

综述

整合素胞内调控蛋白的分子特性与功能

何美美[#] 葛云霄[#] 焦灿[#] 陈卓 李雪莉 高冠赏 杜英*

(郑州大学基础医学院, 郑州 450001)

摘要 整合素(integrin)是一类重要的细胞表面黏附分子,由 α 和 β 亚基通过非共价键组成异源二聚体,对于免疫细胞的组织定位、凝血、癌细胞转移以及组织和器官的发育等都至关重要。整合素的胞内结构域通常很短,但是却可以结合多种细胞内信号蛋白,对整合素介导的“outside-in”和“inside-out”信号通路发挥重要作用。因此,筛选和鉴定可以特异性识别整合素胞内结构域的调控蛋白,对阐明整合素介导双向信号转导的机制尤为重要。该文系统地总结了可以分别结合整合素 α 亚基和 β 亚基的胞内调控蛋白,分别从各个蛋白的分子结构、在整合素胞内段的结合位点、调控机制以及生理和病理功能等方面做了详尽的阐释,并对整合素胞内调控蛋白的临床应用前景作出展望。

关键词 整合素; 信号转导; 胞内结构域; 调控蛋白

Molecular Properties and Functions of Integrin Intracellular Regulatory Proteins

HE Meimei[#], GE Yunxiao[#], JIAO Can[#], CHEN Zhuo, LI Xueli, GAO Guanshang, DU Ying*

(School of Basic Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract Integrin is an important cell surface adhesion molecule, which is a heterodimer formed by α and β subunits through non-covalent bonds and is very important for the localization of immune cells, blood coagulation, metastasis of cancer cells, and the development of tissues and organs. Although the cytoplasmic domain of integrin is usually very short, it can bind with many intracellular regulatory proteins, which plays vital roles in integrin-mediated outside-in and inside-out signalings. Thus, screening and identification of regulatory proteins specifically recognizing integrin cytoplasmic domain can help to illuminate the mechanism of how integrin regulates the bidirectional signal transduction. In this study, the integrin intracellular regulatory proteins were systematically summarized, which interacted with integrin α and β subunits, respectively. The molecular structure, binding site in integrin cytoplasmic domain, regulatory mechanism, and physiological and pathological functions of each protein were introduced in detail. In the end, the clinical application of integrin intracellular regulatory protein was prospected.

Keywords integrin; signal transduction; intracellular domain; regulatory proteins

自然界中的生命由无机物到有机物、单细胞到多细胞进化而来。细胞与细胞、细胞与胞外基

质之间往往形成细胞黏附,介导细胞与外界环境之间的联系。整合素是其中一类重要的细胞表面黏

收稿日期: 2020-01-11 接受日期: 2020-06-19

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81471545)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0371-67781976, E-mail: duyings@zhu.edu.cn

Received: January 11, 2020 Accepted: June 19, 2020

This study was supported by the General Project of the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81471545)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-371-67781976, E-mail: duyings@zhu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5363>

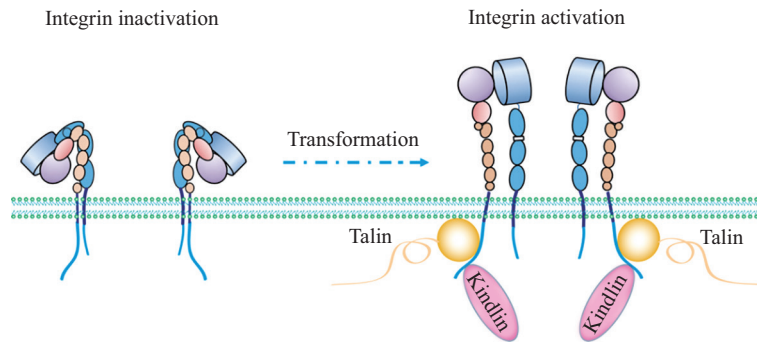


图1 整合素失活化状态和活化状态之间的动态转换

Fig.1 Dynamic transition between integrin inactivation state and activation state

附分子,其是由 α 和 β 2个亚基通过非共价键连接组成的异源二聚体,属于第一类跨膜蛋白^[1-2]。自1987年整合素被发现至今,在脊椎动物中已经发现了18种 α 亚基和8种 β 亚基,组成了至少24种整合素^[2]。整合素作为细胞内外的桥梁,一方面负责介导细胞与细胞、细胞外基质或者病原体之间的相互作用,另一方面可以双向传递跨膜信号,对于免疫细胞的组织定位、凝血、癌细胞转移以及组织和器官的发育等都至关重要^[2-4]。

