

# Transmembranstruktur von Integrin $\alpha$ Ib $\beta$ 3 – Bedeutung für die Signalübertragung\*\*

Martin Hoefling, Horst Kessler und Kay-Eberhard Gottschalk\*

Computervorhersage · Rezeptoren · Zelladhäsion ·  
Signaltransduktion · Membranproteine

Mehrzeller benötigen ein eng aufeinander abgestimmtes Handeln von Zellen, die ihre Adhäsions- und Migrations-eigenschaften verändern können. Zelladhäsion und -migration werden stark durch intra- und extrazelluläre Signale reguliert, die durch die Zellmembran mithilfe von spezialisierten Rezeptoren, bekannt als Integrine, transportiert werden.<sup>[1]</sup> Integrine sind der Ausgangspunkt für eine Vielzahl von Signalkaskaden. Außerdem sind sie an vielen physiologischen Prozessen der Morphogenese von Mehrzellern beteiligt, von der Zelladhäsion über die Migration bis hin zur Apoptose und Angiogenese. Außerdem spielen sie bei pathophysiologischem Verhalten, z. B. bei der Metastasenbildung, eine Rolle.<sup>[2]</sup> Das Zentrum der Signalübertragung des Integrins sind die Transmembran(TM)-Domänen.<sup>[3]</sup> Erst vor kurzem wurde eine Struktur der TM-Domänen des  $\alpha$ Ib $\beta$ 3-Integrins vorgestellt, die ein neues Licht auf den Signalübertragungsmechanismus von Integrinen wirft.<sup>[4–7]</sup>

Integrine sind essenzielle TM-Proteine, die die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett verbinden. Sie bestehen aus nichtkovalent gebundenen Heterodimeren, von denen jede Untereinheit –  $\alpha$  und  $\beta$  – jeweils eine TM-Helix enthält.<sup>[8]</sup> Es sind 18 verschiedene  $\alpha$ - und 8 verschiedene  $\beta$ -Untereinheiten bekannt, aus denen sich 24 bekannte Heterodimerkombinationen, teils mit spezifischer, teils mit überlappender Funktion, bilden.<sup>[9]</sup>

Zellen regulieren ihre Integrin-vermittelte Adhäsion durch eine Vielzahl von Mechanismen auf unterschiedlichen Zeitskalen. Auf größeren Zeitskalen werden Expressionsmuster durch externe Signale wie Wachstumsfaktoren verändert.<sup>[10]</sup> Auf kleineren Zeitskalen können sich Integrine z. B. auf Zelloberflächen durch Clustering und Recycling neu anordnen<sup>[11]</sup> oder ihren intrazellulären Bindungszustand zum

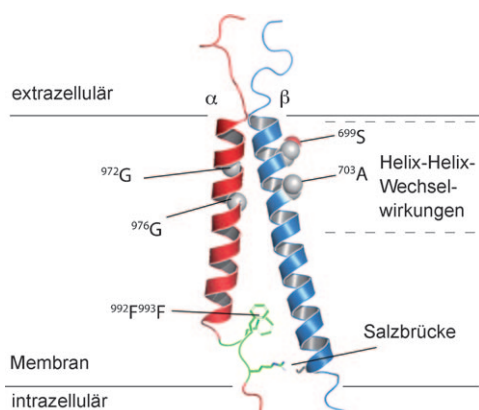
Zytoskelett verändern,<sup>[12]</sup> beispielhaft verdeutlicht durch unterschiedliche laterale Mobilität von Integrinen auf einer Zelle.<sup>[13]</sup> Außerdem spielt sich auf dieser Zeitskala auch die Änderung ihrer Affinität zu einem extrazellulären Liganden ab (Integrinaktivierung).<sup>[14]</sup> Veränderungen in der Affinität sind stark mit Konformationsänderungen von Integrinen korreliert,<sup>[14]</sup> was ein potenzieller Mechanismus zur Signalvermittlung ist, entweder vom extra- zum intrazellulären Raum oder umgekehrt. Integrine können Signale bidirektional übertragen, da beide Signalübertragungen entlang eines allosterischen Pfades verlaufen.<sup>[15]</sup> Die beiden TM-Helices des Integrinheterodimers sind der Dreh- und Angelpunkt dieser Signalereignisse, da sie die extra- und intrazellulären Domänen miteinander verbinden. Aus diesem Grund wurden von mehreren Forschergruppen unterschiedliche Strategien entwickelt, um die Rolle der TM-Domänen in diesem Signalprozess besser zu verstehen.<sup>[16–23]</sup>

