

综述



余聪, 南方科技大学生命科学学院特聘副教授, 博士生导师。入选国家青年千人专家、深圳市海外高层次人才等项目。课题组致力于研究细胞与细胞外微环境的相互作用, 综合采用结构生物学、生物化学和细胞生物学的方法研究细胞黏附结构的形成及信号传导的分子机制, 以及黏附结构在免疫应答、炎症发生、肿瘤转移等生理和病理过程中发挥功能的分子机理。研究工作发表在*Cell*、*Molecular Cell*、*Proc Natl Acad Sci USA*、*Science Advances*、*Elife*、*Cell Reports*等杂志。实验室网页: <https://faculty.sustech.edu.cn/yuc/>。

探索细胞的“脚步”：黏着斑的动态结构

余聪^{1,2*}, 魏志毅¹

(¹南方科技大学生命科学学院, 深圳 518055; ²广东省细胞微环境与疾病研究重点实验室, 深圳市细胞微环境重点实验室, 深圳 518055)

摘要: 黏着斑是细胞与细胞外基质之间重要的黏附结构, 对于细胞黏附、信号传导和细胞迁移起着重要作用。通过感知外界机械力并将其转化为细胞内信号, 黏着斑使细胞能够感知和响应环境变化, 其结构也在发生动态变化, 如同人类行走的“脚步”。深入了解黏着斑的结构和功能, 对于揭示细胞生理和病理过程具有重要意义。本文概述了黏着斑结构与功能的最新研究进展, 着眼于黏着斑动态结构变化中蛋白-蛋白相互作用、机械力以及液-液相分离的调控, 同时也对黏着斑研究领域中的未来的研究方法和研究内容进行了展望。

关键词: 整合素; 液-液相分离; 蛋白-蛋白相互作用; 细胞骨架; 细胞黏附; 细胞微环境

Exploring the “footstep” of cells: dynamic structure of focal adhesions

YU Cong^{1,2*}, WEI Zhiyi¹

(¹School of Life Sciences, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518055, China;

²Guangdong Provincial Key Laboratory of Cell Microenvironment and Disease Research, Shenzhen Key Laboratory of Cell Microenvironment, Shenzhen 518055, China)

Abstract: Focal adhesions (FAs) are subcellular structures mediating cell-extracellular matrix adhesion that play crucial roles in signal transduction and cell migration. By sensing and converting external mechanical forces into intracellular signals, FAs allow cells to perceive and respond to environmental changes. FAs

收稿日期: 2023-06-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31500621, 31870757, 32170697); 深圳市科技创新委员会项目(JCYJ20200109141241950, ZDSYS20140509142721429)

*通信作者: E-mail: yuc@sustech.edu.cn

dynamic nature resembles the “footsteps” of human walking. Understanding the structure and function of FAs is significant in unraveling cellular physiology and pathology. This review provides an overview of the recent advances in the understanding of FA structure and function, focusing on protein-protein interactions, mechanotransduction, and liquid-liquid phase separation in regulating the dynamic remodeling of FAs. Additionally, future research directions and methodologies in the field of FAs research are also discussed.

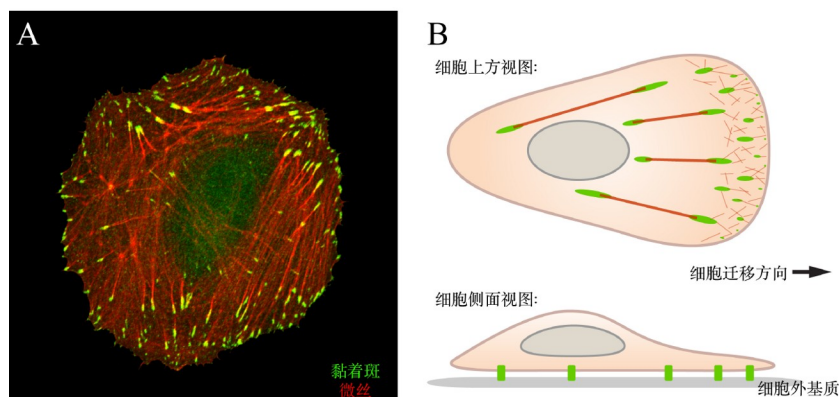
Key Words: integrin; liquid-liquid phase separation; protein-protein interaction; cytoskeleton; cell adhesion; cell microenvironment

细胞的运动和迁移是许多重要生理和病理过程的基础,如胚胎发育、组织修复、免疫反应和癌症转移等^[1]。当细胞迁移或变形时,其表面与细胞外基质的连接处形成一种被称为“黏着斑”(focal adhesions, FAs)的特异化亚细胞结构,就如同我们人类的脚步一样(图1A),为细胞的运动提供关键的机械支撑^[2]。黏着斑形成于细胞表面与细胞外基质的连接处。这一过程涉及细胞质膜表面的整合素受体(integrin)与细胞外基质建立牢固的连接,并通过“由内向外”和“由外向内”双向的信号传递,调控细胞内外的交流^[3]。黏着斑的形成引起以下变化:(1)影响细胞外部微环境,改变细胞外基质的特性;(2)调节细胞膜和细胞骨架的动态变化,影响细胞与基质的黏附性、细胞形态和机械受力,进而影响细胞的运动能力;(3)参与调控细胞内部信号通路,调节各种激酶的活性,控制细胞内蛋白质的表达和运输,从而调控细胞的增殖、分化、凋亡和迁移等活动和行为。此外,黏着斑还作为细胞内外物理信号转导的桥梁,能

将外界的机械力信号转化为化学信号,从而调节细胞的生理和病理状态^[2,4]。

由于黏着斑对于细胞功能的重要性,其结构的异常变化与包括癌症在内的多种疾病密切相关^[1,5]。在肿瘤细胞侵袭和转移过程中,黏着斑的形成促进细胞的黏附、迁移和侵入,并调节肿瘤细胞的增殖和凋亡,同时也调控肿瘤细胞微环境的变化^[6]。黏着斑相关信号通路的异常激活可以促进肿瘤细胞的侵袭和转移,并使肿瘤细胞对化疗和放疗等治疗手段产生耐受性^[7]。在血管内皮细胞和心肌细胞中,黏着斑的结构异常往往会引发心血管疾病的发生,如动脉粥样硬化、心肌梗死和心衰等^[8]。黏着斑结构和功能的紊乱还会影响骨细胞的功能和代谢,从而导致骨质疏松症的发生和发展^[9]。

在细胞运动和迁移过程中,黏着斑的结构需要不断地变化和重构(图1B)。在细胞运动时,细胞运动前端出现新生黏附结构(nascent adhesion)^[10],这些小的黏附结构(<1 μm)可以在几分钟内成熟为较大的黏着斑(几个 μm),为细胞提供支持,帮助细胞



A: HeLa细胞中黏着斑与微丝骨架的分布:微丝的末端连接到黏着斑上;绿色代表黏着斑,采用paxillin的抗体标记,红色代表微丝,采用phalloidin标记;B:细胞中黏着斑的模式示意图:红色线条代表微丝,绿色斑块表示黏着斑;细胞在运动过程中,细胞前端会不断地形成黏着斑并且成熟,而细胞后端的黏着斑会不断解聚;连接成熟的黏着斑之间的微丝聚集束成,形成应力纤维