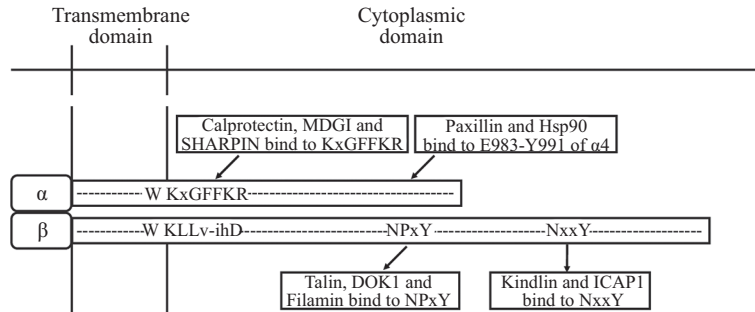
构成整合素的2个亚基各自主要包含3个结构域:形态较大的细胞外结构域(负责结合整合素的配体)、单链跨膜结构域以及胞内结构域(通常包含20~70个氨基酸残基)(图1)^[5-6]。基于整合素的结构,其在细胞黏附、细胞迁移、细胞分化、细胞增殖以及细胞程序性死亡方面扮演着重要的角色。整合素的功能依赖于对其配体结合的亲和力及其所介导的信号转导的动态调控。整合素活化受阻会引起许多人类疾病,包括凝血紊乱以及免疫缺陷等^[7-8],而过度的整合素活化则会引发炎症和癌症等疾病^[9-10]。在细胞没有收到激活信号的情况下,细胞膜表面的整合素分子通常处于一种折叠的低活化构象,2个亚基互相靠近,胞外的头部结构域伸向细胞膜,表现出对配体结合的低亲和力。当细胞收到激活信号后,一些胞内调控蛋白,如踝蛋白(talin)、kindlin等,会结合到整合素的胞内区,2个亚基彼此分离,通过由内向外(inside-out)的信号诱导整合素胞外的头部结构域向外伸展,从折叠的低活性构象转变为伸展的高活性构象,以高亲和性结合配体蛋白(图1)^[11-15]。另外,整合素与胞外配体蛋白的结合也可以进一步诱导整合素的构象变化以及整合素在细胞膜表面上的聚簇(clustering),通过

由外向内(outside-in)信号转导激活相应的胞内信号通路^[16-18]。整合素的胞内段虽然很短,但是却可以与上百种甚至上千种细胞内信号蛋白直接或间接作用,参与庞大复杂的信号转导,对整合素的活化有很重要的作用。因此,筛选和鉴定可以特异性识别整合素胞内结构域的胞内调控蛋白,对阐明整合素介导双向信号转导的机制尤为重要^[19-21]。

筛选特异性识别整合素胞内结构域的调控蛋白,主要有以下几种方法:(1)酵母双杂交筛选(yeast two-hybrid screen),将不同整合素的胞内结构域序列分别克隆到酵母表达质粒的转录激活因子的DNA结合结构域上,在酵母体内表达“诱饵”蛋白,筛选与其相互作用的且与转录激活域融合表达的“猎物”蛋白,这种方法具有很高的灵敏性;(2)免疫共沉淀(Co-immunoprecipitation, Co-IP),分别用整合素的特异性抗体或者与其融合表达的标签蛋白的抗体和细胞裂解上清液共孵育,通过抗体结合整合素及其相互作用蛋白,洗去非特异性结合的蛋白后,用Western blot或者质谱鉴定新的整合素胞内结构域结合蛋白;(3)Pull-down实验,类似于Co-IP,分别用人工合成的或者经原核/真核表达纯化得到的整合素胞内结构域蛋白和细胞裂解上清液共孵育,筛选新的整合素胞内结合蛋白。目前为止,科学家已经鉴定出了几十种整合素胞内结构域结合蛋白,并做了功能验证。接下来,我们将分别从整合素 α 亚基和 β 亚基入手,详细介绍整合素经典的以及最新发现的几种胞内调控蛋白(图2)。

1 整合素 α 亚基胞内调控蛋白

一般来说,整合素的 α 亚基胞内结构域序列保守度较低,说明每一种 α 亚基在介导整合素功能方面



MDGI: 乳腺生长抑制剂; Hsp90: 热休克蛋白90; SHARPIN: SHANK蛋白RH区域交互作用蛋白; DOK1: 停靠蛋白1; ICAP1: 整合素胞内结构域相关蛋白1。

MDGI: mammary-derived growth inhibitor; Hsp90: heat shock protein 90; SHARPIN: SHANK-associated RH domain interactor; DOK1: docking protein 1; ICAP1: integrin cytoplasmic domain associated protein 1.