Es wurde postuliert, dass die TM-Helices nicht nur als Verbindung zwischen extra- und intrazellulärem Raum wirken, sondern auch als aktive Strukturen, die spezifische Heterodimerstrukturen bilden können.<sup>[24,25]</sup> Allerdings waren die Strukturdetails dieser TM-Heterodimere bis vor kurzem noch spekulativ. In ihrer kürzlich erschienenen Publikation haben Lau et al. die Struktur des  $\alpha$ Ib $\beta$ 3-Integrinheterodimers in seinem Ruhezustand mithilfe anspruchsvoller NMR-Experimente an TM-Domänen in Bizellen gelöst.<sup>[7]</sup> Diese experimentell bestimmte Struktur bildet eine solide Grundlage für das Verständnis bisheriger experimenteller Untersuchungen sowie der TM-Signalübertragung auf atomarer Ebene.

Die experimentelle Struktur zeigt ein rechtshändig helicales Dimer (Abbildung 1). In Anbetracht der Tatsache, dass die meisten löslichen Helixdimere linkshändige Strukturen bilden,<sup>[26]</sup> könnten diese ungewöhnliche rechtshändige Konformation und die daraus resultierende niedrigere thermodynamische Stabilität eine wichtige Funktion bei der Signalübertragung innehaben. Die TM-Domänen trennen sich nachweislich im Verlauf der Signalweiterleitung.<sup>[27]</sup> Daher ist eine fein abgestimmte Energiebalance nötig, um bestimmte Wechselwirkungen gegenüber der Auftrennung begünstigen, die in den Helix-Helix-Wechselwirkungen kodiert sein muss. Ein rechtshändig helicales Dimer kann die dafür benötigte besondere Strukturflexibilität bereitstellen. Die Tendenz zur Trennung, die die Bestimmung der Struktur dieses wichtigen Komplexes in der Vergangenheit erschwerte,<sup>[28]</sup> spiegelt sich

[\*] M. Hoefling, Dr. K.-E. Gottschalk  
Angewandte Physik und Biophysik & Center for NanoScience  
Ludwig-Maximilians-Universität  
Amalienstraße 54, 80799 München (Deutschland)  
Fax: (+49) 89-2180-2050  
E-Mail: kay.gottschalk@physik.uni-muenchen.de  
Prof. Dr. H. Kessler  
Institute for Advanced Study, Department Chemie  
Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4, 85747 München (Deutschland)

[\*\*] Wir danken Elaine Gee für die kritische Durchsicht des Manuskriptes. K.E.G. wird von einem Liebig-Stipendium der FCI, M.H. von der IDK-NBT unterstützt.



**Abbildung 1.** Kürzlich von Lau et al. gelöste  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin-TM-Struktur. Die  $\alpha$ -Untereinheit ist in Rot gezeigt, das GFFKR-Motiv in Grün und die  $\beta$ -Untereinheit in Blau. Einige im Text beschriebene, wichtige Reste wurden hervorgehoben.

auch in der geringen Affinität der Helices zueinander wider.<sup>[29]</sup>

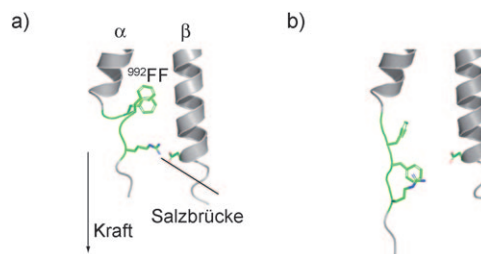
Die TM-Struktur kann in zwei unterschiedliche Wechselwirkungsregionen aufgeteilt werden: Nahe den extrazellulären Domänen gehen die Helices enge, kanonische Helix-Helix-Wechselwirkungen ein, und nahe der intrazellulären Seite zeigt sich eine ungewöhnliche Schleife, die ein hochkonserviertes GFFKR-Motiv<sup>[25,30]</sup> auf der  $\alpha$ -Untereinheit umfasst und wichtige Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten vermittelt, wenn die Helices schon weiter getrennt sind.

