

1 Einleitung

Ein wesentlicher Schritt bei der Evolution von Einzellern zu mehrzelligen Organismen muß die Erlangung der Fähigkeit der einzelnen Zelle gewesen sein, mit anderen Zellen in direkten physischen und kommunikativen Kontakt zu treten. Zelloberflächenproteine ermöglichen es den heutigen Tier- und Pflanzenzellen, mit anderen Zellen stabile Kontakte einzugehen und Aggregate funktionell zusammenarbeitender Zellen zu bilden. Die tierischen Zellen sezernieren ein komplexes Netzwerk aus Proteinen und Kohlenhydraten, das extrazelluläre Matrix (EZM) genannt wird. Diese Matrix füllt den Raum zwischen den Zellen aus, fördert den Zusammenhalt zwischen den Zellen und erfüllt darüber hinaus noch weitere Aufgaben. Pflanzenzellen hingegen besitzen eine dickere, steifere und undurchlässigere Zellmembran, die viele Aufgaben der extrazellulären Matrix der Tierzellen übernimmt, jedoch völlig anders aufgebaut ist. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich nach einem kurzen Einblick in die Welt der EZM im weiteren auf die als Zelladhäsionsmoleküle bzw. -rezeptoren bezeichneten Zelloberflächenproteine tierischer Zellen.

1.1 Komponenten und Funktionen der extrazellulären Matrix

Bei Mehrzellern wird der die Gewebezellen umgebende extrazelluläre Raum zu einem Großteil von einem komplexen Geflecht aus Makromolekülen, der extrazellulären Matrix (EZM), ausgefüllt.

Man unterscheidet bei den Bestandteilen der EZM Faserproteine, zu denen die Fibrillen- bzw. Schichten-bildenden Kollagene, Elastin, Fibronectin und die Laminine gehören, sowie das Hyaluronsäurepolymer und die Proteoglycane, bei denen es sich um die stark geladenen Polysaccharide Glycosaminoglycane handelt, die kovalent an Proteine gebunden sind.

Die Bestandteile der EZM werden hauptsächlich von den in sie eingebetteten Zellen gebildet und sezerniert.

In einigen Gewebetypen wie der Epidermis der Haut gibt es kaum extrazellulären Raum zwischen den Zellen. Epithel- und Muskelzellen ruhen jedoch auf einer dünnen als Basallamina bezeichneten Matrix, mit der sie fest verbunden sind. In den Glomeruli der Niere übernimmt die Basallamina die Funktion eines porösen Filters, der Wasser, kleine Moleküle und Ionen passieren läßt, während Proteine und Zellen im Blutstrom verbleiben.

Die Basallamina besteht aus Kollagen IV, Heparansulfat-Proteoglycanen, Nidogen und Laminin. Sie liegt unter epithelialen, endothelialen, Leber-, Fett- und Muskelzellen.

Das lockere Bindegewebe liegt unter der Basallamina und trägt die meisten der kleinen Drüsen des Körpers. Es ist von vielen Zellen – vor allem Fibroblasten – durchsetzt, die einen Großteil der extrazellulären Matrix synthetisieren. Es besteht aus faserigen Kollagenen, Elastin und dem stark hydratisierten Hyaluronat und Proteoglycanen, was dem Gewebe eine gelartige Konsistenz verleiht. Das lockere Bindegewebe ermöglicht die freie Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen in die Epithel- und Drüsenzellen.

Das dichte Bindegewebe, zu dem Knochen, Knorpel und Sehnen gehören, besteht hauptsächlich aus faserigen Komponenten der extrazellulären Matrix (dicht gepackte Kollagene, Glycoproteine, Proteoglycane und Elastin) und enthält nur wenige Zellen.

Im Gehirn setzt sich die EZM weniger aus faserigen Proteinen wie Kollagen und Fibronectin, dafür mehr aus Glycosaminoglycanen in Form von Proteoglycanen und Hyaluronsäure zusammen (Übersicht [Novak und Kaye, 2000]).

Neben der rein mechanischen Funktion, dem Gewebe Druck- und Zugfestigkeit und der einzelnen Zelle ihre Morphologie zu verleihen, nimmt die extrazelluläre Matrix auch aktiv an Signalprozessen zwischen Zellen und ihrer Umgebung teil. Die Proteine der extrazellulären Matrix können direkt mit Zelloberflächenrezeptoren interagieren und dadurch Signalkaskaden auslösen. Schon während der Embryonalentwicklung ist für die vielzähligen Differenzierungs- und Migrationsprozesse die dynamische Zusammensetzung der EZM und deren Interaktion mit Zelladhäsionsmolekülen von grundlegender Bedeutung [Zagris, 2001]. Die EZM kann die Aktivität einiger Wachstumsfaktoren und Hormone modulieren, indem sie deren Präsentation beeinflusst [Ruoslahti und Yamaguchi, 1991; Schonherr und Hausser, 2000; Streuli, 1999].

Zellen, die Proteine der extrazellulären Matrix sezernieren, sind in der Lage, ihre eigene Umgebung zu gestalten, indem sie unterschiedliche Zusammenstellungen von Komponenten der EZM und verschiedene EZM-degradierende Enzyme (Metalloproteinasen) produzieren und sezernieren [Werb et al., 1989]. Zwischen den Zellen des Bindegewebes und der EZM besteht ein enger Kontakt. Die Zellen reagieren auf mechanischen Stress und passen die EZM den neuen Anforderungen an, indem sie das Muster der exprimierten Proteine verändern [Chiquet, 1999]. Bei diesem Vorgang sind die Integrine die Hauptakteure. Sie leiten die mechanischen Signale über

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) an Transkriptionsfaktoren (NF- κ B) weiter [Chiquet, 1999].

1.2 Adhäsion und die wichtigsten Zelladhäsionsmoleküle

Die Adhäsion spielt neben dem Aufbau und Erhalt von Organen und anderen dreidimensionalen Strukturen im tierischen Organismus eine wichtige Rolle bei physiologischen Prozessen wie der Immunabwehr, Wundheilung, Proliferation, Differenzierung und der Apoptose, ist jedoch auch in pathologischen Prozessen wie dem Eintritt von Pathogenen in ihre Wirtszelle sowie der Krebsentstehung und der Metastasierung maligner Zellen involviert. Die Adhäsions- und Kommunikationsvorgänge werden von Zelladhäsionsmolekülen bzw. -rezeptoren vermittelt. Man unterscheidet die Zell-Zell-Adhäsion, die Kontakte zwischen verschiedenen Zellen herstellt, von der Zell-Matrix-Adhäsion, welche die Einbindung der Zellen in die extrazelluläre Matrix bewirkt.

Die Zelladhäsionsmoleküle werden in Selektine, Cadherine, Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie, Proteoglycane der Zelloberfläche und Integrine unterteilt.

Die Mitglieder der Selektin-Familie sind Lektin-artige Rezeptoren, die Ca^{2+} -abhängig heterotypische Zell-Zell-Adhäsion durch Bindung an sialylierte Glycane vermitteln. Sie werden auf Leukocyten, Plättchen und Endothelzellen exprimiert. Während entzündlicher Prozesse initiieren Selektine die Interaktion von Leukocyten mit Endothelzellen, der die Auswanderung der Zellen aus dem Blut ins Gewebe folgt [Walzog und Gaeltgens, 2000].