图2 整合素 α 亚基和 β 亚基的胞内调控蛋白

Fig.2 Intracellular regulatory proteins of the α and β subunits of integrin

扮演着独特的角色; 仅在 α 亚基近膜端存在相似的保守序列KxGFFKR, 从而允许此区域的结合蛋白能够同时调控不同的整合素^[22]。

1.1 桩蛋白

桩蛋白(paxillin)是一种胞内接头蛋白, 可以直接并紧密地结合 $\alpha 4$ 亚基的胞内结构域, 但却不能结合其他 α 亚基^[15]。进一步的研究发现, α 亚基胞内结构域的9个氨基酸(E983-Y991)足以介导paxillin的结合^[23]。Paxillin缺失的细胞在整合素 $\alpha 4 \beta 1$ 的配体血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)上, 可以很好地铺展, 然而重新表达paxillin会再度抑制细胞铺展^[15]。 $\alpha 4$ 亚基的一个点突变(Y991A)可以抑制其与paxillin的结合并逆转其影响^[15,23]。众所周知, paxillin可以直接和细胞内一些信号分子和接头蛋白相互作用, 其中大多数相互作用的蛋白, 比如黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、PTP-PEST酪氨酸磷酸酶、vinculin黏着斑蛋白、Crk接头蛋白、p95PKLp50相位跟踪环以及PIX鸟嘌呤核苷酸交换因子和PAK黏着斑激酶^[24], 已经被证实有调控细胞迁移、细胞骨架重构以及基因表达的功能。因此, paxillin和 $\alpha 4$ 整合素胞内结构域的结合有可能起到快速招募和激活这些信号分子的作用, 从而参与 $\alpha 4$ 整合素不同寻常的生物学功能。更进一步的研究证实, $\alpha 4$ 整合素与paxillin的相互作用可以调控淋巴细胞的迁移。在细胞迁移过程中, $\alpha 4$ 亚基胞内结构域第988位丝氨酸的前端和末端分别被磷酸化或去磷酸化, 从而抑制或促进paxillin与 $\alpha 4$ 整合素的结合, 最终通过GTPase Rac的活化和去活化来调控细胞迁移^[25]。另有研究揭示了一种新的机

制, paxillin可以通过与kindlin-1的N末端相互作用来增强整合素 $\alpha \text{I} \beta \beta 3$ 的活化, 通过这种机制, 在kindlin与paxillin协同作用下, talin与整合素 $\alpha \text{I} \beta \beta 3$ 结合增强进而增强整合素 $\alpha \text{I} \beta \beta 3$ 的功能^[26]。

1.2 钙网蛋白

钙网蛋白(calprotectin)是一种内质网腔内钙离子结合蛋白, 可直接与 α 亚基KxGFFKR基序结合^[27-29]。钙网蛋白缺陷的细胞严重影响了整合素介导的细胞黏附, 但在重新表达钙网蛋白后, 该影响可以被逆转。进一步的研究发现, 瞬时上调细胞内钙离子的浓度引发整合素介导的细胞黏附的现象在钙网蛋白缺陷的细胞中同样缺失^[30]。因此, 整合素 α 亚基胞内结构域与钙网蛋白的相互作用有可能调控细胞黏附及信号转导。现有最新实验研究提出了钙网蛋白被招募至细胞膜表面的机制假设, 该假设认为钙网蛋白通过泛素化途径从内质网释放到细胞质, 随后转移至细胞表面。该实验还证明了整合素-钙网蛋白在细胞质中发生的黏附介导的相互作用导致转运到细胞表面的钙网蛋白减少^[31]。

1.3 乳腺生长抑制剂

乳腺生长抑制剂(mammary-derived growth inhibitor, MDGI)广泛表达于各个组织, 尤其在肌肉和乳腺中大量表达。酵母双杂交实验显示, MDGI可以与许多不同的 α 整合素亚基($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 10$ 和 $\alpha 11$)结合, 暗示MDGI可能结合于 α 亚基中高度保守的WKxGFFKR序列。研究表明, MDGI为 α 整合素亚基的新型结合蛋白, 直接与 α 整合素亚基的胞质尾部结合, 其表达抑制整合素的活性。在乳腺癌细胞中, MDGI表达增加可抑制整合素活性从而抑制细胞

的迁移和侵袭^[32]。MDGI过表达可以降低 kindlin 与 $\beta 1$ 整合素的结合, 从而抑制整合素活化进而抑制乳腺癌细胞的迁移和转移^[32]。