Nahe den extrazellulären Domänen befindet sich das konservierte und in TM-Helices bekannte<sup>[31]</sup>  $^{972}\text{Gxxx}^{976}\text{G}$ -Motiv (x: nichtkonservierte Aminosäure) des Dimers, das eine enge Wechselwirkung mit der  $\beta$ -Untereinheit (Abbildung 1) ermöglicht. Ein ähnliches, aber weniger kanonisches Motiv der  $\beta$ -Untereinheit ( $^{699}\text{Sxxx}^{703}\text{A}$ ) zeigt von den Berührungsflächen weg und ist nicht an der Wechselwirkung beteiligt. Dieses Motiv, dessen Bedeutung noch unklar ist, könnte wichtig für die laterale Assoziation mit anderen TM-Proteinen, wie Tetraspaninen, oder beim Integrin-Integrin-Clustering sein; außerdem könnte es eine Rolle bei der Bildung von Zwischenzuständen der TM-Helices spielen. Es wäre aufschlussreich, die Auswirkungen von Mutationen in diesem Motiv im tierischen Modellversuch zu testen.

Zur intrazellulären Grenzschicht orientiert findet sich das C-terminale Ende der  $\alpha$ -Untereinheit mit einer ungewöhnlichen Schleife (eingeleitet durch  $^{991}\text{G}$  in der  $\alpha$ -Untereinheit). Glycin wirkt wegen seiner hohen Flexibilität und dem Fehlen von Seitenkettenatomen als Helixunterbrecher. Der Hauptkontakt zwischen den Untereinheiten wird in dieser Schleifenregion durch das  $^{992}\text{F}^{993}\text{F}$ -Motiv und die nachfolgende Salzbrücke (Abbildung 1) hergestellt. Diese Wechselwirkungen sind für die Stabilität von Integrinen im Ruhezustand unentbehrlich.<sup>[25,30]</sup>

Bei Adhäsion und Migration unterliegen Integrine angelegten Kräften, und tatsächlich konnte die Kraft als ein Moderator der Aktivierung von Integrinen identifiziert werden.<sup>[32]</sup> Interessanterweise könnte in diesem Kontext die Abweichung von der Helizität eine Bedeutung für die

Funktion des Integrins haben: Wenn eine Kraft auf das Ende der  $\alpha$ -Untereinheit wirkt, könnte das nichthelicale Ende eine Aktivierung erleichtern, da eine geringere Energie für das Strecken der weniger geordneten Schleife nötig ist als für die H-Brücken-stabilisierte Helix. Daher ist diese Schleife ein vielversprechender Kandidat für eine kraftinduzierte Aktivierung (Abbildung 2). Interessanterweise findet sich in der Struktur der  $\beta$ -Untereinheit kein klarer Hinweis auf einen

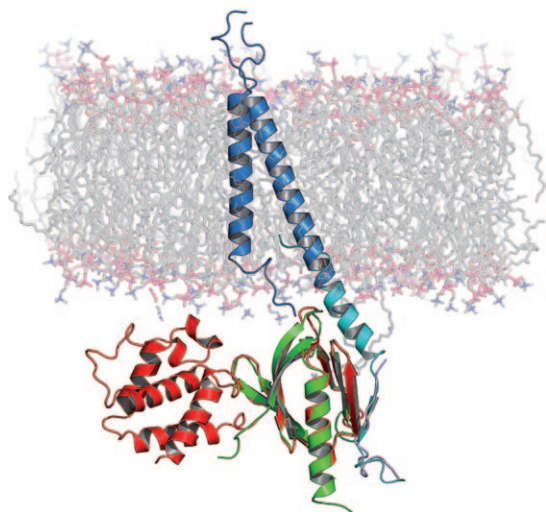


**Abbildung 2.** Mögliche Auswirkungen einer an die  $\alpha$ -Untereinheit angelegten Kraft. a) Experimentelle Struktur; das GFFKR-Motiv ist in Grün gezeigt. b) Kraftinduziertes Strecken des GFFKR-Motivs (putatives Modell).