Mitglieder der Cadherin-Familie vermitteln Ca^{2+} -abhängig homotypische Zell-Zell-Adhäsion. Sie sind in spezialisierten Membranbereichen wie der Zonula adherens und den Desmosomen lokalisiert und stellen über intrazelluläre Adapterproteine (Catenine) Verbindungen mit dem Aktin-Cytoskelett bzw. mit Intermediärfilamenten her. Cadherine werden von Zellen verschiedener Gewebetypen, wie z.B. Plazenta, Leber, Darm oder Hirngewebe, exprimiert. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Gewebeorganisation während der Ontogenese und bei der Aufrechterhaltung der normalen Gewebestruktur im adulten Organismus [Huber et al., 1996; Takeichi, 1990].

Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie besitzen als charakteristisches Merkmal extrazellulär mindestens eine Immunglobulin-Domäne. Sie werden in einer Vielzahl von Zellen exprimiert, so z. B. in Zellen des Immunsystems, des Nervensystems und in Epithelzellen. Sie vermitteln Ca^{2+} -unabhängig sowohl homotypische Interaktionen,

wie z.B. das bei der neuronalen Differenzierung beteiligte Zelladhäsionsmolekül NCAM (*neural cell-adhesion molecule*) [Hoffman et al., 1982], als auch heterotypische Zell-Zell-Interaktionen, wie sie z.B. bei T- und B-Zell-Rezeptoren des Immunsystems vorkommen [Gonzalez-Amaro et al., 1998].

Proteoglycane sind eine Familie komplexer Makromoleküle, die aus Trägerproteinen bestehen, welche kovalent mit Glycosaminoglycanen – langen, sich wiederholenden Polymeren bestimmter meist schwefelhaltiger und daher negativ geladener Disaccharide – verbunden sind. Proteoglycane findet man in allen Bindegeweben und auf der Oberfläche aller Zellen. Zu der heterogenen Gruppe der Proteoglycane, die auch auf der Zelloberfläche exprimiert werden, gehören z.B. Syndecan, Fibroglycan und Dystroglycan. Sie sind entweder über Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI) in der Plasmamembran verankert oder das Trägerprotein durchspannt die Membran. Sie vermitteln hauptsächlich Zell-Matrix-Adhäsion, sind aber auch an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt [Schwartz, 2000; Tumova et al., 2000].

Die Familie der Integrine zählt zu den wichtigsten Molekülen der Zell-Matrix-Adhäsion bei den Metazoen, manche Mitglieder sind bei den Vertebraten auch bei der Zell-Zell-Adhäsion involviert. Die Integrine benötigen zweiwertige Kationen für ihre Funktion als Adhäsionsmoleküle und werden auf praktisch allen Zelltypen als Heterodimere, die aus je einer α - und einer β -Untereinheit bestehen, exprimiert. Sie sind an Zellwachstum, Differenzierung, Migration, Blutgerinnung und Entzündungsprozessen und auch an pathologischen Prozessen wie Tumorentstehung und -wachstum und Metastasierung [Howe et al., 1998] sowie der Internalisierung von Pathogenen, wie z.B. *Yersinia* [Isberg und Leong, 1990; Leong et al., 1990; Rankin et al., 1992] beteiligt.

Die vorliegende Schrift beschäftigt sich im weiteren hauptsächlich mit der Familie der Integrine, da das $\alpha 3 \beta 1$ -Integrin Gegenstand der experimentellen Untersuchungen ist.

1.3 Integrine

Integrine sind Transmembranproteine des Typ I. Diese Glycoproteine existieren als nicht-kovalent assoziierte Dimere.

In Vertebraten wurden bisher 24 verschiedene Integrin- Heterodimere nachgewiesen, die aus 18 α - und 8 β -Untereinheiten gebildet werden [Plow et al., 2000]. Das humane Genom umfaßt Gene für 24 α - und 9 β -Untereinheiten [Venter et al., 2001].

Die zusätzlichen auf Genomebene gefundenen α - und β -Untereinheiten wurden jedoch auf Proteinebene noch nicht gefunden.

Jede dieser Untereinheiten besitzt eine große extrazelluläre Domäne ($\alpha > 940$, $\beta > 640$ Aminosäuren), einen membrandurchspannenden Bereich und in den meisten Fällen eine kurze cytoplasmatische Domäne (Ausnahme ist die $\beta 4$ -Untereinheit mit einer sehr großen cytoplasmatischen Domäne, die darauf spezialisiert ist, Bindungen mit dem Keratin-Cytoskelett einzugehen). Die cytoplasmatischen Domänen der Integrine enthalten jeweils in der Nähe des transmembranären Bereichs eine konservierte Sequenz. Bei allen α -Untereinheiten ist es das KXGFFKR-Motiv, bei fast allen β -Untereinheiten das KLLX₄D-Motiv.

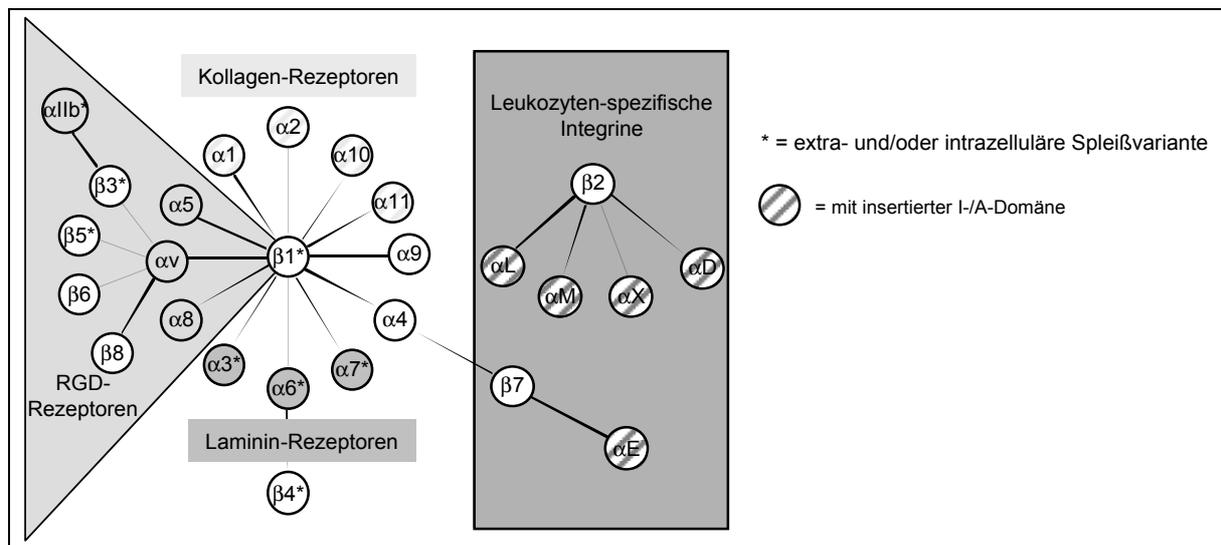


Abb.1 – Die Integrinfamilie (modifiziert nach [Hynes, 2002])

Die α - und die β -Untereinheit sind N-terminal über ihre extrazellulären Bereiche nicht-kovalent miteinander verknüpft. Sie assoziieren im endoplasmatischen Retikulum und werden nur als Heterodimer an die Zelloberfläche gebracht [Rosa und McEver, 1989]. Die Kombination von α - und β -Untereinheit bestimmt die Ligandenspezifität des Integrins (Abb.1 und Tab.1). Viele Integrine besitzen zum Teil gleiche Liganden und erst die Kombination von Integrinexpression und -aktivierung sowie Zugänglichkeit des Liganden spezifizieren die Interaktionen in vivo.