1.4 SHARPIN

SHARPIN 是一种重要的细胞内调控蛋白, 参与蛋白的泛素化(ubiquitination)降解等很多重要的生理功能^[33-35]。SHARPIN 是经小分子干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 筛选出的 $\beta 1$ 整合素活化抑制蛋白, SHARPIN 缺失可以促进细胞表面整合素的活化而不改变整合素的表达^[36], 但在人的癌细胞、原代淋巴细胞、成纤维细胞中, SHARPIN 的过表达可以抑制整合素的功能。在血小板中, 过表达的 SHARPIN 与 α 整合素亚基相互作用, 从而抑制整合素 $\alpha IIb\beta 3$ 的活化, 进而影响血小板的止血功能。SHARPIN 也可能参与协调血小板的黏附和免疫/炎症功能^[37]。SHARPIN 结合在 α 整合素亚基胞内段高度保守的 WKxGFFKR 序列上, 而此序列中的氨基酸 R 可以与 β 亚基近膜端 LLv-iHDR 序列相互作用形成盐桥, 使整合素处于低活性的折叠状态。因此, SHARPIN 与 α 整合素亚基的结合可能通过稳定盐桥的构象从而抑制整合素活化。同时, 研究发现 SHARPIN 可以抑制 talin 和 kindlin 与 β 亚基的结合^[36]。

1.5 热休克蛋白 90

热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, Hsp90) 是最新研究发现的 $\alpha 4$ 整合素调控蛋白, 并且与 paxillin 相同, Hsp90 也可结合在 $\alpha 4$ 亚基胞内段的 E983-Y991 序列上面^[38-39]。当机体温度达到高热 (38.5 °C) 及以上水平时, 可以通过 Hsp90 诱导 $\alpha 4$ 整合素活化并激活细胞迁移相关信号通路, 从而促进 T 细胞迁移到淋巴结和炎症部位。其具体机制为: 发热会上调 T 细胞中 Hsp90 (包括 Hsp90AA1 和 Hsp90AB1) 的表达, 并促进其与 $\alpha 4$ 整合素胞内区结合。一方面, Hsp90- $\alpha 4$ 整合素相互作用通过 inside-out 信号通路, 招募 talin 和 kindlin-3 结合到整合素 β 亚基胞内区, 激活 $\alpha 4$ 整合素, 使其由静息状态折叠的低活性状态活化为伸展的高活性状态; 另一方面, 1 个 Hsp90 分子可以通过其 N 末端和 C 末端结构域同时结合 2 个 $\alpha 4$ 整合素分子, 从而引起 $\alpha 4$ 整合素在细胞膜表面的二聚化和聚簇现象, 并激活胞内 FAK-RhoA 信号通路, 最终促进 T 细胞迁移。

2 整合素 β 亚基胞内调控蛋白

由于整合素 β 亚基的胞内结构域具有高度的保

守性, 其胞内结合蛋白的相互作用已经被广泛研究并取得了重要进展。研究发现, 当 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 及 $\beta 3$ 整合素缺失掉胞内结构域后, 黏着斑不能形成, 配体结合亲和性下降, 并且下游信号分子的激活被抑制^[40-42]。整合素 β 亚基胞内段含有两段保守序列, 分别是近膜端的 NPxY 和远膜端的 NxxY 序列, 这 2 个序列含有磷酸化酪氨酸结合结构域 (phosphotyrosine binding domain, PTB) 的结合位点, 一些含有 PTB 结构域的蛋白分子能够与其结合从而调节整合素活化^[43]。到目前为止, 已有至少 21 种蛋白被证实与一种或多种整合素 β 亚基胞内结构域结合, 主要包括肌动蛋白结合蛋白 (actin-binding proteins)、酶 (enzymes)、接头蛋白 (adaptor proteins)、转录激活因子 (transcriptional co-activator) 以及一些功能尚未确定的蛋白^[44-46]。

2.1 Talin

Talin 为细胞骨架肌动蛋白结合蛋白, 在膜蛋白与细胞骨架结构的偶联以及信号通路中起到了非常重要的作用^[47]。在趋化因子调控整合素活化这一过程中, talin 是一个关键蛋白。在多种细胞类型中, talin 对于整合素的激活是非常关键的, 其通过与整合素 β 亚基尾部近膜端 NPxY motif 结合诱导了整合素胞外结构域构象的改变从而引起了整合素的激活。从结构上分析, talin 分为球状头部区域和一段很长的杆状区域^[48]。Talin 的头部含有 FERM (band-4.1, ezrin, radixin, moesin) 结构域, 其被分为 F1、F2、F3 3 个亚结构域, 主要负责和整合素胞内 NPXY/F 保守序列结合。Talin 头部区域还含有 actin、vinculin 的结合位点, 用以联系整合素和胞内骨架蛋白的相互作用。与整合素结合的 talin 一旦结合到 actin, talin 就会被机械力拉伸展开从而暴露出相互作用位点, 该相互作用位点募集了额外的蛋白质, 特别是 vinculin, 因此, talin 将肌动蛋白介导的对整合素的作用转化为对整合素相关蛋白 (integrin associated proteins, IAPs) 的募集, 从而使 IAPs 改变黏附^[49]。

