3) zlokalizowanych w komórkach w ogniskach przylegania (*focal adhesions*)¹⁻⁵. Ogniska przylegania to wielobiałkowe kompleksy uformowane wokół heterodimerów integrynowych, które łączą cytoszkielet aktynowy z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. Pierwszym, które zostało opisane w literaturze, najbardziej znanym zadaniem kindlin, jest zwiększenie powinowactwa integryny do ligandu (aktywacji integryny) poprzez wiązanie integrynowej domeny cytoplazmatycznej (**Ryc. 1**) w kooperacji z taliną^{6,7}. Nazwa „kindliny” pochodzi od zespołu Kindlera, rzadkiej choroby wrodzonej skóry, spowodowanej mutacją genu odpowiadającego za ekspresję kindliny-1, opisanego w roku 1954 przez Teresę Kindler⁸. W obrazie klinicznym choroby obserwuje się min. skórne pęcherzyki pojawiające się w miejscach uciskanych, postępującą poikilodermę, atrofię błony śluzowej jamy ustnej i krwawienie z dziąseł. Kindlina-1 występuje głównie w komórkach nabłonkowych, takich jak keratynocyty i komórki nabłonka jelitowego, kindlina-2 to najbardziej powszechna kindlina, występuje ona we wszystkich komórkach z wyjątkiem układu krwiotwórczego. Wysoki poziom ekspresji kindliny-2 istnieje w komórkach śródbłonna, gdzie kindlina-2 pełni ważną rolę w angiogenezie regulując adhezję i migrację komórek śródbłonna⁹. Kindlina-2 w komórkach śródbłonna jest także odpowiedzialna za endocytozę enzymów błonowych (CD39 i CD73), uczestniczących w procesie degradacji adenozylo-5'-trifosforanu (ATP), co w sposób pośredni wpływa na hemostazę w organizmie¹⁰. Kindlina-3 została pierwotnie odkryta w komórkach układu krwiotwórczego¹¹, od tego czasu badania z naszego i innych laboratoriów zidentyfikowały kindlinę-3 jako ważny komponent przekazywania sygnałów przez integryny w komórkach śródbłonna i jako białko regulujące proces nowotworzenia w komórkach raka piersi^{12,13}. W uzupełnieniu do funkcji w przekazywaniu sygnałów przez integryny kindliny mogą także spełniać funkcje niezależne od integryn: kindlina-3 może stabilizować szkielet błonowy erytrocytów¹⁴, kindlina-1 i -2 zostały znalezione w międzykomórkowych połączeniach przylegania w komórkach nabłonkowych; kindlina-2 znajduje się w jądrach komórek mięśni gładkich, jednak rola kindlin w tych strukturach komórkowych nie jest całkowicie jasna^{15,16}.

Podobnie jak w przypadku dwóch izoform taliny (taliny-1 i taliny-2), kindliny zawierają domenę FERM (region N-końcowy białek ERM), występującą także w białku 4.1, ezrynie, radyksynie i moezynie, domena ta typowo składa się z trzech poddomen zwanych F1, F2 i F3 (struktura domenowa kindlin i białka oddziałujące z poddomenami kindlin przedstawione są na **Ryc. 2**)^{2,17}. Poddomeny F3 kindliny i taliny tworzą miejsce wiązania fosfotyrozyny (PTB), która wiąże motyw NPXY w domenie cytoplazmatycznej β -integryny (**Ryc. 1**). Kindliny posiadają także domenę plekstrynową (*PH, pleckstrin homology*), która znajduje się w środkowej części poddomeny F2, domena ta oddziałuje z fosfatydyloinozytolami, co odpowiada za właściwą lokalizację kindlin w ogniskach przylegania¹⁸.