Integrin	Ligand			
	EZM	löslich	Zell-Zell	Pathogen/Toxin
$\alpha 1\beta 1$	Kn, Ln			
$\alpha 2\beta 1$	Kn, Ln, Chad	MMP-1		Echovirus 1, 8; Rotavirus, Egel (rLAPP)
$\alpha 3\beta 1$	Ln, Rn, TSP-1, (Kn, Fn)		($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$)	<i>Yersinia</i> spp. (invasin)

$\alpha 4$	$\beta 1$	Fn, Op	pp-vWF, tTG, FXII, Angiostatin	V-CAM-1, ($\alpha 4$)	
	$\beta 7$	Fn		V-CAM-1, MAdCAM, ($\alpha 4$)	
$\alpha 5\beta 1$		Fn	tTG, Endostatin	ADAM-15, -17, L1	<i>Yersinia</i> spp., <i>B. burgdorferi</i> , <i>Shigella</i> spp. (ipa), <i>B. pertussis</i> (fimD), Maul- und Klauenseuche-Virus
$\alpha 6$	$\beta 1$	Ln	Fisp12/mCTGF, Cyr61	ADAM-2, -9	Papilloma-Virus, <i>Yersinia</i> spp. (invasin)
	$\beta 4$	Ln			
$\alpha 7\beta 1$		Ln			
$\alpha 8\beta 1$		Fn, Tn, Nn	TGF β 1-LAP	VCAM-1, ADAM-12, -15	
$\alpha 9\beta 1$		Tn, Op, Kn, Ln	pp-vWF, tTG, FXIII, Angiostatin		
$\alpha 10\beta 1$		Kn			
$\alpha 11\beta 1$		Kn			
αv	$\beta 1$	Fn, Vn	TGF β 1-LAP		Parechovirus 1
	$\beta 3$	Vn, Fn, vWF, Op, Tn, BSP, TSP-1	Fg, Cyr61, Fisp12/mCTGF, MMP2, Endostatin, Angiostatin, Tumstatin	CD31	Schlangenvenome (Disintegrine), Adenovirus, Rotavirus, Maul- und Klauenseuchevirus, Coxsackie-Virus A9, Parechovirus 1, Hantaviren, HIV (Tat-Protein)
	$\beta 5$	Vn, BSP	TGF β 1-LAP, Cyr61, Endostatin		HIV (Tat-Protein)
	$\beta 6$	Fn, Tn	TGF β 1-LAP		Maul- und Klauenseuchevirus
	$\beta 8$	Kn, Ln, Fn	TGF β 1-LAP		
$\alpha 11b\beta 3$		Vn, Fn, vWF	Fg, Cyr61, Fisp12/mCTGF, Prothrombin		<i>B. burgdorferi</i> , Schlangenvenome (Disintegrine), Zecken (Variabilin, Disagregin), Egel (Decorsin, Ornatin)
$\alpha L\beta 2$				ICAM-1 – -5	
$\alpha M\beta 2$			Fg, iC3b, FX	ICAM-1, VCAM-1	<i>B. burgdorferi</i> , <i>B. pertussis</i> , <i>C. albicans</i>
$\alpha X\beta 2$			Fg, iC3b		Rotavirus
$\alpha D\beta 2$				ICAM-3, VCAM-1	
$\alpha E\beta 7$				E-Cadherin	

Tab.1 – Integrine und ihre Liganden (modifiziert nach [van der Flier und Sonnenberg, 2001])

(ADAM - A disintegrin and metalloprotease, *B. burgdorferi* - *Borrelia burgdorferi*, *B. pertussis* - *Bordetella pertussis*, BSP - bone sialic protein, *C. albicans* - *Candida albicans*, Chad - chondroadherin, Cyr61 - cysteine-rich angiogenic protein 61, Kn - Kollagen, Fg - Fibrinogen, Fn - Fibronectin, FX - Koagulationsfaktor X, FXIII - Koagulationsfaktor XIII, iC3b - inaktivierte Komplementkomponente C3b, ICAM - intercellular adhesion molecule, Ln - Laminin, MAdCAM - mucosal addressin cell adhesion molecule, mCTGF - mouse connective tissue growth factor, MMP - Matrixmetalloprotease, Nn - Nephronectin, Op - Osteopontin, pp-vWF - prepro von-Willebrand-Faktor, Rn - Reelin, TGF β 1-LAP - TGF β 1 latency-associated peptide, Tn - Tenascin, Tsp - Thrombospondin, tTG - tissue transglutaminase, VCAM-1 - vascular cell adhesion molecule-1, Vn - Vitronectin, vWF - von-Willebrand-Faktor).

Während die Integrine der β 1-Gruppe, die auch als VLAs (*Very-Late-After-Activation*) bezeichnet werden, ubiquitär exprimiert werden, werden das β 7-Integrin und die β 2-Integrine nur von Leukocyten exprimiert (Abb.1).

Alternatives Spleißen der mRNA (*messenger ribonucleic acid*) einiger Integrin-Untereinheiten vergrößert die Komplexität der Integrin-Familie noch [de Melker und Sonnenberg, 1999]. Es existieren sowohl Spleißvarianten der cytoplasmatischen (α 3, α 6, α 7, β 1, β 3, β 4, β 5) als auch der extrazellulären Domänen (α 6, α 7, α IIb, β 3) der Integrin-Untereinheiten. Das alternative Spleißen wird entwicklungs- und gewebsabhängig reguliert und scheint eine Feinregulation der Ligandenbindung und Signalaktivität des Integrins zu bewirken [de Melker und Sonnenberg, 1999].

Alternative Proteinsequenzen der extrazellulären Domäne können zu veränderter Ligandenspezifität bzw. -affinität führen oder den Aktivierungszustand des Integrins modulieren. Varianten der cytoplasmatischen Domänen können die Integrinaktivität, Cytoskelett-Assoziation und intrazelluläre Signale beeinflussen.

Die Integrine werden zum Teil verschiedenen posttranslationalen Modifikationen unterzogen.

Die Integrin-Untereinheiten α 3, α 5, α 6, α 7, α 8, α v und α IIb werden posttranslational C-terminal zur Transmembranregion an einer dibasischen Sequenz in zwei Polypeptidketten gespalten, die jedoch durch eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden bleiben.

Die Integrin-Untereinheiten sind Glycoproteine, die N-glycosidisch Oligosaccharide verschiedener Typen tragen. Die Glycanausstattung scheint vom Zelltyp abzuhängen, es wird jedoch für die β 1-Integrine ein funktioneller Zusammenhang zwischen seinen Glycanen und der Integrin-Funktion postuliert (Übersicht [Bellis, 2004]).

Einige der Integrin-Untereinheiten werden an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten phosphoryliert und darüber zum Teil in ihrer Funktion reguliert. Diese Modifikation wird in einem gesonderten Kapitel (siehe 1.3.7) ausführlicher dargestellt werden.