图1 细胞黏着斑及模式示意图

在基质上行进; 同时, 这些新生黏附结构甚至成熟的黏着斑也可能发生退化或解聚, 从而调控细胞运动的方向和速度^[11]。因此, 研究黏着斑的动态变化, 包括黏着斑的形成、成熟、退化和解聚等, 对于理解黏着斑在生理和病理条件下如何发挥功能至关重要。本综述将重点介绍黏着斑的动态调控过程以及在其中发挥着重要功能的几个因素, 并对相关研究的未来发展进行展望。

1 黏着斑的组成及动态调控

在细胞运动中, 黏着斑的高度动态变化起着关键作用。黏着斑的动态变化通常发生在几分钟到几十分钟之间。在从新生到解离的整个过程中, 黏着斑的组分与细胞骨架的连接都发生了改变, 蛋白-蛋白相互作用、机械力以及相分离在其中扮演着重要的角色。

1.1 黏着斑的核心蛋白组分及相互作用

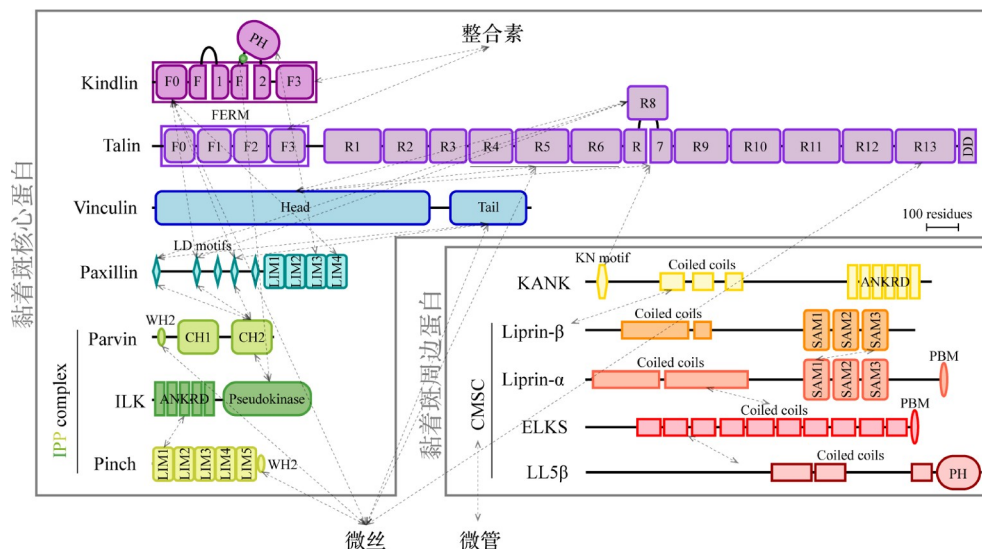
成熟黏着斑中已鉴定到的蛋白质大约有两百多种^[12,13]。这些蛋白质在黏着斑中的分布是高度有序的, 在靠近细胞膜的垂直方向上呈现出特定的分层结构^[14], 其中由黏着斑核心蛋白介导的大量蛋白-蛋白相互作用对于定位各类蛋白组分到达整合素附近起着重要的作用(图2)。

黏着斑的形成依赖于细胞膜上的整合素受体。整合素受体是由 α 亚基和 β 亚基组成的二聚体。在黏附结构形成之前, 整合素受体呈现自抑

制状态, 来自细胞内部或者外部的信号可以激活整合素。活化后的整合素通过其胞外结构域与细胞外基质紧密结合, 并发生集簇化聚集, 进一步增强整合素与细胞外多聚化基质的相互作用, 从而达到整合素的完全激活状态。同时, 在细胞内部, 整合素通过结合talin和kindlin这两个支架蛋白, 进一步招募IPP(ILK-PINCH-parvin)三元复合物、paxillin、vinculin等蛋白质, 介导黏着斑与细胞微丝骨架(F-actin)的动态连接(图2)。

1.1.1 Talin

在黏着斑的空间结构上, 靠近细胞膜的是与整合素受体直接结合的两类蛋白质——talin和kindlin。它们都包含FERM(4.1蛋白、Ezrin、Radixin和Moesin)结构域(图2), 分别和整合素 β 亚基胞内区域中的两个保守的“NPxY(N代表Asparagine, P代表Proline, x代表任意氨基酸, Y代表Tyrosine)”序列结合^[15]。Talin由氨基端的FERM结构域(头部区域)以及羧基端的十三个Rod结构域(尾部区域)组成, 头部与尾部区域折叠成自抑制的状态^[16]。结构生物学和生物化学研究表明, talin对于整合素的激活至关重要^[17]。当talin通过FERM结构域与整合素靠近跨膜区的第一个“NPxY”结合后, 整合素跨膜区发生异构调控, 影响整合素 α 亚基和 β 亚基的结合, 从而打开整合素的自抑制构象, 整合素与胞外基质的结合进一步加强。此外, talin的FERM结构域也可以与细胞



虚线表示已知的蛋白质之间的相互作用

图2 黏着斑中重要蛋白质的结构域示意图

膜上的磷脂分子结合,帮助talin锚定在整合素附近,促进整合素的激活和黏着斑的形成^[18]。

由于talin存在自抑制构象,talin自抑制的打开以及打开后的蛋白-蛋白相互作用必须受到精确的调控。其中,机械力发挥了重要的调控作用。新生黏着斑形成后,talin受机械力的作用,多个Rod结构域的螺旋束折叠被打开,暴露出vinculin以及微丝的结合位点,而vinculin的结合则进一步促进微丝骨架在黏着斑的聚集,从而介导黏着斑的成熟^[19]。最近的研究发现,talin在介导黏着斑解离的过程中也起着关键性作用(详情见下文1.2.1部分)。由此可见,在黏着斑的整个动态调控过程中,从早期的整合素活化到黏着斑的成熟,再到整合素的解聚,talin都是重要的调控因子。

1.1.2 Kindlin

Kindlin是最早定位到黏着斑的蛋白质之一,其家族成员包括kindlin1、kindlin2和kindlin3,它们在蛋白序列和结构域组成上具有高度相似性,但在不同的组织细胞中表达^[20]。Kindlin结合在整合素 β 亚基远离跨膜区的第二个“NPxY”。结构生物学研究表明,kindlin与整合素的相互作用还需要额外的“TTV”序列(Threonine-Threonine-Valine, 苏氨酸-苏氨酸-缬氨酸),解释了talin和kindlin能够分别与两个“NPxY”结合的结构机制^[21]。和talin不同,kindlin无法通过与整合素结合来改变整合素的构象,所以无法直接激活整合素受体。但kindlin可以与talin协同作用,通过促进整合素的集簇化来极大地提高整合素的激活效果^[22]。针对kindlin2的结构生物学研究提供了可能的分子机制解释,即kindlin的FERM结构域通过F2域互换的方式形成二聚体,二聚化的kindlin与整合素的结合可以聚集整合素,从而促进整合素的完全激活^[21]。

与talin的另一个不同之处在于,kindlin的FERM结构域的F2域中间特异性地插入了一个PH结构域(图2)。PH结构域是介导蛋白-磷脂相互作用的结构模块,细胞实验也表明,该结构域对于kindlin在黏着斑的定位和功能至关重要^[23]。这种结构域安排使得PH结构域与F2域之间的相对位置较近,且F2域互换可以影响PH结构域与F2域之间的相对位置,因此,膜结合和二聚化可能协同影响kindlin的功能发挥。在黏着斑的形成和成熟过程