Po aktywacji integryn, kindliny pozostają w ogniskach przylegania, gdzie uczestniczą w przekazywaniu sygnałów przez integryny związane z ligandem (*outside-in*) do cytoszkieletu aktynowego komórki. Mechanizmy przekazywania sygnałów przez kindliny zlokalizowane w ogniskach przylegania nie są w pełni zrozumiałe. Chociaż lokalizacja kindliny-2 do cytoszkieletu aktynowego została zaobserwowana pod mikroskopem, przyjęto że to oddziaływanie jest pośrednie. Badania z naszego i innych



laboratoriów wykazały, że przekazywanie sygnałów może nastąpić poprzez zdolność kindlin do wiązania kinazy związanej z integrzynami (*ILK, integrin-linked kinase*)^{19;20}, czy migfiliny²¹, a bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy kindliną i F-aktyną nie było brane pod uwagę. W naszej ostatniej pracy, dostarczyliśmy dowodów takiej bezpośredniej interakcji kindliny-2 i aktyny i zlokalizowaliśmy miejsce wiązania aktyny w poddomenie F0 kindliny-2 (Journal of Cell Biology, praca przyjęta do druku). To miejsce wiązania w cząsteczce kindliny ma fundamentalne znaczenie dla przekazywania sygnałów „*outside-in*” przez integryny i nasze odkrycie opisuje nowy mechanizm regulacji przekazywania takich sygnałów.

Kindliny w chorobach dziedzicznych i nowotworach

Jak wspomniano powyżej, mutacje w genie kindliny-1 znaleziono w zespole Kindlera. U myszy nokaut genu kindliny-1 charakteryzuje wysoka śmiertelność okołoporodowa wynikająca z choroby jelit przypominającej wrzodziejące zapalenie okrężnicy. Przyczyną wrzodziejącego zapalenia jelita grubego jest zaburzenie prawidłowej adhezji nabłonka, co z kolei jest spowodowane przez wadliwe przekazywanie sygnałów przez integryny²².

U myszy nokaut kindliny-2 jest śmiertelny we wczesnym okresie rozwoju zarodka^{7;23}. Nie jest to niespodzianką, gdyż kindlina-2 jest jedyną kindliną występującą w embrionalnych komórkach macierzystych⁷. Zarodki z niedoborem kindliny-2 obumierają w związku z wadliwym funkcjonowaniem integryn w epiblastach i wewnętrznym listku zarodkowym, co skutkuje brakiem adhezji. Kindlina-2 jest jedyną izoformą znajdującą się w miocytach⁴. Nokaut kindliny-2 w danio pręgowanym (*Zebra fish*) powoduje nieprawidłowy kształt ciała i zaburzenia poruszania, w wyniku zaburzeń funkcji mięśni szkieletowych a także zaburzenia funkcji mięśnia sercowego²³. Mutacje ludzkiej kindliny-2 są prawdopodobnie przyczyną śmierci w okresie życia zarodkowego, a co za tym idzie, choroby dziedziczne nie zostały opisane. Jednakże, podobnie do tego co zostało przedstawione dla innych białek występujących

w ogniskach przylegania jak ILK, niektóre mutacje kindliny-2 mogą prowadzić do pewnych form kardiomiopatii²³.