1.3.1 Evolution der Integrine

Alle Metazoen besitzen ein oder mehrere Integrine, während in Prokaryonten, Pflanzen und Pilzen keine Homologen gefunden werden. Die einfachsten Metazoen wie Schwämme besitzen ein Integrin (Übersicht [Burke, 1999]), das den Zusammenhalt der Zellen über die extrazelluläre Matrix herstellt. Schon die ältesten Bilateria (bilateral symmetrische Organismen) exprimieren mindestens zwei verschiedene $\alpha\beta$ -Hetero-

dimere, die asymmetrische Interaktionen mit der Basalmembran ermöglichen. Nachfolger dieser beiden "Integrin-Urtypen" sind bis heute in allen Tieren vom Wurm über die Fliege bis zum Wirbeltier vorhanden [Hynes und Zhao, 2000]. Der eine Integrin-Typ bindet Liganden mit dem Tripeptid RGD, der andere Typ vermittelt Adhäsion auf Lamininen. So besitzt *Caenorhabditis elegans* tatsächlich nur eine β - und zwei α -Integrin-Untereinheiten, während die Vertebraten ihre Orthologen dieser beiden Integrintypen stark diversifiziert haben. Die Vertebraten exprimieren neben den beiden Urtypen weitere Integrine: zum einen die β 2-Integrine und das β 7-Integrin, die für Zell-Zell-Interaktionen besonders bei der Immunabwehr eine große Rolle spielen, und zum anderen die α -Integrin-Untereinheiten, die eine zusätzliche extrazelluläre Domäne, die I- bzw. A-Domäne tragen, und Bestandteile von Kollagenrezeptoren oder der Leukocyten-spezifischen Integrine sind [Hynes, 2002] (Abb.1).

1.3.2 Struktur / Konformation der Integrine

Die dreidimensionale Struktur eines vollständigen membrandurchspannenden Integrins wurde bislang nicht aufgeklärt. Es liegen jedoch Teilinformationen zu den extrazellulären, transmembranären und cytoplasmatischen Bereichen verschiedener Integrine vor, aus denen ein Gesamtbild der Integrinstruktur zusammengesetzt werden kann. Aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen weiß man, daß das Integrin einen Liganden-bindenden globulären Kopf besitzt, der auf einem langen Stiel sitzt. Die beiden extrazellulären Regionen (Kopf und Stiel) werden jeweils von der α - und β -Untereinheit gemeinsam gebildet. Von fast allen extrazellulären Bereichen des α ν β 3-Integrins liegt die Kristallstruktur mit einer Auflösung von 3,1 Å vor [Xiong et al., 2002], die NMR-Auflösung (*nuclear magnetic resonance*) der β 2-Integrin-Untereinheit liefert die Informationen über die schlecht aufgelösten Strukturen im α ν β 3-Kristall [Beglova et al., 2002] und für α IIb β 3 konnte eine Struktur mit einer Auflösung von 20 Å aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen rekonstruiert werden [Adair und Yeager, 2002] (Abb.2).

Die extrazelluläre Domäne der α -Integrin-Untereinheiten (Abb.3) trägt sieben ca. 60 Aminosäuren lange homologe Wiederholungen (I-VII), die je ein viersträngiges β -Faltblatt ausbilden und sich zu einem sieben-blättrigen β -Propeller zusammenlagern [Springer, 1997].

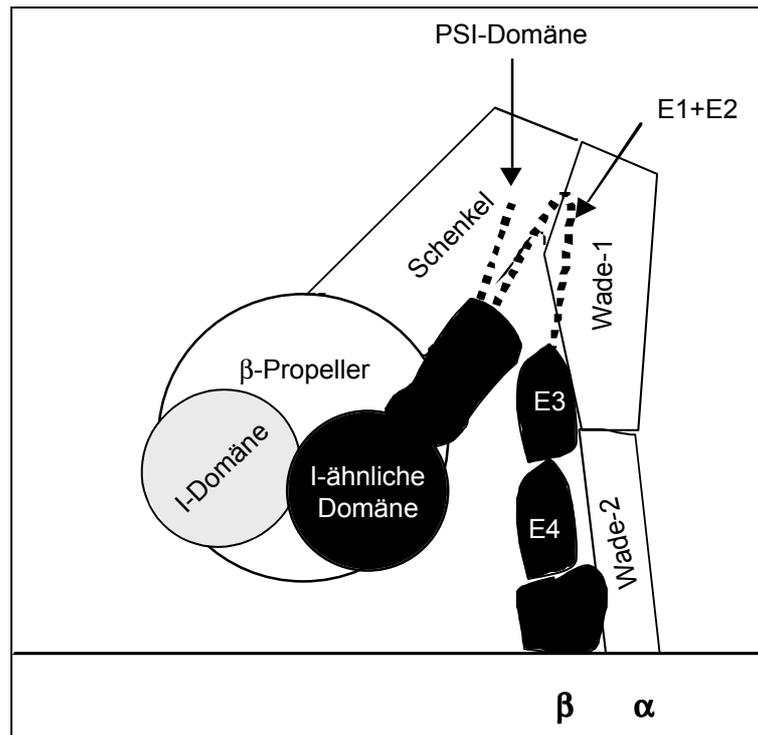


Abb.2 – Dreidimensionale Struktur der Integrine (modifiziert nach [Shimaoka et al., 2002])

Die Anordnung der einzelnen Domänen entspricht der Anordnung aus der Kristallstruktur des $\alpha\beta3$ -Integrins [Xiong et al., 2001], die I-Domäne wurde hinzugefügt. E1-4 stehen für die EGF-ähnlichen Domänen des Integrins (I-EGF). Weitere Erklärungen befinden sich im Text.

Die Integrin-Untereinheiten $\alpha1$, $\alpha2$, $\alpha10$, $\alpha11$, αL , αM , αX , αD und αE besitzen zwischen den homologen Wiederholungen II und III zusätzlich eine als I- bzw. A-Domäne bezeichnete ca. 180 Aminosäuren lange Domäne, die sich unabhängig faltet (Rossmann-Faltung: hydrophile α -Helices, die sich um ein zentrales hydrophobes β -Faltblatt lagern) und homolog zur Kollagen-bindenden A-Domäne des von-Willebrand-Faktors ist. Die I-Domäne verschiedener α -Untereinheiten wurde kristallisiert (u.a. $\alpha1$ [Nolte et al., 1999], $\alpha2$ [Emsley et al., 1998]). Sie ist die Hauptligandenbindungsstelle, während bei den Integrinen ohne I-Domäne der β -Propeller direkt an der Ligandenbindung beteiligt zu sein scheint. Die I-Domäne trägt eine Koordinationsstelle für divalente Kationen, die als *metal ion-dependent adhesion site* (MIDAS) bezeichnet wird. Die Stielregion der α -Integrin-Untereinheit besteht aus ca. 500 Aminosäuren-Resten; die Kristallstruktur zeigt drei zwei-schichtige β -Sandwich-Domänen, die als Schenkel (thigh), Wade-1 (calf-1) und Wade-2 (calf-2) bezeichnet werden [Xiong et al., 2001].