中,kindlin通过与ILK(Integrin-linked kinase)结合,将IPP复合物带到整合素受体附近,从而在黏着斑的形成和成熟中发挥重要作用^[24]。有趣的是,ILK的结合位点位于PH与F2之间的连接区域^[25,26],提示ILK结合可能影响kindlin的膜结合或二聚化能力。近期的研究发现,kindlin还可以直接与微丝骨架结合,或与微丝调控蛋白 α -actinin结合,调控微丝骨架的形态,影响细胞的伸展等生理过程^[27,28]。因此,虽然和talin激活整合素的作用方式不同,kindlin同样在黏着斑的形成、成熟,以及与微丝骨架的连接这些黏着斑动态变化的不同阶段都起着至关重要的作用。

1.1.3 IPP复合物

IPP复合物由ILK、PINCH和parvin三种蛋白质组成(图2)。ILK包含Ankyrin Repeat结构域(ANKRD)和蛋白质激酶结构域。ILK的激酶结构域并不具备激酶活性^[29,30],被认为是伪激酶(pseudokinase),其主要功能是介导蛋白-蛋白之间的相互作用。PINCH家族蛋白(PINCH1和PINCH2)都由五个LIM(Lin11、Isl-1和Mec-3)结构域构成。Parvin家族包含 α 、 β 、 γ 三个成员,它们都包含两个CH(Calponin homology)结构域。ILK在介导IPP三元复合物的形成中发挥着核心蛋白的作用,它通过氨基端的ANKRD结合PINCH的第一个LIM结构域(LIM1),同时通过羧基端的伪激酶结构域与parvin的第二个CH结构域(CH2)结合^[31]。在IPP复合物中,ILK、PINCH和pavin还可以分别与多种激酶蛋白、信号分子以及微丝骨架调控因子相互作用。因此,IPP复合物通过介导这些相互作用,在黏着斑中发挥“信息中枢”的关键作用^[29]。IPP复合物中的大多数结构域都被报道参与了蛋白-蛋白相互作用,但是序列上高度保守的parvin的CH1结构域和PINCH的LIM2和LIM3结构域却还没有已知的结合蛋白,这些结构域在IPP复合物功能发挥中的作用还有待揭示。

ILK、PINCH和pavin被定位到黏着斑之前已经形成复合物,提示IPP复合物作为一个整体在黏着斑中发挥功能,但我们对于其作为整体能够发挥的功能还所知甚少。近期,Vaynberg等^[32]和我们的研究工作^[33]解释了IPP复合物的整体功能。形成三元复合物后,IPP通过位于PINCH羧基端和

parvin氨基端的两个WH2序列(WASP-homology-2 actin binding motifs)介导微丝骨架聚集成束(F-actin bundling), 形成应力纤维(stress fiber), 从而加强黏着斑与微丝骨架的连接, 调控细胞的伸展和迁移等过程。而单一的WH2序列无法介导微丝骨架的成束, 证实了三种蛋白质形成复合物的必要性。IPP复合物对于微丝骨架的调节同时也受到精确的调控。*Rsu1*(Ras suppressor 1)作为重要的癌症相关基因, 通过结合PINCH1的LIM5结构域及WH2序列, 影响WH2序列与微丝的结合, 从而抑制IPP复合物聚合微丝的能力, 影响应力纤维的形成, 实现对微丝骨架动态变化的精确调控, 从而在癌细胞的迁移和增殖中发挥作用^[33]。

1.1.4 Paxillin

Paxillin是黏着斑中的重要支架蛋白之一, 包含氨基端的五个LD序列(含亮氨酸和天冬氨酸序列)和羧基端的四个LIM结构域。Paxillin可以与黏着斑中的众多蛋白质结合, 特别是靠近细胞膜构成黏着斑结构的核心组分talins、kindlins及IPP复合物(图2)。Paxillin与talins和kindlins有着复杂的相互作用关系, 涉及多个结合位点, 包括LIM结构域和LD序列^[34-39]。由于paxillin可以同时和talins以及kindlins相互作用, 其在talins和kindlins激活整合素的过程中发挥重要的功能^[40]。同时, paxillin的LD序列可以与pavins的CH2结构域结合^[41,42], 增强IPP复合物在黏着斑中的定位。

除了与黏着斑的结构组分相互作用外, paxillin还与多个重要的信号通路分子相互作用, 主要通过LD序列来介导。例如, paxillin的LD2和LD4与GIT1(GPCR kinase-interacting protein 1)结合^[43], 参与黏着斑的降解过程。而paxillin的多个LD序列可以与FAK激酶(focal adhesion kinase)结合^[44]。FAK和Src等络氨酸激酶可以磷酸化paxillin, 使paxillin结合vinculin, 增加微丝骨架与黏着斑的连接, 促进黏着斑的成熟^[45]。Paxillin上由络氨酸磷酸化位点往往位于LD序列之间的无序结构区, 这些区域如何参与paxillin在黏着斑的功能发挥还缺乏机制上的解释。鉴于paxillin与多种蛋白质之间复杂的相互作用关系及其与黏着斑的动态变化之间的重要联系, 对于paxillin介导的蛋白-蛋白相互作用的调控机制研究还有待进一步

深入。

1.2 黏着斑中的细胞骨架与黏着斑周边蛋白

细胞骨架在黏着斑的动态调控中起着重要作用。黏着斑的形成需要微丝骨架与黏着斑密切连接, 并且在微丝上由肌球蛋白分子产生的机械力增大时, 黏着斑才能成熟^[11]。在黏着斑中, 多种蛋白质与微丝相互作用, 包括vinculin、talins、 α -actinin和zyxin/VASP等^[2,14], 调节微丝的聚合和聚集, 从而增加黏着斑上的机械力。黏着斑中的蛋白质分子与微丝骨架的连接并非单一方式, 而是形成复杂的相互作用网络, 受到多重调控。IPP复合物和kindlins也与微丝骨架结合。这些黏着斑核心蛋白质通过调控微丝的聚合和聚集过程, 进一步影响应力纤维的结构, 改变黏着斑上的机械力, 调节蛋白构象和相互作用, 从而介导黏着斑的成熟和形态变化等动态过程, 影响细胞的伸展和运动^[28,32]。关于机械力在黏着斑动态调控中的作用将在下文1.4部分详细阐述。

除了微丝骨架之外, 微管系统对于黏着斑的动态变化过程同样发挥着重要作用。黏着斑周围的微管, 一方面影响微丝骨架在黏着斑附近的结构, 破坏黏着斑的稳定性; 另一方面介导黏着斑中的整合素受体发生内吞作用, 导致黏着斑的解聚。目前认为微管通过附着于黏着斑周边的皮层微管稳定复合物(cortical microtubule stabilizing complex, CMSC)和KANK蛋白来定位到黏着斑(图2), 并参与黏着斑结构的动态调控, 特别是黏着斑的解聚过程。