Kindlina-3 występuje w komórkach układu krwiotwórczego, śródbłonku i komórkach nowotworowych. Nokaut genu kindliny-3 u myszy powoduje poważne krwawienia i defekty szkieletu błonowego erytrocytów^{11;14}. Krwawienie spowodowane przez wadliwą aktywację integryny $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ w płytkach krwi daje obraz kliniczny podobny do choroby Glanzmanna, dziedzicznej recesywnej choroby spowodowanej mutacjami w podjednostce α lub β integryny $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Mutacje kindliny-3 są także odpowiedzialne za rzadką chorobę dziedziczną zwaną niedoborem leukocytarnych cząstek adhezyjnych (LAD-III), która charakteryzuje się wzmożonym krwawieniem i zaburzeniami adhezji leukocytów do śródbłonka w stanach zapalnych, co spowodowane jest wadliwym wiązaniem się zmutowanej kindliny-3 do domeny cytoplazmatycznej β integryn^{24;25}. Co ciekawe, pomimo braku integryn w dojrzałych erytrocytach, mutacje kindliny-3 zaburzają szkielet błonowy, co spowodowane jest obniżonym poziomem białek takich jak ankiryna czy białko 4.1. Mechanizm powodujący te zmiany w strukturze szkieletu błonowego w obecności zmutowanej kindliny nie jest jeszcze znany. Oprócz powodowania chorób dziedzicznych, kindliny biorą także udział w powstawaniu i progresji nowotworów. Ekspresja kindliny-1 ale nie kindlin 2 i 3 jest podwyższona w nowotworach płuc i odbytnicy²⁶. Transformujący czynnik wzrostu- β (TGF- β), który zwiększa ruchliwość komórek nowotworowych, indukuje nadekspresję kindliny-1 w nowotworach². Kindlina-2 ulega nadekspresji w niektórych rodzajach nowotworu, takich jak: rak piersi i pęcherza moczowego, gruczolakorak przewodowy czy międzybłoniak, gdzie podwyższony poziom kindliny-2 jest skorelowany z przerzutami do węzłów chłonnych i złą prognozą²⁷⁻³⁰. Z kolei w nowotworach pochodzenia mezenchymalnego i raku jajnika podwyższony poziom kindliny-2 jest skorelowany z mniejszą inwazyjnością i lepszymi prognozami¹⁷. Badania prowadzone w naszym laboratorium wykazały związek między nadekspresją kindliny-3 i inwazyjnością raka piersi w modelach mysich i ludzkich tkankach, poprzez regulację poziomu czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF), zwiększoną aktywację integryny β1 , co prowadzi do zwiększenia inwazji komórek nowotworowych, szybszego unaczynienia guza i większej liczby przerzutów¹³.

Perspektywy

W ciągu ostatnich lat obserwuje się szybki postęp w poznaniu i zrozumieniu struktury i funkcji kindlin. Szczegółowe poznanie mechanizmu aktywacji integrin przez kindliny i wyjaśnienie mechanizmu niezależnego od integrin działania kindlin jest istotne ze względu na poszukiwanie nowych terapii w przypadku wielu chorób, min. zawałów serca, zatorów żylnych, w zaburzeniach funkcjonowania układu krwiotwórczego i odpornościowego, czy powstawania i przerzutowania nowotworów.

Literatura

1. Herz C, Aumailley M, Schulte C et al. Kindlin-1 is a phosphoprotein involved in regulation of polarity, proliferation, and motility of epidermal keratinocytes. *J.Biol.Chem.* 2006;281:36082-36090.
2. Kloeker S, Major MB, Calderwood DA et al. The Kindler syndrome protein is regulated by transforming growth factor-beta and involved in integrin-mediated adhesion. *J.Biol.Chem.* 2004;279:6824-6833.
3. Lai-Cheong JE, Ussar S, Arita K, Hart IR, McGrath JA. Colocalization of kindlin-1, kindlin-2, and migfilin at keratinocyte focal adhesion and relevance to the pathophysiology of Kindler syndrome. *J.Invest Dermatol.* 2008;128:2156-2165.
4. Ussar S, Wang HV, Linder S, Fassler R, Moser M. The Kindlins: subcellular localization and expression during murine development. *Exp.Cell Res.* 2006;312:3142-3151.
5. Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K, Wu C. Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell* 2003;113:37-47.
6. Ma Y.Q., Qin J, Wu C, Plow E.F. Kindlin-2 (Mig-2): a Co-activator of Beta 3 Integrins. *J Cell Biol.* 2008;181:439-446.
7. Montanez E, Ussar S, Schifferer M et al. Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev.* 2008;22:1325-1330.
8. KINDLER T. Congenital poikiloderma with traumatic bulla formation and progressive cutaneous atrophy. *Br.J.Dermatol.* 1954;66:104-111.
9. Pluskota E, Dowling JJ, Gordon N et al. The integrin coactivator kindlin-2 plays a critical role in angiogenesis in mice and zebrafish. *Blood* 2011;117:4978-4987.
10. Pluskota E, Ma Y, Bledzka KM et al. Kindlin-2 regulates hemostasis by controlling endothelial cell-surface expression of ADP/AMP catabolic enzymes via a clathrin-dependent mechanism. *Blood* 2013;122:2491-2499.
11. Moser M, Nieswandt B, Ussar S, Pozgajova M, Fassler R. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat.Med.* 2008;14:325-330.
12. Bialkowska K, Ma Y.Q., Bledzka K. et al. The integrin coactivator kindlin-3 is expressed and functional in a non-hematopoietic cell, the endothelial cell. *J Biol.Chem.* 2010;285:18640-18649.
13. Sossey-Alaoui K, Pluskota E, Davuluri G et al. Kindlin-3 enhances breast cancer progression and metastasis by activating Twist-mediated angiogenesis. *FASEB J.* 2014;28:2260-2271.
14. Kruger M, Moser M, Ussar S et al. SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell* 2008;134:353-364.
15. Kato K, Shiozawa T, Mitsushita J et al. Expression of the mitogen-inducible gene-2 (mig-2) is elevated in human uterine leiomyomas but not in leiomyosarcomas. *Hum.Pathol.* 2004;35:55-60.
16. Meves A, Stremmel C, Gottschalk K, Fassler R. The Kindlin protein family: new members to the club of focal adhesion proteins. *Trends Cell Biol.* 2009;19:504-513.
17. Shi X, Wu C. A suppressive role of mitogen inducible gene-2 in mesenchymal cancer cell invasion. *Mol.Cancer Res.* 2008;6:715-724.