solchen Auslösemechanismus, obwohl das prominenteste intrazelluläre Adapterprotein Talin, welches das Integrin mit dem Zytoskelett verbindet und daher vermutlich das kraftübertragende Protein ist, an die  $\beta$ - und nicht an die  $\alpha$ -Untereinheit bindet. Daher wäre es interessant, weitere Adapterproteine zu identifizieren, die an die  $\alpha$ -Untereinheit binden und daher eine Aktivierung durch mechanische Strukturveränderung in der Schleifenregion der  $\alpha$ -Untereinheit induzieren können. Neueste Indizien stützen die Vermutung, dass zumindest im Fall von  $\alpha 4\beta 1$  das Paxillin ein Kandidat für einen solchen Mechanismus ist.<sup>[12]</sup>

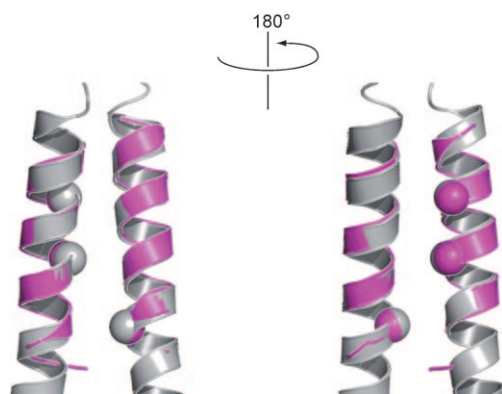
Die Bildung eines Komplexes zwischen dem Ende der  $\beta$ -Untereinheit und Talin ist der letzte gemeinsame Schritt bei der Aktivierung von Integrinen.<sup>[33]</sup> Talin verdrängt dabei die  $\alpha$ -Untereinheit und bewirkt damit eine Trennung der TM-Domänen, die letztlich zur Aktivierung führt.<sup>[34,35]</sup> Die neue Struktur der TM-Domänen ermöglicht nun in Kombination mit vor kurzem gelösten Strukturen des Integrin-Talin-Komplexes eine Überprüfung dieser Hypothese. Überraschenderweise kann Talin an die  $\beta$ -Untereinheit binden, ohne strukturell durch die  $\alpha$ -Untereinheit eingeschränkt zu sein (Abbildung 3). Daher muss der mögliche Mechanismus einer rein sterischen Verschiebung der  $\alpha$ -Untereinheit revidiert werden. Außerdem ist zu beachten, dass der intrazelluläre Teil der  $\alpha$ -Untereinheit länger ist als der Teil, der mithilfe der NMR-Spektroskopie gelöst wurde.

In der Vergangenheit wurden Modelle von TM-Domänen mit einer Vielzahl von Methoden erstellt.<sup>[19,24,36–42]</sup> Die Publikation der Struktur dieser TM-Domänen ermöglicht es nun, die Vorhersagekraft von am Computer berechneten Modellen zu testen. 2002 veröffentlichten wir ein erstes Modell des Kerns der TM-Domänen von Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ , das berechnet worden war, ohne dass experimentelle Daten zu den TM-Domänen selbst verfügbar waren.<sup>[37]</sup> Trotz des Fehlens der experimentellen Verifikation während der Rechnung



**Abbildung 3.** Verknüpfung der TM-Struktur (blau) und zweier Integrin-Talin-Komplexe (rot und grün). Hintergrund: ungefähre Position der Membran.

sind die vorhergesagte Konformation und die experimentelle Struktur innerhalb einer mittleren quadratischen Standardabweichung von weniger als 1 Å über die C $\alpha$ -Atome der 34 Aminosäurereste identisch (Abbildung 4). Spätere Rechnungen mit anderen Methoden durch DeGrado,<sup>[39]</sup> Torres<sup>[41]</sup> und neuerdings auch Springer et al.<sup>[43]</sup> führten zu sehr ähnli-



**Abbildung 4.** Überlagerung der experimentellen (grau) und vorhergesagten TM-Domänenkonformation (magenta). Zwei Gly-Reste auf der  $\alpha$ -Untereinheit und ein Gly-Rest auf der  $\beta$ -Untereinheit sind zur besseren Demonstration der Rotationsorientierung in einer Vorder- und Rückansicht als Kugeln dargestellt. Die vorhergesagte Konformation wurde mit Modell 1 des NMR-Ensembles überlagert.

chen Ergebnissen. Springer und Mitarbeiter gelang es sogar, die ungewöhnliche C-terminale Schleife der  $\alpha$ -Untereinheit vorherzusagen, indem sie eine Reihe von experimentellen Beschränkungen mit einem Programm zur Ab-initio-Strukturvorhersage kombinierten. Diese enge Übereinstimmung zwischen Experiment und Rechnung demonstriert die Leistungsfähigkeit von Rechenverfahren bei dieser Art von Systemen.