2.2 Kindlin

Kindlin 家族是一类新发现的黏着斑蛋白。到目前为止, 该家族已经被鉴定出了 kindlin-1、kindlin-2 和 kindlin-3 3 个成员^[50]。与 talin 类似, kindlin 与整合素活化密切相关。Kindlin 也含有 1 个典型的 FERM 结构域, 可与整合素 β 亚基胞内段结合。例如, kindlin-1 可与 $\beta 1$ 和 $\beta 3$ 结合^[51], 而 kindlin-3 能与淋巴细胞特异性表达的 $\beta 2$ 整合素胞内段结合^[52]。有研究表明, kindlin

可与整合素远膜端的NxxY motif结合^[53]。近年,有一篇文章介绍了kindlin介导的整合素信号转导的分子基础,作者研究了kindlin-2在apo-和 β -尾结合形式下的晶体结构,发现kindlin-2在晶体和溶液中形成了F2结构域交换二聚体,而限制二聚体的突变会阻碍整合素的活化,这表明单体-二聚体的转变对kindlin介导的整合素激活有着重要作用^[54]。此外,kindlin不仅在整合素的活化中起作用,而且其作为重要的信号分子参与了细胞迁移、增殖和分化的调控。Kindlin异常可以导致多种遗传性疾病,例如Kindler综合征(Kindler syndrome, KS)和白细胞黏附缺陷(leukocyte adhesion deficiency, LAD)。

2.3 停靠蛋白

前面提到一些含有PTB结构域的蛋白分子,能够通过整合素 β 亚基胞内段的两段保守序列结合进而调节整合素活化^[43],目前,发现至少有17种含有PTB结构域的蛋白分子能够与 β 亚基胞内段结合^[55],其中停靠蛋白1(docking protein 1, DOK1)能够结合到 β 亚基的NPxY序列,与talins结合位点相同。已有的研究证明,DOK1可以抑制整合素的活性^[55],蛋白激酶Src通过磷酸化 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 7$ 整合素亚基中NPxY序列的酪氨酸可以极大地促进DOK1与 β 亚基胞内段的结合,由于酪氨酸的磷酸化会降低talins与整合素的亲和性,因此,这种磷酸化可能在调控talins介导的整合素活化和DOK1介导的整合素去活化之间发挥平衡作用^[56],具体机制有待进一步研究。除此之外,DOK1在止血和血栓形成中具有关键作用,其通过outside-in信号通路负向调节整合素 α IIb β 3的信号转导,由此调控血小板功能从而抑制血栓形成^[57]。

2.4 整合素胞内结构域相关蛋白

另外一些PTB蛋白倾向于结合远端的NxxY序列,如Shc(通过cDNA克隆筛选到的编码SH结构域的基因的蛋白产物,是一种连接蛋白)、DAB1(disabled 1,是细胞内重要的衔接蛋白,由55个氨基酸组成,N末端有蛋白相互作用/磷酸酪氨酸结合的结构域P)、DAB2和整合素胞内结构域相关蛋白1(integrin cytoplasmic domain associated protein 1, ICAP1)^[55]。ICAP1可以特异性地结合在 $\beta 1$ 亚基胞内段远端的NxxY序列上,并且ICAP1也是一个受磷酸化调节的蛋白,其磷酸化程度受细胞和细胞外基质相互作用的调节^[58-59]。在细胞内,ICAP1可能被钙调蛋白依赖性激酶II(calcium-CaM-dependent protein kinase II, CaMKII)磷酸化从而促进其

与 $\beta 1$ 的结合,同时抑制其与talins的结合,最终抑制整合素的活化^[60-61]。研究证明,ICAP1包含1个功能性核定位序列(nuclear localization sequence, NLS),为ICAP1定位至细胞核提供了必要证据,并且ICAP1在核内聚集从而使得其在胞质中的浓度降低,进而使ICAP1对 $\beta 1$ 整合素亚基的抑制减弱。由于 $\beta 1$ 整合素亚基与广泛的下流信号传导途径相关,故对其严格的调控才能保证细胞功能的正常发挥^[62]。还有报道称,ICAP1缺失能够通过减慢黏着斑的动态变化来促进整合素活化,并且ICAP1缺失的小鼠伴有整合素依赖的破骨细胞增殖缺陷^[63-64],因此,ICAP1是一种显著的整合素负调控蛋白。