18. Legate KR, Takahashi S, Bonakdar N et al. Integrin adhesion and force coupling are independently regulated by localized PtdIns(4,5)2 synthesis. *EMBO J.* 2011;30:4539-4553.
19. Huet-Calderwood C, Brahme NN, Kumar N et al. Differences in binding to the ILK complex determines kindlin isoform adhesion localization and integrin activation. *J Cell Sci.* 2014;127:4308-4321.
20. Fukuda K, Bledzka K, Yang J et al. Molecular basis of kindlin-2 binding to integrin-linked kinase pseudokinase for regulating cell adhesion. *J Biol.Chem.* 2014;289:28363-28375.
21. Brahme NN, Harburger DS, Kemp-O'Brien K et al. Kindlin binds migfilin tandem LIM domains and regulates migfilin focal adhesion localization and recruitment dynamics. *J.Biol.Chem.* 2013;288:35604-35616.
22. Ussar S, Moser M, Widmaier M et al. Loss of Kindlin-1 causes skin atrophy and lethal neonatal intestinal epithelial dysfunction. *PLoS.Genet.* 2008;4:e1000289.
23. Dowling JJ, Gibbs E, Russell M et al. Kindlin-2 Is an essential component of intercalated discs and is required for vertebrate cardiac structure and function. *Circ.Res.* 2008;102:423-431.
24. Malinin NL, Zhang L, Choi J et al. A point mutation in kindlin-3 ablates activation of three integrin subfamilies in humans. *Nature Med.* 2009;15:313-318.
25. Svensson L, Howarth K, McDowall A et al. Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation. *Nat.Med.* 2009;15:306-312.
26. Weinstein EJ, Bourner M, Head R et al. URP1: a member of a novel family of PH and FERM domain-containing membrane-associated proteins is significantly over-expressed in lung and colon carcinomas. *Biochim.Biophys.Acta* 2003;1637:207-216.
27. Gozgit JM, Pentecost BT, Marconi SA et al. Use of an aggressive MCF-7 cell line variant, TMX2-28, to study cell invasion in breast cancer. *Mol.Cancer Res.* 2006;4:905-913.
28. Mahawithitwong P, Ohuchida K, Ikenaga N et al. Kindlin-2 expression in peritumoral stroma is associated with poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2013;42:663-669.
29. An Z, Dobra K, Lock JG et al. Kindlin-2 is expressed in malignant mesothelioma and is required for tumor cell adhesion and migration. *Int.J.Cancer* 2010;127:1999-2008.
30. Talaat S, Somji S, Toni C et al. Kindlin-2 expression in arsenite- and cadmium-transformed bladder cancer cell lines and in archival specimens of human bladder cancer. *Urology* 2011;77:1507.