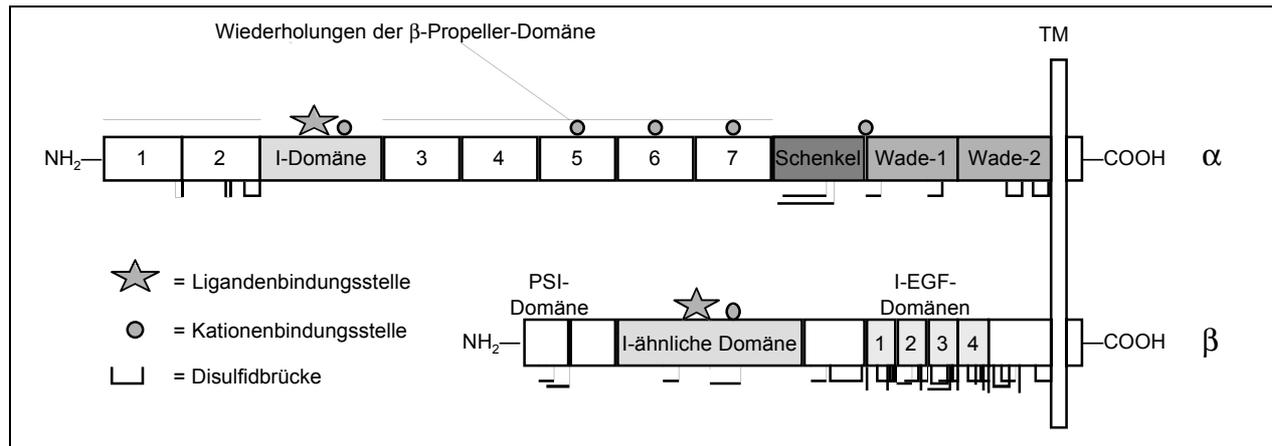


Abb.3 – Primärstruktur der Integrine (modifiziert nach [Shimaoka et al., 2002])

Der Aufbau der Integrindomänen ist schematisch für ein Integrin ($\alpha\beta$), dessen α -Untereinheit eine I-Domäne trägt, dargestellt. Weitere Erklärungen befinden sich im Text.

Die β -Integrin-Untereinheit (Abb.3) trägt N-terminal eine als PSI-Domäne (Plexin, Semaphorin und Integrin) bezeichnete Cystein-reiche Region, die Sequenz-Homologie mit Membranproteinen wie Plexin und Semaphorin besitzt [Bork et al., 1999]. Diese Domäne faltet sich wahrscheinlich in zwei α -Helices. Das erste der sieben Cysteine dieser Region bildet eine Disulfidbrücke mit der C-terminalen Cystein-reichen Region der β -Untereinheit aus [Calvete et al., 1991]. Weiterhin tragen alle β -Untereinheiten eine I-ähnliche Domäne, die ca. 240 Aminosäuren lang ist, eine der MIDAS ähnliche Metall-Bindungsstelle (DXSXS-Sequenz) besitzt und ähnliche Sekundärstruktur und begrenzte Sequenzähnlichkeit mit der I-Domäne der α -Untereinheiten aufweist. Diese Domäne ist zusammen mit der I-Domäne bzw. dem β -Propeller der α -Untereinheit an der Ligandenbindung beteiligt. Zwischen der I-ähnlichen Domäne und der β -Propeller-Domäne befindet sich eine große Interaktionsfläche. Der Rest der extrazellulären β -Sequenz bildet die Stielregion aus, die reich an Cysteinen ist und vier Cystein-reiche EGF-ähnliche (*epidermal growth factor*) Wiederholungen beinhaltet, die als Integrin-EGF (I-EGF) bezeichnet werden.

Der transmembranäre Bereich der α - und β -Integrinuntereinheit wird von 23 hydrophoben Aminosäuren gebildet, welche die Membran als α -Helix durchziehen. Bei allen Integrin-Untereinheiten (bis auf die β 4-Untereinheit) folgt C-terminal auf diese Sequenz eine basische Aminosäure, gefolgt von einer kurzen hydrophoben und einer hoch polaren Sequenz. Von einigen Forschern wird eine variable Grenze zwischen transmembranärem und cytoplasmatischem Bereich der Integrin-Untereinheiten

postuliert [Armulik et al., 1999; Stefansson et al., 2004]. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten für den transmembranären Bereich einen elektronendichten Stab, der als zwei assoziierte parallele Helices interpretiert wurde [Adair und Yeager, 2002]. Andere Studien ergaben ebenfalls, daß die transmembranären Bereiche der Integrine assoziieren können [Li et al., 2001; Schneider und Engelman, 2003].

Wie schon erwähnt, sind die cytoplasmatischen Bereiche der Integrin-Untereinheiten mit Ausnahme der $\beta 4$ -Untereinheit kurz. Ihre membran-proximalen Bereiche sind stark konserviert und spielen eine entscheidende Rolle bei der Integrin-Aktivierung und Signalweiterleitung. Die Deletion des kompletten cytosolischen Anteils der α -Integrin-Untereinheit oder der konservierten membran-proximalen KXGFFKR-Sequenz aktiviert das Integrin, während Deletionen, bei denen das KXGFFKR erhalten bleibt, nicht dazu führen [Lu und Springer, 1997; O'Toole et al., 1994; O'Toole et al., 1991; Ylanne et al., 1993]. Deletionen der membran-proximalen Sequenz der β -Untereinheit führen ebenfalls zur Integrin-Aktivierung, während weiter C-terminal gelegene Deletionen die Aktivierung blockieren [Crowe et al., 1994; Hughes et al., 1995; Lu et al., 2001]. Es wurde eine inhibitorisch wirkende Salzbrücke zwischen dem Arginin R995 der KXGFFKR-Sequenz des α IIb-Schwanzes und dem Aspartat D723 des KLLITIHDMotivs des $\beta 3$ -Schwanzes experimentell nachgewiesen [Hughes et al., 1996]. Dieser Befund ist jedoch nicht auf alle Integrin-Untereinheiten vollständig übertragbar. Auch andere Studien zeigen, daß die beiden Untereinheiten auch im Cytosol aneinander binden. Plasmon-Resonanz-Untersuchungen zeigten eine schwache Bindung ($K_d=7-50 \mu\text{M}$) zwischen den cytoplasmatischen Anteilen der α IIb- und $\beta 3$ -Untereinheiten [Vallar et al., 1999]. NMR-Analysen der cytoplasmatischen Bereiche des α IIb $\beta 3$ -Integrins zeigen, daß die beiden im Bereich der membranproximalen Helices über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen miteinander interagieren [Vinogradova et al., 2002]. Das bedeutet, daß die membranproximalen Bereiche der cytoplasmatischen Sequenz die α -helicale Form der transmembranären Bereiche fortführen. Der Rest der cytoplasmatischen Schwänze scheint flexibel zu sein. Studien zum Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen den markierten cytosolischen α L- und $\beta 2$ -Untereinheiten zeigten, daß die beiden assoziieren, wenn das Integrin inaktiv ist, daß die Interaktion jedoch gestört wird, sobald eine Aktivierung durch Ligandenbindung erfolgt [Kim et al., 2003a].