2.5 细丝蛋白

细丝蛋白(filamin)可作为黏附受体(如整合素)的支架将黏附受体连接到信号通路和细胞骨架上。Filamin共有3个亚型: filamin a、filamin b、filamin c。Filamin a是最近关注的热点,其是将细胞骨架连接到多个受体的关键,并且可在黏附到细胞外基质后进行信号转导。在血小板中,filamin a的缺失可能促进整合素 α IIb β 3活化,从而增加血栓形成的风险^[65-66]。Filamin虽然不含有PTB结构域,但能够和整合素 β 亚基胞内段结合并抑制整合素的活化;而filamin缺失则会引起细胞表面整合素活化。研究表明,filamin和talins在整合素 β 亚基尾部的结合位点重叠,filamin通过竞争talins在 β 亚基胞内结构域上的结合位点而发挥其抑制功能^[67-68]。Migfilin是filamin结合蛋白,在细胞-细胞、细胞-细胞外基质连接处富集,能够通过替换filamin与 β 亚基的结合促进整合素活化,因此,filamin-migfilin的相互作用对于filamin介导的整合素活化抑制功能具有调控作用^[69-70]。

3 结语和展望

整合素的活化和非活化构象受到胞内结合蛋白的动态调控。本文分别从各个蛋白的分子结构、在整合素胞内段的结合位点、调控机制以及生理和病理功能等方面详细地总结了结合整合素 α 亚基和 β 亚基的胞内调控蛋白(图2)。动态的、时空调控的整合素胞内结构域附近多蛋白复合体的组装和去组装过程调控着整合素介导的outside-in和inside-out信号通路,对整合素相关的免疫细胞的组织定位、凝血、癌细胞转移以及组织和器官的发育等都至关重要。整合素胞内调控蛋白的筛选和鉴定为整合素相

关疾病的治疗提供了新的分子靶标。我们可以利用整合素胞内调控蛋白对整合素活化或者去活化的调控机制, 通过异位表达、RNA干扰介导的基因沉默、Crispr/Cas9介导的基因敲除技术等直接控制某类重要调控蛋白的表达, 或者利用小分子化合物、多肽或者抗体分别激活或者抑制该调控蛋白的活性, 从而人为干预整合素相关疾病的进程和治疗, 因此其具有重要的临床前研究价值。

参考文献 (References)