1.2.1 KANK

KANK(kidney ankyrin repeat-containing protein)家族蛋白能够定位微管到黏着斑周围, 调控黏着斑的动态结构。KANK家族蛋白包含四个成员, 具有相似的结构域组成(图2)。近期的研究表明, KANK特异性地定位在黏着斑核心区域周围, 形成围绕黏着斑的带状区域^[46,47]。KANK的氨基端含有一个特殊的KN(KANK N-terminus)序列, 该序列能够与talins结合, 对KANK的黏着斑定位至关重要, 删除KN序列后的KANK无法围绕在黏着斑周围。同时, KANK与talins的结合能够影响talins结合微丝的能力, 促进黏着斑的解聚^[47]。

作为支架蛋白, KANK通过其卷曲螺旋

(coiled-coil, CC)区域与CMSC的组分蛋白liprin- β 结合,协助CMSC和微管定位到黏着斑周围^[47]。此外,KANK还可以通过其羧基端的ANKRD与微管马达蛋白KIF21A结合。由于KIF21A可以直接与微管结合,使得KANK在微管的定位中发挥着重要作用。我们最近的研究发现,能够引发肾病综合征的KANK蛋白的突变(S684F)不直接影响KANK和KIF21A的结合能力,而是使KANK的ANKRD获得了结合其他胞质蛋白的病理功能,从而竞争KANK与KIF21A的生理性结合,引起肾足细胞内黏着斑和细胞骨架的紊乱^[48]。这项研究进一步说明了KANK与KIF21A的相互作用对于黏着斑和应力纤维形成的重要性。

因此,KANK一方面通过与talin结合影响微丝骨架与黏着斑的连接,另一方面通过与CMSC的相互作用连接微管骨架,从而在黏着斑中作为连接两类细胞骨架的枢纽,调控着黏着斑的稳定和解聚。

1.2.2 CMSC

CMSC介导微管结构定位到黏着斑,帮助黏着斑解聚^[49]。CMSC由包括liprin- α 、liprin- β 、ELKS、LL5 β 在内的多种支架蛋白共同组成(图2)。ELKS是CMSC中的关键组分之一,含有大量的卷曲螺旋区域。ELKS可以与LL5 β 结合,并通过LL5 β 与微管末端蛋白CLASP的相互作用,将微管连接到CMSC复合物上。同时,LL5 β 可以通过其PH结构域与磷脂相互作用,将CMSC带到细胞皮层附近。Liprin- α 和liprin- β 同属于liprin家族成员,由氨基端的卷曲螺旋区域和羧基端的三个连续的SAM(sterile α motif)结构域构成。两类liprin蛋白可以通过它们的SAM结构域相互结合形成liprin- α/β 复合物,参与黏着斑的解聚过程^[50]。通过liprin- β 和KANK的结合,以及liprin- α 的卷曲螺旋区域和ELKS的相互作用, liprin- α/β 复合物协助CMSC以及微管定位到黏着斑附近。由于目前CMSC相关的研究还十分有限,对于CMSC如何控制微管在黏着斑上的锚定和解离都还有待进一步解释。

值得一提的是,CMSC中的多个组分蛋白,包括liprin- α 和ELKS,也是神经突触前膜活性区(active zone)的重要组成蛋白,在控制钙离子依赖的神经递质囊泡释放过程中发挥重要的作用。由于CMSC被发现是细胞中的囊泡释放位点^[51],

CMSC可能利用liprin- α 和ELKS来实现囊泡的释放。此外,CMSC稳定的微管结构可以为黏着斑的形成和解离提供物质运输通道。已有研究报道,在整合素和纤连蛋白(fibronectin)的内吞过程中, liprin家族蛋白扮演了重要角色^[50]。因此,借鉴触前膜活性区相关蛋白的研究,可以更好地促进对于黏着斑结构中这一特殊复合物CMSC功能的理解。

1.3 液-液相分离与黏着斑的动态结构

黏着斑是细胞中一类独特的无膜包裹的细胞结构。有膜细胞器通过膜结构将特定功能的细胞组分包裹起来,解决了细胞内物质在时间和空间上的聚集问题,从而发挥特定功能。而在细胞内存在大量无膜包裹的细胞结构,如核仁、增殖细胞细胞核中的卡哈尔体(Cajal body)、应激颗粒(stress granule)等。这些结构虽然没有细胞膜包裹,但是在细胞质中能够稳定存在,并且与周围环境进行快速的分子交换。它们为什么能稳定存在并且发挥功能,这些结构的物理化学本质是什么,这些问题困扰了细胞生物学界多年。而近年来提出的相分离机制,为此类无膜细胞结构的形成和维持提供了理论解释^[52,53]。液-液相分离现象是由于蛋白质或者核酸分子通过多价相互作用,在原本均一的溶液中产生不同理化性质的另一相,形成聚集,因此也被称为生物大分子凝聚体(biomolecular condensates)^[54]。

1.3.1 相分离与黏着斑形成

黏着斑结构动态变化的时间尺度在分钟级别,单纯的扩散效应难以在短时间内实现黏着斑结构的动态转换,而相分离可以在这一时间尺度内完成多种蛋白的聚集和解离。另外,黏着斑中的关键蛋白包括talin、kindlin和整合素,它们之间的相互作用较弱。例如, talin与整合素相互作用的解离常数大约几百个 μM , kindlin与整合素形成复合物的解离常数也只有十几 μM 。这些弱相互作用如何介导talin、kindlin与整合素受体的稳定结合来保障机械力的传递?而相分离的形成依赖的是多价态的弱相互作用,可以由连续的多个结构域之间的相互作用介导,或者无序区域(intrinsic disorder region, IDR)介导形成^[55,56]。这些现象都显示,相分离机制很可能是黏着斑动态结构的形成基础。

黏着斑形成中,相分离所需的多价态相互作

用如何实现? 由于talín和kindlin都可以通过特定结构域形成二聚体, 而且整合素受体在细胞外基质多价配体的作用下也可以发生聚集。因此, talín和kindlin与整合素都可以实现多价态的弱相互作用而促进液-液相分离的发生; 通过相分离的发生, 整合素受体可以快速地在细胞膜上聚集, 并且通过talín和kindlin来进一步富集黏着斑中其他的核心蛋白分子以及微丝骨架, 从而快速地形成黏着斑。这些假设与部分研究工作相吻合(bioRxiv: <https://doi.org/10.1101/2020.07.10.197400>和<https://doi.org/10.1101/2023.03.31.535113>)。