1.3.3 Regulation der Ligandenbindung / Aktivierungsmechanismen der Integrine

Die Affinität der Integrine für ihre Liganden kann durch verschiedene Prozesse reguliert werden. Einige Integrine wie das Plättchen-Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ und Leukocyten-spezifische β_2 -Integrine werden erst durch Signale aus dem Innern der Zelle aktiviert und entwickeln eine für die Bindung ausreichende Affinität für ihren extrazellulären Liganden (*inside-out signaling*). Die Affinität der Integrine für ihre Liganden ist nicht sehr hoch. Die Bindung zum Liganden wird durch Zusammenlagern (*clustern*) vieler Integrin-Moleküle verstärkt (Steigerung der Avidität), welches sowohl durch multivalente Liganden als auch durch laterale Assoziationen in der Plasmamembran sowie durch Interaktion mit dem Cytoskelett bewirkt werden kann. Die Ligandenbindung der Integrine ist von der Anwesenheit divalenter Kationen, wie z.B. Ca^{2+} , Mg^{2+} oder Mn^{2+} , abhängig. Diese haben ebenfalls einen Einfluß auf die Ligandenbindungsaffinität und Konformation der Integrine (Übersicht [Plow et al., 2000]).

Die Strukturdaten aus der Untersuchung der isolierten I-Domänen der α -Untereinheiten und der vollständigen extrazellulären Bereiche der Integrine $\alpha\text{v}\beta_3$ und $\alpha\text{IIb}\beta_3$ weisen darauf hin, daß sowohl die I-Domäne an sich als auch der gesamte extrazelluläre Bereich der Integrine eine Konformationsänderung vollzieht, wenn das Integrin aktiviert wird bzw. seinen Liganden bindet. Diese Konformationsänderung überträgt sich zwischen den Domänen über das gesamte Integrin-Molekül. Ein Modell, das von verschiedenen funktionellen und strukturellen Daten (Kristallstruktur und Elektronenmikroskopie) gestützt wird, schlägt eine Klappmesser-artige Öffnung eines inaktiven zur Membran geknickten Integrins in eine aktive gestreckte Form vor (*switchblade-like model*) [Beglova et al., 2002].

Die Aktivierung der Integrine durch Signale aus dem Innern der Zelle läßt sich ebenfalls mit diesem Modell erklären, da die Aufwärtsbewegung des gebeugten Integrins von einer Trennung der α - und β -Stielregionen voneinander begleitet ist, die ebenso zum Auslöser des Aufklappens des Integrins werden kann. So führt die Interaktion des cytosolischen Integrin-Aktivators Talin mit dem β_3 -Schwanz zum "Spreizen der Beine" der αIIb - und β_3 -Integrin-Untereinheit [Vinogradova et al., 2002].

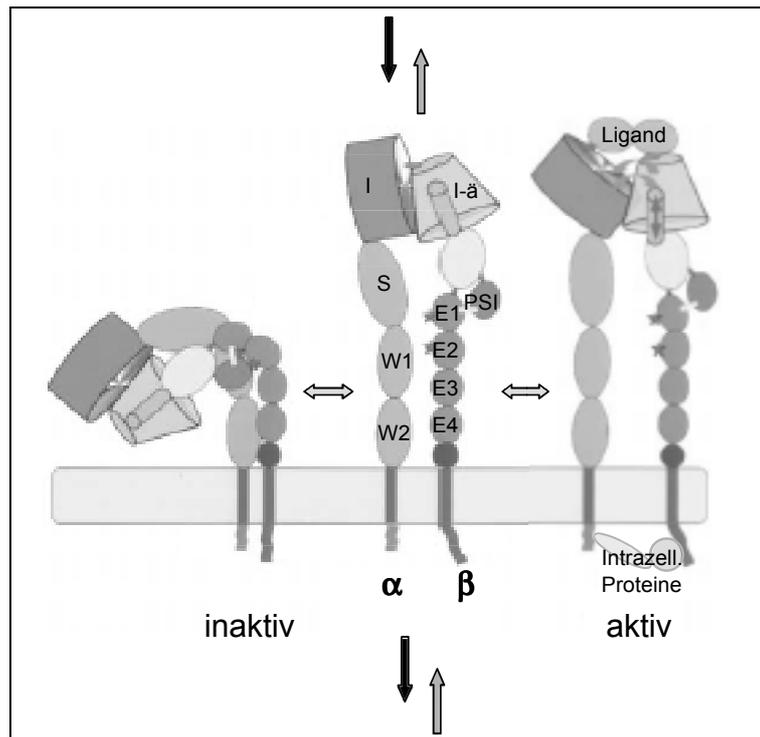


Abb.4 – Modell der Integrin-Aktivierung - bidirektionale Signalweiterleitung (modifiziert nach [Hynes, 2002])

Die Aktivierung eines Integrin-Dimers ist schematisch dargestellt. Die Domänen sind angedeutet (W1 = Wade-1, W2 = Wade-2, S = Schenkel, E1-4 = I-EGF-Domänen, I = I-Domäne, I-ä = I-ähnliche Domäne, PSI = PSI-Domäne). Weitere Erklärungen befinden sich im Text.

1.3.4 Physiologische Funktionen der Integrine

Die Integrine sind an solch grundsätzlichen zellulären Prozessen wie der Adhäsion (Übersicht [Geiger et al., 2001]) und Migration (Übersicht [Ridley et al., 2003]) beteiligt, da sie entscheidenden Einfluß auf den Aufbau des Aktin-Cytoskeletts und die Verankerung des Cytoskeletts mit Kontaktstellen zur extrazellulären Umgebung haben (Abb.5).

Die Bindung von Liganden an Integrine hat außerdem Einfluß auf pH-Wert, intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, Lipidmetabolismus und Genexpression der Zelle (Übersicht [Akiyama, 1996]). Die Integrine geben Signale weiter, die Proliferation, Differenzierung oder Apoptose bewirken können (Übersicht [Giancotti und Ruoslahti, 1999]). Sie wirken mit Signalen anderer Rezeptoren wie z.B. der Wachstumsrezeptoren zusammen, modulieren Signale anderer Rezeptoren und werden auch von Signalen anderer Rezeptoren reguliert (Übersicht [Miranti und Brugge, 2002]). Je nachdem zu welchem Zeitpunkt man sich welches Organ oder Funktionskompartiment in einem komplexen Organismus anschaut, findet man viele verschiedene Aus-

prägungen der Integrin-Funktionen, deren Zahl nochmals durch die verschiedenen Integrine und die Vielzahl ihrer Liganden vergrößert wird. Immer jedoch kann man die Funktionen auf die zellulären Grundmechanismen Adhäsion/Migration sowie Proliferation/Differenzierung/Apoptose reduzieren.