- [1] ALBELDA S M, BUCK C A. Integrins and other cell adhesion molecules [J]. *FASEB J*, 1990, 4(11): 2868-80.
- [2] HYNES R O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines [J]. *Cell*, 2002, 110(6): 673-87.
- [3] SPRINGER T A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm [J]. *Cell*, 1994, 76(2): 301-14.
- [4] LUO B H, SPRINGER T A. Integrin structures and conformational signaling [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18(5): 579-86.
- [5] SASTRY S K, HORWITZ A F. Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1993, 5(5): 819-31.
- [6] HYNES R O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion [J]. *Cell*, 1992, 69(1): 11-25.
- [7] HOGG N, BATES P A. Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes [J]. *Matrix Biol*, 2000, 19(3): 211-22.
- [8] LEGATE K R, WICKSTROM S A, FASSLER R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling [J]. *Genes Dev*, 2009, 23(4): 397-418.
- [9] MOSER M, LEGATE K R, ZENT R, et al. The tail of integrins, talin, and kindlins [J]. *Science*, 2009, 324(5929): 895-9.
- [10] SHATTIL S J, KIM C, GINSBERG M H. The final steps of integrin activation: the end game [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(4): 288-300.
- [11] BOUAOUINA M, LAD Y, CALDERWOOD D A. The N-terminal domains of talin cooperate with the phosphotyrosine binding-like domain to activate beta1 and beta3 integrins [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(10): 6118-25.
- [12] CALDERWOOD D A. Talin controls integrin activation [J]. *Biochem Soc Trans*, 2004, 32(Pt3): 434-7.
- [13] TADOKORO S, SHATTIL S J, ETO K, et al. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation [J]. *Science*, 2003, 302(5642): 103-6.
- [14] GUAN J L. Role of focal adhesion kinase in integrin signaling [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29(8/9): 1085-96.
- [15] LIU S, THOMAS S M, WOODSIDE D G, et al. Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses [J]. *Nature*, 1999, 402(6762): 676-81.
- [16] UPLA P, MARJOMAKI V, KANKAANPAA P, et al. Clustering induces a lateral redistribution of alpha 2 beta 1 integrin from membrane rafts to caveolae and subsequent protein kinase C-dependent internalization [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(2): 625-36.
- [17] GOTTSCHALK K E, KESSLER H. A computational model of transmembrane integrin clustering [J]. *Structure*, 2004, 12(6): 1109-16.
- [18] CLUZEL C, SALTEL F, LUSSI J, et al. The mechanisms and dynamics of (alpha)v(beta)3 integrin clustering in living cells [J]. *J Cell Biol*, 2005, 171(2): 383-92.
- [19] HUGHES P E, PFAFF M. Integrin affinity modulation [J]. *Trends Cell Biol*, 1998, 8(9): 359-64.
- [20] HEMLER M E. Integrin associated proteins [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10(5): 578-85.
- [21] DEDHAR S, HANNIGAN G E. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1996, 8(5): 657-69.
- [22] LIU S, CALDERWOOD D A, GINSBERG M H. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins [J]. *J Cell Sci*, 2000, 113 (Pt 20): 3563-71.
- [23] LIU S, GINSBERG M H. Paxillin binding to a conserved sequence motif in the alpha 4 integrin cytoplasmic domain [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(30): 22736-42.
- [24] TURNER C E, BROWN M C, PERROTTA J A, et al. Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: a role in cytoskeletal remodeling [J]. *J Cell Biol*, 1999, 145(4): 851-63.
- [25] ROSE D M. The role of the alpha4 integrin-paxillin interaction in regulating leukocyte trafficking [J]. *Exp Mol Med*, 2006, 38(3): 191-5.
- [26] GAO J, HUANG M, LAI J, et al. Kindlin supports platelet integrin alphaIIb beta3 activation by interacting with paxillin [J]. *J Cell Sci*, 2017, 130(21): 3764-75.
- [27] ROJANI M V, FINLAY B B, GRAY V, et al. *In vitro* interaction of a polypeptide homologous to human Ro/SS-A antigen (calreticulin) with a highly conserved amino acid sequence in the cytoplasmic domain of integrin alpha subunits [J]. *Biochemistry*, 1991, 30(41): 9859-66.
- [28] LEUNG-HAGESTEIJN C Y, MILANKOV K, MICHALAK M, et al. Cell attachment to extracellular matrix substrates is inhibited upon downregulation of expression of calreticulin, an intracellular integrin alpha-subunit-binding protein [J]. *J Cell Sci*, 1994, 107 (Pt 3): 589-600.
- [29] COPPOLINO M, LEUNG-HAGESTEIJN C, DEDHAR S, et al. Inducible interaction of integrin alpha 2 beta 1 with calreticulin. Dependence on the activation state of the integrin [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(39): 23132-8.
- [30] COPPOLINO M G, WOODSIDE M J, DEMAUREX N, et al. Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion [J]. *Nature*, 1997, 386(6627): 843-7.
- [31] LIU C C, LECLAIR P, MONAJEMI M, et al. alpha-integrin expression and function modulates presentation of cell surface calreticulin [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2268.
- [32] NEVO J, MAI A, TUOMI S, et al. Mammary-derived growth inhibitor (MDGI) interacts with integrin alpha-subunits and suppresses integrin activity and invasion [J]. *Oncogene*, 2010, 29(49): 6452-63.
- [33] HE L, INGRAM A, RYBAK A P, et al. Shank-interacting protein-like 1 promotes tumorigenesis via PTEN inhibition in human tumor cells [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(6): 2094-108.
- [34] LIANG Y. SHARPIN negatively associates with TRAF2-mediated NFkappaB activation [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21696.
- [35] IKEDA F, DERIBE Y L, SKANLAND S S, et al. SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF-kappaB activity and