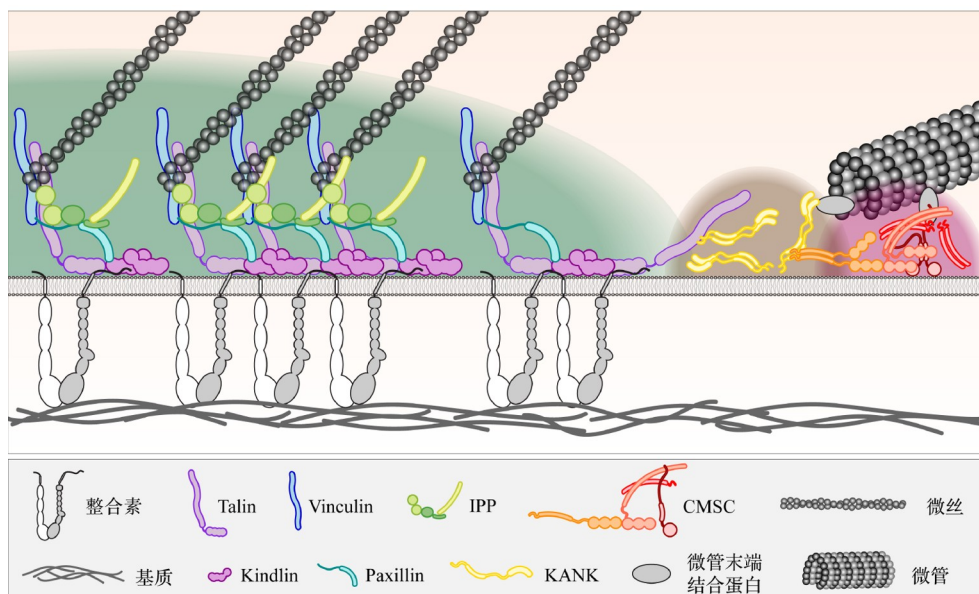
此外, paxillin包含五个LD区域和四个LIM结构域, 这些蛋白-蛋白相互作用模块提供了多价态结合的基础, 提示paxillin也可能参与黏着斑中相分离的发生。近期多个研究成果表明, paxillin可以与PIX/GIT1、FAK、talín发生共相分离^[57,58] (bioRxiv: <https://doi.org/10.1101/2022.12.17.520852>), 参与黏着斑的动态调控。有趣的是, paxillin的磷酸化状态影响着黏着斑的形成和解聚。磷酸化被认为是调控相分离的发生和决定蛋白质凝聚体性质的重要方式之一^[59]。因此, 鉴于paxillin在黏着斑中与多种蛋白质之间存在复杂的相互作用, 并参与多种蛋白质凝聚体的形成, paxillin的磷酸化可能通过调控不同凝聚体的物理性质及凝聚体之

间的相互作用方式, 在调控黏着斑的动态过程中发挥多重功能。同时, FAK、Src等激酶在不同性质的黏着斑蛋白质凝聚体中的活性可能发生变化, 使黏着斑相关的信号传递通路更加高效、动态。

1.3.2 黏着斑内部精细结构组装中的相分离机制

超高分辨率的光学显微镜观察结果显示, 黏着斑具有有序的分层结构。在垂直于细胞膜的方向上, 黏着斑核心区域约为40纳米, 由多个特定蛋白质层构成(图3): 贴近细胞膜的整合素信号层包含整合素胞内羧基端区域、FAK和paxillin; 中间的机械力传递层包含talín和vinculin; 上方的微丝骨架调节层包含zyxin、血管扩张剂诱导的磷酸化蛋白(VASP)和 α -actinin。黏着斑蛋白如何通过复杂的相互作用形成这些精细的分层结构? 最近, 针对核仁的研究显示, 相分离的发生在形成有序的分层结构中起着关键性的作用^[60]。然而, 对于黏着斑分层结构形成是否需要相分离机制的参与仍需进一步的研究来揭示。

在黏着斑内部核心区域的每一层中, 各蛋白质组分也不是以均一形式分布, 而是存在区域化的分布, 形成大小不一的“小岛”结构^[61]。例如, 磷酸化的paxillin和FAK在黏着斑中形成聚集的斑块结构^[62]。而在黏着斑外围, KANK围绕黏着斑的核心呈现环状化分布, 而CMSC则以点状聚集形式



在黏着斑核心区域, 蛋白质呈现分层分布的特点。在黏着斑的核心区域(绿色背景)和黏着斑周围(棕色和紫色背景), 蛋白质通过发生液-液相分离形成的凝聚体, 是黏着斑动态调控的分子基础

图3 黏着斑的分层结构模式图

附着于KANK环状结构周围(图3)。这些观察结果仅从蛋白-蛋白相互作用的角度无法解释。KANK与talins之间的相互作用无法说明为什么仅含有KN序列的片段蛋白可以进入黏着斑的核心区域,而KANK全长蛋白却能够形成特定的带状分布。我们推测,KANK可能通过相分离形成的凝聚体与黏着斑核心区域的凝聚体相互作用,形成特殊的“包裹”结构。蛋白质相互作用导致KANK凝聚体定位在黏着斑核心区域的外围,而不同凝聚体之间的性质差异使KANK凝聚体无法与核心区域的凝聚体相混合。KANK凝聚体的形成既限制了黏着斑的大小和形态,防止其不受控地增长;也为定位于黏着斑周围的CMSC提供支撑,防止微管不受控制地伸入黏着斑核心区域。因此,我们认为黏着斑中的蛋白质可能通过形成不同类型的相分离模块,从而迅速、有序地组装形成多层次不均匀结构。同样,相分离机制也有助于这些结构快速有效地解聚。

1.3.3 相分离调控黏着斑与细胞骨架连接

除了黏着斑形成的核心区域,在黏着斑与微丝骨架连接的过程中,talin、kindlin和paxillin都可以通过直接或间接的方式与微丝骨架相互作用。这些黏着斑核心蛋白的相分离可能在调控黏着斑中的微丝骨架的生长和聚集等过程中发挥作用。此外,LIMD1蛋白可以通过液-液相分离来募集微丝结合蛋白zyxin和VASP,加强黏着斑附近微丝骨架的形成^[63]。

在CMSC中,ELKS也可以发生液-液相分离。在神经细胞的突触前膜结构中,liprin- α 通过与ELKS的相互作用,调控ELKS形成的凝聚体的物理学性质,并控制突出前膜上钙离子通道的分布,从而实现突出前膜神经递质囊泡释放的精准定位^[64-66]。在黏着斑结构中,ELKS和liprin- α 的相分离可能在微管定位到黏着斑附近也有着重要的调控功能。微管末端蛋白EB和CLIP已被报道可以在微管上发生液-液相分离^[67-69],这些微管末端蛋白的相分离可能与CMSC的相分离共同参与微管定位到黏着斑附近。此外,我们最新的研究发现,ELKS凝聚体参与调控Rab6标记的囊泡释放,表明CMSC相分离可能在细胞骨架介导的囊泡运输中起关键作用^[70]。

1.4 机械力的感知与黏着斑结构的动态变化

在黏着斑的动态变化过程中,机械力的作用不可忽略。力可以改变蛋白质分子的构象,调控蛋白质之间的相互作用。黏着斑的成熟过程依赖于机械力的增加,而在消除或解聚过程中,黏着斑受到的机械力减弱。在众多黏着斑蛋白中,talin是目前研究最为清晰的机械力感应蛋白^[19,71]。Talin的头部通过整合素与细胞外基质以及细胞膜连接被固定,而其尾部通过vinculin或者直接与微丝骨架结合。当微丝上的马达蛋白运动时,会产生机械力拉伸talin。研究人员利用单分子磁镊技术针对talin的十三个Rod结构域进行研究,发现这些结构域对于机械力的响应大不相同。大约5皮牛(pN)的机械力可以将R3结构域去折叠,而R9结构域在大于15皮牛的情况下依然保持折叠状态^[72]。Talin在黏着斑中的平均受力水平在5~10皮牛的范围内。像汽车的“离合器”一样,受力时,talin的多个rod结构域被打开并与vinculin和微丝结合,增强微丝骨架与黏着斑的连接。同时,机械力通过talin传递到整合素,调控整合素的构象,增强其与细胞外基质结合的活性^[73]。KANK与talin的相互作用也受机械力的调控。在黏着斑周围,机械力较小,KANK与talin可以形成稳定的复合物;而在黏着斑核心区域,机械力较大,可能破坏talin上与KANK结合的R7结构域的折叠,使KANK无法与talin结合^[46,74]。