Strukturen von Integrin-TM-Domänen bilden die Basis für ein Verständnis der Signalweiterleitung von Integrin-TM-Domänen. Allerdings sind noch einige offene Fragen zu klären, z. B. zur Auswirkung einer angelegten Kraft auf die TM-Domänen, zur Existenz von Übergangsstrukturen zwischen komplexierten und nichtkomplexierten Untereinheiten und zum Mechanismus der Integrinaktivierung durch das Binden von Talin. Weitere wichtige offene Punkte sind die mögliche Bildung von Homooligomeren und ihre Rolle bei der Bildung einer fokalen Adhäsion. Auch die molekulare Natur der Zellmigration entlang von Konzentrationsgradienten sowie die räumlichen und zeitlichen Anforderungen an die Proteine, die an der Chemotaxis beteiligt sind, sowie deren Kooperation mit Integrinliganden müssen noch weiter untersucht werden.<sup>[44,45]</sup> Auch die Details der Informationsweiterleitung nach dem Binden eines Liganden von der Kopfgruppe hin zur Transmembranregion sind noch immer nicht gut verstanden. Die nun verfügbare Struktur des Transmembrankomplexes ist ein enormer Schritt nach vorne für das Verständnis der Funktion dieser Moleküle und bietet eine Grundlage, um die offenen Fragen durch weitere Modellrechnungen und experimentelle Untersuchungen zu beantworten.

Eingegangen am 15. April 2009

Online veröffentlicht am 13. Juli 2009

- [1] T. A. Springer, *Nature* **1990**, 346, 425.
- [2] K. R. Legate, S. A. Wickstrom, R. Fassler, *Genes Dev.* **2009**, 23, 397.
- [3] K. E. Gottschalk, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 3919; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 3767.
- [4] C. Kim, T. Lau, T. S. Ulmer, M. H. Ginsberg, *Blood* **2009**, 113, 4747.
- [5] T. Lau, A. W. Partridge, M. H. Ginsberg, T. S. Ulmer, *Biochemistry* **2008**, 47, 4008.
- [6] T. L. Lau, V. Dua, T. S. Ulmer, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 16162.
- [7] T. L. Lau, C. Kim, M. H. Ginsberg, T. S. Ulmer, *EMBO J.* **2009**, 28, 1351.
- [8] M. J. Humphries, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28, 311.
- [9] J. D. Humphries, A. Byron, M. J. Humphries, *J. Cell Sci.* **2006**, 119, 3901.
- [10] S. M. Wahl, J. B. Allen, B. S. Weeks, H. L. Wong, P. E. Klotman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 4577.
- [11] C. Cluzel, F. Saltel, J. Lussi, F. Paulhe, B. A. Imhof, B. Wehrle-Haller, *J. Cell Biol.* **2005**, 171, 383.
- [12] R. Alon, S. W. Feigelson, E. Manevich, D. M. Rose, J. Schmitz, D. R. Overby, E. Winter, V. Grabovsky, V. Shinder, B. D. Matthews, M. Sokolovsky-Eisenberg, D. E. Ingber, M. Benoit, M. H. Ginsberg, *J. Cell Biol.* **2005**, 171, 1073.
- [13] O. Lieleg, M. Lopez-Garcia, C. Semmrich, J. Auerheimer, H. Kessler, A. R. Bausch, *Small* **2007**, 3, 1560.
- [14] J. Takagi, B. M. Petre, T. Walz, T. A. Springer, *Cell* **2002**, 110, 599.
- [15] M. A. Arnaout, B. Mahalingam, J. P. Xiong, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, 21, 381.
- [16] H. Yin, J. S. Slusky, B. W. Berger, R. S. Walters, G. Vilaire, R. I. Litvinov, J. D. Lear, G. A. Caputo, J. S. Bennett, W. F. DeGrado, *Science* **2007**, 315, 1817.
- [17] J. Q. Zhu, C. V. Carman, M. Kim, M. Shimaoka, T. A. Springer, B. H. Luo, *Blood* **2007**, 110, 2475.
- [18] B. H. Luo, C. V. Carman, J. Takagi, T. A. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 3679.