- apoptosis [J]. *Nature*, 2011, 471(7340): 637-41.
- [36] RANTALA J K, POUWELS J, PELLINEN T, et al. SHARPIN is an endogenous inhibitor of beta1-integrin activation [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(11): 1315-24.
- [37] KASIRER-FRIEDE A, TJAHJONO W, ETO K, et al. SHARPIN at the nexus of integrin, immune, and inflammatory signaling in human platelets [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(11): 4983-8.
- [38] LIN C, ZHANG Y, ZHANG K, et al. Fever promotes T lymphocyte trafficking via a thermal sensory pathway involving heat shock protein 90 and alpha4 integrins [J]. *Immunity*, 2019, 50(1): 137-51.e6.
- [39] LIN C, CHEN J. Regulation of immune cell trafficking by febrile temperatures [J]. *Int J Hyperthermia*, 2019, 36(sup1): 17-21.
- [40] SOLOWSKA J, GUAN J L, MARCANTONIO E E, et al. Expression of normal and mutant avian integrin subunits in rodent cells [J]. *J Cell Biol*, 1989, 109(2): 853-61.
- [41] MARCANTONIO E E, GUAN J L, TREVITHICK J E, et al. Mapping of the functional determinants of the integrin beta 1 cytoplasmic domain by site-directed mutagenesis [J]. *Cell Regul*, 1990, 1(8): 597-604.
- [42] O'TOOLE T E, KATAGIRI Y, FAULL R J, et al. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction [J]. *J Cell Biol*, 1994, 124(6): 1047-59.
- [43] LEGATE K R, FASSLER R. Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 2): 187-98.
- [44] ZAIDEL-BAR R, ITZKOVITZ S, MA'AYAN A, et al. Functional atlas of the integrin adhesome [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(8): 858-67.
- [45] CHEN H, ZOU Z, SARRATT K L, et al. *In vivo* beta1 integrin function requires phosphorylation-independent regulation by cytoplasmic tyrosines [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(8): 927-32.
- [46] ARIAS-SALGADO E G, LIZANO S, SARKAR S, et al. Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(23): 13298-302.
- [47] CRITCHLEY D R. Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin [J]. *Annu Rev Biophys*, 2009, 38: 235-54.
- [48] WEGENER K L, PARTRIDGE A W, HAN J, et al. Structural basis of integrin activation by talin [J]. *Cell*, 2007, 128(1): 171-82.
- [49] KLAPHOLZ B, BROWN N H. Talin—the master of integrin adhesions [J]. *J Cell Sci*, 2017, 130(15): 2435-46.
- [50] LARJAVA H, PLOW E F, WU C. Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell-matrix adhesion [J]. *EMBO Rep*, 2008, 9(12): 1203-8.
- [51] MOSER M, NIESWANDT B, USSAR S, et al. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation [J]. *Nat Med*, 2008, 14(3): 325-30.
- [52] MOSER M, BAUER M, SCHMID S, et al. Kindlin-3 is required for beta2 integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells [J]. *Nat Med*, 2009, 15(3): 300-5.
- [53] HARBURGER D S, BOUAOUINA M, CALDERWOOD D A. Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of beta integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(17): 11485-97.
- [54] LI H, DENG Y, SUN K, et al. Structural basis of kindlin-mediated integrin recognition and activation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(35): 9349-54.
- [55] CALDERWOOD D A, FUJIOKA Y, DE PEREDA J M, et al. Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(5): 2272-7.
- [56] OXLEY C L, ANTHIS N J, LOWE E D, et al. An integrin phosphorylation switch: the effect of beta3 integrin tail phosphorylation on Dok1 and talin binding [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(9): 5420-6.
- [57] NIKI M, NAYAK M K, JIN H, et al. Dok-1 negatively regulates platelet integrin alphaIIb beta3 outside-in signalling and inhibits thrombosis in mice [J]. *Thromb Haemost*, 2016, 115(5): 969-78.
- [58] ZHANG X A, HEMLER M E. Interaction of the integrin beta1 cytoplasmic domain with ICAP-1 protein [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(1): 11-9.
- [59] STROEKEN P J, ALVAREZ B, VAN RHEENEN J, et al. Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 (ICAP-1) interacts with the ROCK-I kinase at the plasma membrane [J]. *J Cell Physiol*, 2006, 208(3): 620-8.
- [60] ALVAREZ B, STROEKEN P J, EDEL M J, et al. Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 (ICAP-1) promotes migration of myoblasts and affects focal adhesions [J]. *J Cell Physiol*, 2008, 214(2): 474-82.
- [61] BOUVARD D, MILLON-FREMILLON A, DUPE-MANET S, et al. Unraveling ICAP-1 function: toward a new direction [J]? *Eur J Cell Biol*, 2006, 85(3/4): 275-82.
- [62] DRAHEIM K M, HUET-CALDERWOOD C, SIMON B, et al. Nuclear localization of integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 (ICAP1) influences beta1 integrin activation and recruits Krev/interaction trapped-1 (KRIT1) to the nucleus [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(5): 1884-98.
- [63] BOUVARD D, ASZODI A, KOSTKA G, et al. Defective osteoblast function in ICAP-1-deficient mice [J]. *Development*, 2007, 134(14): 2615-25.
- [64] BRUNNER M, MILLON-FREMILLON A, CHEVALIER G, et al. Osteoblast mineralization requires beta1 integrin/ICAP-1-dependent fibronectin deposition [J]. *J Cell Biol*, 2011, 194(2): 307-22.
- [65] ROSA J P, RASLOVA H, BRYCKAERT M. Filamin A: key actor in platelet biology [J]. *Blood*, 2019, 134(16): 1279-88.
- [66] DONADA A, BALAYN N, SLIWA D, et al. Disrupted filamin A/alphaIIb beta3 interaction induces macrothrombocytopenia by increasing RhoA activity [J]. *Blood*, 2019, 133(16): 1778-88.
- [67] KIEMA T, LAD Y, JIANG P, et al. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin [J]. *Mol Cell*, 2006, 21(3): 337-47.
- [68] CALDERWOOD D A, HUTTENLOCHER A, KIOSSES W B, et al. Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(12): 1060-8.
- [69] LAD Y, JIANG P, RUSKAMO S, et al. Structural basis of the migfilin-filamin interaction and competition with integrin beta tails [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(50): 35154-63.
- [70] DAS M, ITHYCHANDA S S, QIN J, et al. Migfilin and filamin as regulators of integrin activation in endothelial cells and neutrophils [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26355.