黏着斑中的其他一些蛋白质也被发现可能是机械力感应蛋白。在生理状态下,机械力可以破坏FAK的FERM结构域与激酶结构域之间的自抑制结合,促进FAK的磷酸化和激活^[75]。同时,FAK可以感知细胞外基质的硬度,其磷酸化水平与细胞外基质的硬度呈线性相关。因此,机械力通过调控FAK的活性和下游信号通路,对细胞的运动和组织的修复过程产生重要影响。在这一过程中,talin和vinculin可以通过与FAK的相互作用,将机械力的信号转化为FAK的信号通路^[76]。IPP复合物也可以感知机械力的信号来减少黏着斑的消除^[77]。另外,kindlin也被报道可以感知细胞外基质的硬度。在较硬的细胞外基质环境下,kindlin通过结合脯氨酸合成酶PYCR1,定位到线粒体中,参与细胞代谢和增殖^[78]。在骨骼细胞中,kindlin2对于维持骨骼对机械刺激的反应起着不可或缺的作用^[79]。基

于kindlin2蛋白质的三维结构, 分子动力学模拟显示, kindlin2在机械力的作用下可以通过F2域的打开而形成二聚体, 并加强与整合素的相互作用, 从而促进黏着斑的形成^[80]。由于PH结构域以及ILK结合位点都插入F2域的中间(图2), 机械力是否会影响kindlin与IPP复合物以及与细胞膜的结合仍有待进一步研究。需要指出的是, 由于缺乏单分子力学分析的实验证据, 除talin之外的黏着斑蛋白的机械力感应机制还不清楚。

2 黏着斑动态结构研究的未来

过去数十年的研究使我们对于黏着斑的功能和结构有了深刻的认识, 特别是黏着斑的动态结构调控过程中蛋白质的组成及它们之间的相互作用。但是这些相互作用错综复杂的蛋白质, 如何在时间和空间上发生动态变化, 形成一个有序、分层的黏着斑整体结构, 我们的了解还十分有限。在未来的研究中, 黏着斑动态结构的研究需要时间分辨率和空间分辨率上更加精准的观察和分析手段。

2.1 超分辨显微技术

超分辨显微技术的应用使人们认识到黏着斑的结构是高度有序、分层和分区的。许多组成黏着斑的蛋白质分子在黏着斑中具有特定的定位和朝向。例如, 通过定位带有氨基和羧基标记的talin, 研究人员揭示了talin在黏着斑中的定位方向^[14]。2015年, Case等^[81]利用该技术呈现了vinculin在黏着斑中不同区域的构象, 即非活性的vinculin通过结合磷酸化的paxillin定位于黏着斑的下层整合素信号层; 而talin结合活化vinculin定位于黏着斑的更高层, 使vinculin直接参与微丝骨架的逆向流动。

除了talin和vinculin之外, 其他黏着斑蛋白的分层及内部细微结构也急需完善。因此, 开发和采用更加优化的超分辨显微成像方法, 同时结合计算机深度学习神经网络模型, 以更低的激光功率、更快的成像速度、更长的成像时程和更高的分辨率来观测黏着斑内的精细结构, 有希望观察到黏着斑中各类蛋白质更为精细的结构特征^[82]。此外, 使用活细胞成像技术, 提高灵敏度、降低光毒性, 优化显微成像的算法, 可以在更长的时间范围内获得黏着斑在高时间分辨率情况下的动态变化信息^[83]。

2.2 冷冻电子断层成像技术

冷冻电子断层成像技术(cryo-electron tomography, cryo-ET)被广泛用于研究亚细胞结构, 并提供接近原子分辨率的信息。在对黏着斑结构进行的研究中, cryo-ET技术可以直接观察到黏着斑的三维结构和组成, 包括细胞外基质与细胞内的连接结构、黏着斑蛋白在不同分层及区域化中的定位和定向、不同成熟阶段黏着斑结构的变化。与纯化蛋白在体外重构各种黏着斑复合物相比, cryo-ET技术可以直接观察生理条件下黏着斑的结构, 在三维培养体系下细胞形成的黏着斑或者动物组织样品中细胞含有的黏着斑。此外, 对比正常组织和病变组织中黏着斑具体结构和组成的异同, 可以在原子水平上深入了解黏着斑中导致相关疾病发生的蛋白质分子的变化, 从而破解疾病发生机制。

然而, 在应用cryo-ET技术研究黏着斑的结构中也面临一些挑战。由于黏着斑的动态性质, 导致黏着斑结构在大小和形态上存在不均一性。因此, 在采集图像时如何准确定位黏着斑, 并在图像分析中对黏着斑中不同的蛋白质进行甄别存在一定的困难。为了克服这些技术挑战, 需要采取一系列的措施。例如, 优化细胞在载网上的生长条件, 促进明显的黏着斑形成; 另外, 可以使用荧光标记黏着斑中特定的蛋白质, 并结合光学显微镜和电子显微镜技术来选取具有相同成熟程度的黏着斑。

2.3 相分离研究方法

采用超分辨显微镜以及cryo-ET技术可以更加精准地从微观尺度观察到黏着斑动态调控过程中的时间和空间上蛋白质的变化, 而相分离机制可以从更高维度的介观尺度上解释这种动态变化的机理。目前大量研究报道了多种黏着斑核心组分通过发生相分离, 富集黏着斑中的蛋白质组分, 调控黏着斑的形成、成熟和解聚等过程, 以及参与建立黏着斑与细胞骨架的连接。但是, 这些蛋白质发生相分离形成的凝聚体之间的相互作用是怎样的? 这些凝聚体如何参与构建黏着斑内部分层及区域化的形成? 定向存在的talin、paxillin和vinculin如何在不同凝聚体内存在? 它们在联系和调控不同凝聚体来实现黏着斑动态变化的过程

中,起着什么作用?为了回答这些问题,研究者可以体外重构多组分的黏着斑相分离体系,并研究不同相之间的相互作用关系,这些研究将加深人们对于黏着斑动态调控的分子机理的理解。这需要有更直接的方法在细胞中观察相分离现象。结合超高分辨显微镜技术和cryo-ET技术,可能可以实现细胞内观察相分离的现象,以及影响相分离的突变对于黏着斑动态调控和功能的影响。利用相分离研究方法研究黏着斑中蛋白质激酶FAK、Src等活性的相分离调控机制,也将从一个新的角度帮助我们理解黏着斑相关信号通路的调控机制。

此外,开发新的相分离技术将有助于研究黏着斑和其他亚细胞结构之间的相互作用,包括黏着斑与细胞膜、黏着斑与微丝骨架及微管骨架间的相互调控。一个可能的技术手段是采用光镊技术,利用该技术来控制蛋白质凝聚体,可以研究机械力在黏着斑中相分离调控中的作用。