- [19] K. E. Gottschalk, H. Kessler, *Structure* **2004**, *12*, 1109.
- [20] B. H. Luo, T. A. Springer, J. Takagi, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, 776.
- [21] A. Stefansson, A. Armulik, I. M. Nilsson, G. von Heijne, S. Johansson, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 21200.
- [22] R. H. Li, N. Mitra, H. Gratkowski, G. Vilaire, R. Litvinov, C. Nagasami, J. W. Weisel, J. D. Lear, W. F. DeGrado, J. S. Bennett, *Science* **2003**, *300*, 795.
- [23] R. H. Li, C. R. Babu, J. D. Lear, A. J. Wand, J. S. Bennett, W. F. DeGrado, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 12462.
- [24] B. D. Adair, M. Yeager, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14059.
- [25] P. E. Hughes, F. DiazGonzalez, L. Leong, C. Y. Wu, J. A. McDonald, S. J. Shattil, M. H. Ginsberg, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6571.
- [26] A. N. Lupas, M. Gruber, *Adv. Protein Chem.* **2005**, *70*, 37.
- [27] M. Kim, C. V. Carman, T. A. Springer, *Science* **2003**, *301*, 1720.
- [28] T. S. Ulmer, B. Yaspan, M. H. Ginsberg, I. D. Campbell, *Biochemistry* **2001**, *40*, 7498.
- [29] D. Schneider, D. M. Engelman, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 9840.
- [30] T. E. O'Toole, Y. Katagiri, R. J. Faull, K. Peter, R. Tamura, V. Quaranta, J. C. Loftus, S. J. Shattil, M. H. Ginsberg, *J. Cell Biol.* **1994**, *124*, 1047.
- [31] A. Senes, D. E. Engle, W. F. DeGrado, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 465.
- [32] R. Alon, M. L. Dustin, *Immunity* **2007**, *26*, 17.
- [33] S. Tadokoro, S. J. Shattil, K. Eto, V. Tai, R. C. Liddington, J. M. de Pereda, M. H. Ginsberg, D. A. Calderwood, *Science* **2003**, *302*, 103.
- [34] K. L. Wegener, A. W. Partridge, J. Han, A. R. Pickford, R. C. Liddington, M. H. Ginsberg, I. D. Campbell, *Cell* **2007**, *128*, 171.
- [35] K. L. Wegener, I. D. Campbell, *Mol. Membr. Biol.* **2008**, *25*, 376.
- [36] K. E. Gottschalk, *Structure* **2005**, *13*, 703.
- [37] K. E. Gottschalk, P. D. Adams, A. T. Brunger, H. Kessler, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 1800.
- [38] K. E. Gottschalk, H. Kessler, *FEBS Lett.* **2004**, *557*, 253.
- [39] W. Li, D. G. Metcalf, R. Gorelik, R. H. Li, N. Mitra, V. Nanda, P. B. Law, J. D. Lear, W. F. DeGrado, J. S. Bennett, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 1424.
- [40] X. Lin, S. M. Tan, S. K. A. Law, J. Torres, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2006**, *63*, 16.
- [41] X. Lin, S. M. Tan, S. K. A. Law, J. Torres, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2006**, *65*, 274.
- [42] A. W. Partridge, S. C. Liu, S. Kim, J. U. Bowie, M. H. Ginsberg, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 7294.
- [43] V. C. Hirschfeld-Warneken, M. Arnold, A. Cavalcanti-Adam, M. Lopez-Garcia, H. Kessler, J. P. Spatz, *Eur. J. Cell Biol.* **2008**, *87*, 743.
- [44] V. C. Hirschfeld-Warneken, M. Arnold, A. Cavalcanti-Adam, M. Lopez-Garcia, H. Kessler, J. P. Spatz, *Eur. J. Cell Biol.* **2008**, *87*, 743.
- [45] M. Arnold, V. C. Hirschfeld-Warneken, T. Lohmuller, P. Heil, J. Blummel, E. A. Cavalcanti-Adam, M. Lopez-Garcia, P. Walther, H. Kessler, B. Geiger, J. P. Spatz, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 2063.