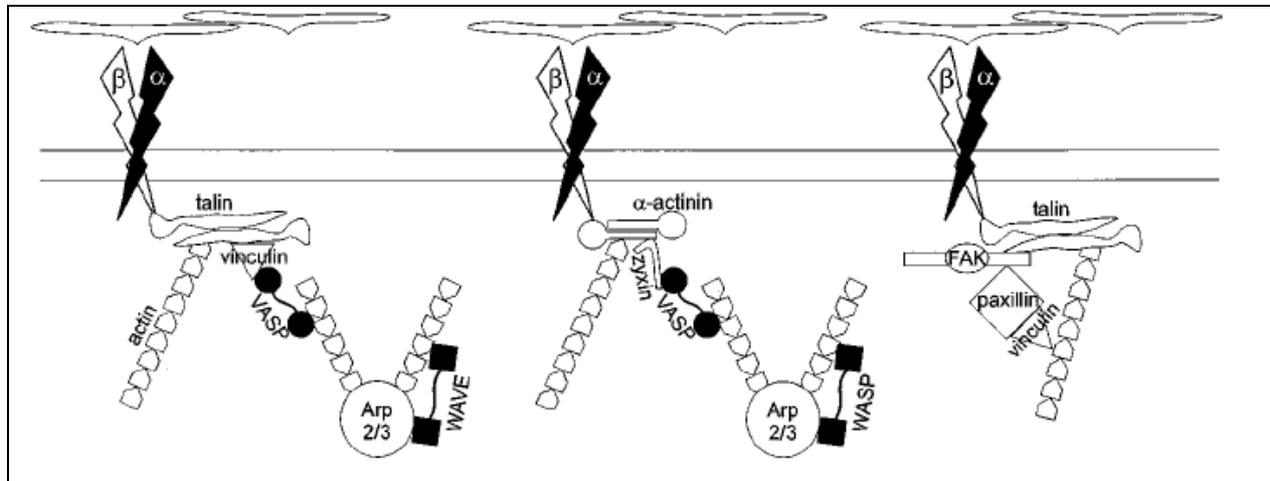


Abb.5 – Assoziation der Integrine mit dem Cytoskelett (aus [Juliano, 2002])

Integrine, die mit ihrem extrazellulären Liganden Kontakte eingehen, lagern sich in sogenannten fokalen Adhäsionen zusammen. Dies sind starke punktuelle Verknüpfungsstellen zwischen der extrazellulären Matrix und dem intrazellulären Cytoskelett. Die β -Integrin-Untereinheiten binden direkt an Talin oder α -Actinin, welche das Integrin mit dem F-Aktin-Filamenten des Cytoskeletts verbinden. Über Vinculin und Zyxin stehen Integrine auch mit VASP und wachsenden bzw. im Umbau befindlichen Aktin-Filamenten in Kontakt. Arp2/3 steht für *actin-related protein complex 2/3*.

Im Gehirn und zentralen Nervensystem spielen die Integrine ebenfalls eine wichtige Rolle (Übersicht [Milner und Campbell, 2002]). Die $\beta 1$ -Integrine sind für den Aufbau und die Struktur der Basalmembran der Hirnhaut und die Verankerung der Endfüße der Gliazellen auf dieser Matrix verantwortlich [Graus-Porta et al., 2001]. Außerdem belegen verschiedene Studien, daß Integrine beim Lernen und Erinnern einen wichtigen Beitrag zur Bildung von Synapsen und zur synaptischen Signalübertragung leisten (Übersicht [Milner und Campbell, 2002]).

1.3.5 Funktionen der Integrine bei pathologischen Prozessen

Beim Menschen sind verschiedene Erbkrankheiten bekannt, die auf Mutationen in Integrin-Untereinheiten zurückgeführt werden können. Bei der autosomal-rezessiv vererbten Adhäsionsdefizienz der Leukozyten (*leucocyte adhesion deficiency type 1* LAD1) führen Mutationen der $\beta 2$ -Integrin-Untereinheit zu einer beeinträchtigten Extra-

vasation der Leukocyten [Anderson und Springer, 1987]. Mutationen in der α IIb- oder β 3-Integrin-Untereinheit des Plättchen-Integrins α IIb β 3 liegen der autosomal-rezessiv vererbten Bluterkrankheit Glanzmann's Thrombastenie zugrunde [Nair et al., 2002; Tomiyama, 2000], da die Plättchen nicht mehr ausreichend an Fibrinogen und Fibrin binden können. Die autosomal-rezessiv vererbte Epidermolysis bullosa (*junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia* PA-JEB), eine Erkrankung, bei der die Haut Blasen wirft, ist auf Mutationen in den Genen der α 6- bzw. β 4-Integrin-Untereinheit zurückzuführen [Pulkkinen et al., 1997], die zu einer gestörten Adhäsion zwischen Basalmembran und der basalen Keratinocyten-Schicht führen. Mutationen der α 7-Integrin-Untereinheiten führen zu einer milden Form der fortschreitenden Muskeldystrophie [Hayashi et al., 1998; Mayer et al., 1997].

Integrine sind auch Rezeptoren für verschiedene Bakterien wie *Borrelia burgdorferi* (Auslöser der Lyme-Krankheit), *Bordetella pertussis* (Erreger des Keuchhustens), *Yersinia* spp. (z.B. *Y. pestis*, Erreger der Pest) [Kerr, 1999]. Diverse Viren wie Adenovirus, Cocksackievirus, Echovirus, Virus der Maul- und Klauen-Seuche, HIV, Hantavirus und Papillomavirus nutzen Integrine als Einfallstore [Triantafilou et al., 2001]. Weitere mehr oder weniger schädlich wirkende Liganden der Integrine sind zum einen Inhibitoren der Plättchenaggregation, die von Egel und Zecken sekretiert werden, und zum anderen die Disintegrine der Schlangengifte [Andrews und Berndt, 2000].

Integrine spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen Aspekten von Krebsentstehung, Wachstum und Versorgung maligner Zellen sowie Metastasenbildung. Bis jetzt wurden keine Mutationen in Integrin-Untereinheiten gefunden, die mit Krebs in Verbindung gebracht werden können. Kürzlich wurde allerdings eine aktivierende heterozygote Mutation der β 1-Integrin-Untereinheit beschrieben, die zur Ausbildung eines squamösen Zellkarzinoms der Zunge (*squamous cell carcinoma* SCC4) führt [Evans et al., 2003]. In den meisten Fällen scheinen jedoch die Integrin-Expressionsmuster in Tumoren verändert zu sein, was zu veränderter Zelladhäsion und -migration und letztlich zur Metastasenbildung führt [Brakebusch et al., 2002]. Die metastasierenden Zellen erlangen die Fähigkeit, ohne Adhäsionskontakte zur extrazellulären Matrix oder zu anderen Zellen zu überleben: ein Phänomen, das man als Adhäsions-unabhängiges Wachstum bezeichnet [Parise et al., 2000]. Außerdem spielen die Integrine

eine Rolle bei der Ausbildung von Blutgefäßen, was sie zu Zielen in der anti-Tumorthherapie macht [Brooks et al., 1994; Kim et al., 2000; Senger et al., 1997].

1.3.6 Signaltransduktion der Integrine

Die Integrine besitzen keine intrinsische enzymatische Aktivität, sind jedoch zur Initiation und Weiterleitung von Signalen in der Lage, da sie mit einer Vielzahl von Proteinen sowohl über ihren transmembranären Bereich als auch über ihre cytoplasmatischen Schwänze interagieren können (Übersicht [van der Flier und Sonnenberg, 2001]).