黏着斑是细胞的“脚步”,黏着斑中的蛋白质分子在机械力的调控下,通过蛋白质相互作用以及相分离的发生,和细胞膜、细胞骨架一起发生着动态又有序的生命活动。随着科研工作者研究黏着斑脚步的进展,我们对黏着斑结构和功能的认识也将更加深入,这将有力地支撑对黏着斑异常相关疾病发生机制的阐释,为这些疾病的治疗提供新思路和新方法。

参考文献

- [1] Winograd-Katz SE, Fässler R, Geiger B, et al. The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(4): 273-288
- [2] Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(9): 633-643
- [3] Hynes RO. Integrins. *Cell*, 2002, 110(6): 673-687
- [4] Iwamoto DV, Calderwood DA. Regulation of integrin-mediated adhesions. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 36: 41-47
- [5] Jaalouk DE, Lammerding J. Mechanotransduction gone awry. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(1): 63-73
- [6] Janiszewska M, Primi MC, Izard T. Cell adhesion in cancer: beyond the migration of single cells. *J Biol Chem*, 2020, 295(8): 2495-2505
- [7] Eke I, Cordes N. Focal adhesion signaling and therapy resistance in cancer. *Semin Cancer Biol*, 2015, 31: 65-75
- [8] Samarel AM. Focal adhesion signaling in heart failure. *Pflugers Arch Eur J Physiol*, 2014, 466(6): 1101-1111
- [9] Chen S, He T, Zhong Y, et al. Roles of focal adhesion proteins in skeleton and diseases. *Acta Pharmaceutica Sin B*, 2023, 13(3): 998-1013
- [10] Sun Z, Lambacher A, Fässler R. Nascent adhesions: from fluctuations to a hierarchical organization. *Curr Biol*, 2014, 24(17): R801-R803
- [11] Gardel ML, Schneider IC, Aratyn-Schaus Y, et al. Mechanical integration of Actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2010, 26(1): 315-333
- [12] Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, et al. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(8): 858-867
- [13] Horton ER, Byron A, Askari JA, et al. Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(12): 1577-1587
- [14] Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera AM, et al. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*, 2010, 468(7323): 580-584
- [15] Calderwood DA, Campbell ID, Critchley DR. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(8): 503-517
- [16] Dedden D, Schumacher S, Kelley CF, et al. The architecture of talin1 reveals an autoinhibition mechanism. *Cell*, 2019, 179(1): 120-131.e13
- [17] Wegener KL, Partridge AW, Han J, et al. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell*, 2007, 128(1): 171-182
- [18] Chinthalapudi K, Rangarajan ES, Izard T. The interaction of talin with the cell membrane is essential for integrin activation and focal adhesion formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(41): 10339-10344
- [19] del Rio A, Perez-Jimenez R, Liu R, et al. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science*, 2009, 323(5914): 638-641
- [20] Karaköse E, Schiller HB, Fässler R. The kindlins at a glance. *J Cell Sci*, 2010, 123(14): 2353-2356
- [21] Li H, Deng Y, Sun K, et al. Structural basis of kindlin-mediated integrin recognition and activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(35): 9349-9354
- [22] Ye F, Petrich BG, Anekal P, et al. The Mechanism of Kindlin-mediated activation of integrin α IIb β 3. *Curr Biol*, 2013, 23(22): 2288-2295
- [23] Liu Y, Zhu Y, Ye S, et al. Crystal structure of kindlin-2 PH domain reveals a conformational transition for its membrane anchoring and regulation of integrin activation. *Protein Cell*, 2012, 3(6): 434-440
- [24] Bachir AI, Zareno J, Moissoglu K, et al. Integrin-associated complexes form hierarchically with variable

- stoichiometry in nascent adhesions. *Curr Biol*, 2014, 24(16): 1845-1853
- [25] 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(41): 28363-28375
- [26] Qadota H, Moerman DG, Benian GM. A Molecular mechanism for the requirement of PAT-4 (Integrin-linked kinase (ILK)) for the localization of UNC-112 (Kindlin) to integrin adhesion sites. *J Biol Chem*, 2012, 287(34): 28537-28551
- [27] Qi L, Yu Y, Chi X, et al. Kindlin-2 interacts with α -actinin-2 and β 1 integrin to maintain the integrity of the Z-disc in cardiac muscles. *FEBS Lett*, 2015, 589(16): 2155-2162
- [28] Bledzka K, Bialkowska K, Sossey-Alaoui K, et al. Kindlin-2 directly binds actin and regulates integrin outside-in signaling. *J Cell Biol*, 2016, 213(1): 97-108
- [29] Qin J, Wu C. ILK: a pseudokinase in the center stage of cell-matrix adhesion and signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 2012, 24(5): 607-613
- [30] Fukuda K, Gupta S, Chen K, et al. The pseudoactive site of ILK is essential for its binding to α -Parvin and localization to focal adhesions. *Mol Cell*, 2009, 36(5): 819-830
- [31] Legate KR, Montañez E, Kudlacek O, et al. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(1): 20-31
- [32] Vaynberg J, Fukuda K, Lu F, et al. Non-catalytic signaling by pseudokinase ILK for regulating cell adhesion. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4465
- [33] Yang H, Lin L, Sun K, et al. Complex structures of Rsl1 and PINCH1 reveal a regulatory mechanism of the ILK/PINCH/Parvin complex for F-actin dynamics. *Elife*, 2021, 10: e64395
- [34] Theodosiou M, Widmaier M, Böttcher RT, et al. Kindlin-2 cooperates with talin to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. *Elife*, 2016, 5: e10130
- [35] Gao J, Huang M, Lai J, et al. Kindlin supports platelet integrin α IIb β 3 activation by interacting with paxillin. *J Cell Sci*, 2017, 130(21): 3764-3775
- [36] Böttcher RT, Veelders M, Rombaut P, et al. Kindlin-2 recruits paxillin and Arp2/3 to promote membrane protrusions during initial cell spreading. *J Cell Biol*, 2017, 216(11): 3785-3798
- [37] Ripamonti M, Wehrle-Haller B, de Curtis I. Paxillin: a hub for mechano-transduction from the β 3 integrin-Talin-Kindlin axis. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 852016
- [38] Ripamonti M, Liaudet N, Azizi L, et al. Structural and functional analysis of LIM domain-dependent recruitment of paxillin to α v β 3 integrin-positive focal adhesions. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 380
- [39] Zhu L, Liu H, Lu F, et al. Structural basis of paxillin recruitment by kindlin-2 in regulating cell adhesion. *Structure*, 2019, 27(11): 1686-1697.e5
- [40] Lu F, Zhu L, Bromberger T, et al. Mechanism of integrin activation by talin and its cooperation with kindlin. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2362
- [41] Lorenz S, Vakonakis I, Lowe ED, et al. Structural analysis of the interactions between paxillin LD motifs and α -parvin. *Structure*, 2008, 16(10): 1521-1531
- [42] Stiegler AL, Draheim KM, Li X, et al. Structural basis for paxillin binding and focal adhesion targeting of β -parvin. *J Biol Chem*, 2012, 287(39): 32566-32577
- [43] Nayal A, Webb DJ, Brown CM, et al. Paxillin phosphorylation at Ser273 localizes a GIT1-PIX-PAK complex and regulates adhesion and protrusion dynamics. *J Cell Biol*, 2006, 173(4): 587-589
- [44] Hoellerer MK, Noble MEM, Labesse G, et al. Molecular recognition of paxillin LD motifs by the focal adhesion targeting domain. *Structure*, 2003, 11(10): 1207-1217
- [45] Pasapera AM, Schneider IC, Rericha E, et al. Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through FAK-mediated paxillin phosphorylation. *J Cell Biol*, 2010, 188(6): 877-890
- [46] Sun Z, Tseng HY, Tan S, et al. Kank2 activates talin, reduces force transduction across integrins and induces central adhesion formation. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(9): 941-953
- [47] Bouchet BP, Gough RE, Ammon YC, et al. Talin-KANK1 interaction controls the recruitment of cortical microtubule stabilizing complexes to focal adhesions. *Elife*, 2016, 5: e18124
- [48] Xu Y, Guo C, Pan W, et al. Nephrotic-syndrome-associated mutation of KANK2 induces pathologic binding competition with physiological interactor KIF21A. *J Biol Chem*, 2021, 297(2): 100958
- [49] Noordstra I, Akhmanova A. Linking cortical microtubule attachment and exocytosis. *Fl000Res*, 2017, 6: 469
- [50] Mana G, Clapero F, Panieri E, et al. PPFIA1 drives active α 5 β 1 integrin recycling and controls fibronectin fibrillogenesis and vascular morphogenesis. *Nat Commun*, 2016, 7(1): 13546
- [51] Grigoriev I, Yu KL, Martinez-Sanchez E, et al. Rab6, Rab8, and MICAL3 cooperate in controlling docking and fusion of exocytotic carriers. *Curr Biol*, 2011, 21(11): 967-974
- [52] Banani SF, Lee HO, Hyman AA, et al. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(5): 285-298
- [53] Shin Y and Brangwynne CP. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*, 2017, 357(6357):
- [54] Alberti S, Gladfelter A, Mittag T. Considerations and challenges in studying liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates. *Cell*, 2019, 176(3): 419-434

- [55] Li P, Banjade S, Cheng HC, et al. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature*, 2012, 483(7389): 336-340
- [56] Pak CW, Kosno M, Holehouse AS, et al. Sequence determinants of intracellular phase separation by complex coacervation of a disordered protein. *Mol Cell*, 2016, 63(1): 72-85
- [57] Zhu J, Zhou Q, Xia Y, et al. GIT/PIX condensates are modular and ideal for distinct compartmentalized cell signaling. *Mol Cell*, 2020, 79(5): 782-796.e6
- [58] Case LB, De Pasquale M, Henry L, et al. Synergistic phase separation of two pathways promotes integrin clustering and nascent adhesion formation. *Elife*, 2022, 11: e72588
- [59] Li J, Zhang M, Ma W, et al. Post-translational modifications in liquid-liquid phase separation: a comprehensive review. *Mol Biomed*, 2022, 3(1): 13
- [60] Shan L, Xu G, Yao RW, et al. Nucleolar URB1 ensures 3' ETS rRNA removal to prevent exosome surveillance. *Nature*, 2023, 615(7952): 526-534
- [61] Fujiwara TK, Tsunoyama TA, Takeuchi S, et al. Ultrafast single-molecule imaging reveals focal adhesion nano-architecture and molecular dynamics. *J Cell Biol*, 2023, 222(8): e202110162
- [62] Bachmann M, Skripka A, Weißenbruch K, et al. Phosphorylated paxillin and phosphorylated FAK constitute subregions within focal adhesions. *J Cell Sci*, 2022, 135(7): jcs258764
- [63] Wang Y, Zhang C, Yang W, et al. LIMD1 phase separation contributes to cellular mechanics and durotaxis by regulating focal adhesion dynamics in response to force. *Dev Cell*, 2021, 56(9): 1313-1325
- [64] McDonald NA, Fetter RD, Shen K. Assembly of synaptic active zones requires phase separation of scaffold molecules. *Nature*, 2020, 588(7838): 454-458
- [65] Liang M, Jin G, Xie X, et al. Oligomerized liprin- α promotes phase separation of ELKS for compartmentalization of presynaptic active zone proteins. *Cell Rep*, 2021, 34(12): 108901
- [66] Emperador-Melero J, Wong MY, Wang SSH, et al. PKC-phosphorylation of Liprin- α 3 triggers phase separation and controls presynaptic active zone structure. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3057
- [67] Song X, Yang F, Yang T, et al. Phase separation of EB1 guides microtubule plus-end dynamics. *Nat Cell Biol*, 2023, 25(1): 79-91
- [68] Wu YO, Bryant AT, Nelson NT, et al. Overexpression of the microtubule-binding protein CLIP-170 induces a +TIP network superstructure consistent with a biomolecular condensate. *PLoS One*, 2021, 16(12): e0260401
- [69] Meier SM, Farcas AM, Kumar A, et al. Multivalency ensures persistence of a +TIP body at specialized microtubule ends. *Nat Cell Biol*, 2023, 25(1): 56-67
- [70] Jin G, Lin L, Li K, et al. Structural basis of ELKS/Rab6B interaction and its role in vesicle capturing enhanced by liquid-liquid phase separation. *J Biol Chem*, 2023: 104808
- [71] Yan J, Yao M, Goult BT, et al. Talin dependent mechanosensitivity of cell focal adhesions. *Cel Mol Bioeng*, 2015, 8(1): 151-159
- [72] Yao M, Goult BT, Klapholz B, et al. The mechanical response of talin. *Nat Commun*, 2016, 7(1): 11966
- [73] Sun Z, Costell M, Fässler R. Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1): 25-31
- [74] Yu M, Le S, Ammon YC, et al. Force-dependent regulation of Talin-KANK1 complex at focal adhesions. *Nano Lett*, 2019, 19(9): 5982-5990
- [75] Bauer MS, Baumann F, Daday C, et al. Structural and mechanistic insights into mechanoactivation of focal adhesion kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(14): 6766-6774
- [76] Zhou DW, Fernández-Yagüe MA, Holland EN, et al. Force-FAK signaling coupling at individual focal adhesions coordinates mechanosensing and microtissue repair. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2359
- [77] Vakaloglou KM, Chrysanthi G, Rapsomaniki MA, et al. IPP complex reinforces adhesion by relaying tension-dependent signals to inhibit integrin turnover. *Cell Rep*, 2016, 16(2): 596
- [78] Guo L, Cui C, Zhang K, et al. Kindlin-2 links mechano-environment to proline synthesis and tumor growth. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 845
- [79] Qin L, Fu X, Ma J, et al. Kindlin-2 mediates mechanotransduction in bone by regulating expression of Sclerostin in osteocytes. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 402
- [80] Jahed Z, Haydari Z, Rathish A, et al. Kindlin is mechanosensitive: force-induced conformational switch mediates cross-talk among integrins. *Biophys J*, 2019, 116(6): 1011-1024
- [81] Case LB, Baird MA, Shtengel G, et al. Molecular mechanism of vinculin activation and nanoscale spatial organization in focal adhesions. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(7): 880-892
- [82] Qiao C, Li D, Guo Y, et al. Evaluation and development of deep neural networks for image super-resolution in optical microscopy. *Nat Methods*, 2021, 18(2): 194-202
- [83] Zhao W, Zhao S, Li L, et al. Sparse deconvolution improves the resolution of live-cell super-resolution fluorescence microscopy. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(4): 606-617