Integrine sind in der Lage, direkt Signalwege zu initiieren. Die Integrin-vermittelte Adhäsion geht mit einem Anstieg an Tyrosin-Phosphorylierungen einher [Kornberg et al., 1991], wobei vor allem die Phosphorylierung der FAK (*focal adhesion kinase*) mit der Adhäsion korreliert [Hanks et al., 1992; Schaller et al., 1992]. Die Integrine können über verschiedene Wege MAPK aktivieren (Abb.6A). Zum einen können einige Integrine über die laterale Assoziation der α -Integrin-Untereinheit mit dem transmembranären Protein Caveolin die Kinase Fyn aktivieren [Wary et al., 1998], was nachfolgend zur Phosphorylierung und Aktivierung der Kinase Shc, Rekrutierung des Adapterproteins Grb-2, Bindung des Ras-Austauschfaktors Sos, Aktivierung der GTPase Ras (Guanosintriphosphat), Aktivierung der Kinase Raf, Aktivierung der Kinase MEK (MAP/ERK-Kinase) und letztlich zur Aktivierung von ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) führt (Abb.6A rechts). Zum anderen kann die Integrin-Aktivierung zur Rekrutierung und Autophosphorylierung der FAK führen, was eine Bindungsstelle für die Tyrosin-Kinase Src schafft, die FAK an weiteren Stellen phosphoryliert, wodurch der Adapter Grb-2 binden und die ERK/MAPK-Kaskade auslösen kann (Übersicht [Schlaepfer et al., 1999]). An FAK bindet auch das Adapter-Protein Cas, das von FAK und Src phosphoryliert werden kann, wodurch Bindungsstellen für einen Adapter-Austauschfaktor-Komplex für die GTPase Rap1 entstehen. Rap1 kann die Kinase Raf aktivieren, die wiederum MEK und ERK sowie JNK aktivieren kann (Abb.6A links, Übersicht [Vuori, 1998]).

Die Integrine können durch Mitglieder der Rho-Familie der Ras-GTPasen aktiviert werden (Übersicht [Parise et al., 2000]) und sie können diese wiederum aktivieren. Die Mitglieder der Rho-Familie sind an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt, von besonderer Bedeutung sind sie jedoch bei der Regulation des Aktin-Cytoskeletts (Übersicht [Kjoller und Hall, 1999]) (Abb.6B). RhoA ist für die Ausbildung von Streiß-

fasern verantwortlich, Rac für die Bildung von Lamellipodien und Cdc42 für die Bildung von Filopodien. RhoA kann über das Effektor-Protein Rho-assoziierte Kinase (ROK), Rac und Cdc42 über die p21-aktivierte Kinase PAK die LIM-Kinase (LIMK) aktivieren, was zur Phosphorylierung und Inaktivierung des Aktin-depolymerisierenden Proteins Cofilin führt (Übersicht [Juliano, 2002]). Über die Adapterproteine WASP [Higgs und Pollard, 1999] und WAVE [Miki et al., 2000] sind Rac und Cdc42 mit dem Arp2/3-Komplex, der bei der Ausbildung von Aktin-Netzwerken eine entscheidende Rolle spielt, verbunden, während RhoA über das Protein mDia1 Einfluß auf die Bildung von Streßfasern nimmt [Watanabe et al., 1999].

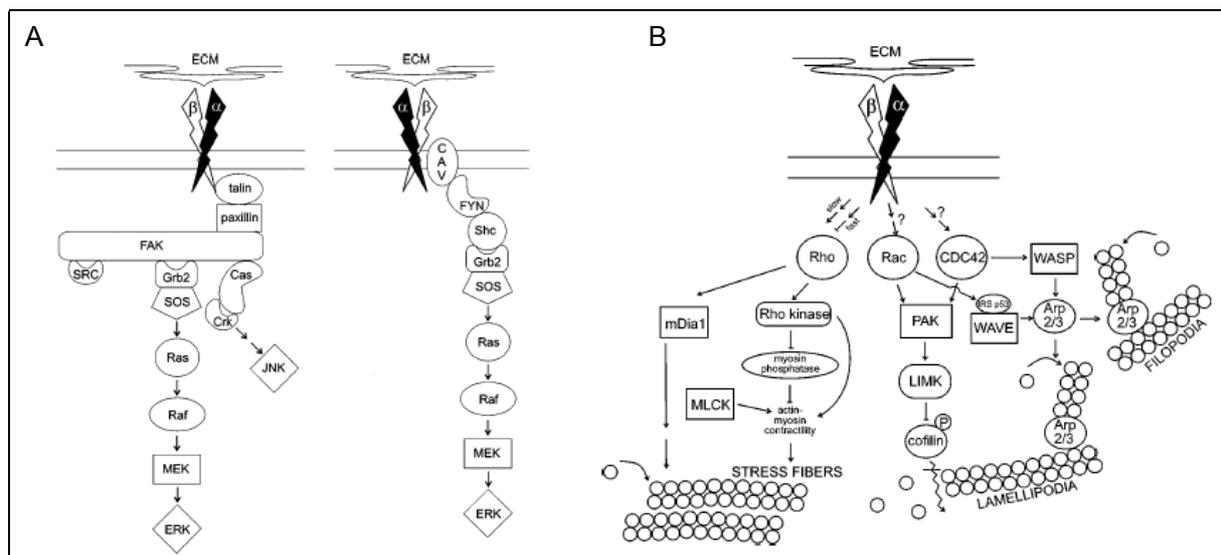


Abb.6 – Direkte Signalwege der Integriane (aus [Juliano, 2002])

Verwendete Abkürzungen: ECM = extracellular matrix

A Zwei Modelle für die Aktivierung der ERK/MAPK-Kaskade durch Integriane:

Bei dem linken Modell führt die Ligandenbindung zur Aktivierung und Autophosphorylierung der FAK. Dies führt zur Bildung einer Bindungsstelle für die Tyrosin-Kinase Src, die FAK an weiteren Stellen phosphoryliert. Das ermöglicht Grb2 die Bindung, wodurch schließlich Raf, MEK und ERK aktiviert werden. Ein weiterer Weg führt über Cas und das Adapterprotein Crk zur Aktivierung der JNK. Das Modell auf der rechten Seite zeigt die Bindung der Integrin-Untereinheit an Fyn über Caveolin, die bei manchen Integrienen zur Aktivierung von Fyn und Shc führt.

B Modulation des Aktin-Cytoskeletts durch Integriane über die Rho-GTPasen:

Integriane können die Aktivität von Rho, Rac und Cdc42 auf bislang nicht geklärte Weise modulieren. Cdc42 bindet WASP um den Arp2/3-Komplex zu aktivieren und Filopodien-Bildung auszulösen. Rac bindet über das Insulin-Rezeptor-Substrat IRSp53 WAVE, welches ebenfalls den Arp2/3-Komplex aktiviert und führt zur Ausbildung von Lamellipodien. Rho aktiviert die Rho-Kinase, wodurch die Myosin-Phosphatase gehemmt wird, und es aktiviert die MLCK (myosin light-chain kinase). Außerdem assoziiert Rho mit mDia, was letztlich zur Bildung von Aktin-Streßfasern führt. Die Aktivierung von PAK durch Rac resultiert in der Aktivierung der LIM-Kinase (LIMK) und Inhibition des Aktin-depolymerisierenden Proteins Cofilin.

Integrine können die Signalwege anderer Rezeptoren wie z.B. von Wachstumsfaktor-rezeptoren, G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren und Cytokin-Rezeptoren modulieren. Die Modulation der MAPK-Kaskade, die durch Wachstumsfaktorrezeptoren ausgelöst wird, erfolgt auf drei verschiedenen Ebenen: auf der Ebene der Aktivierung des Wachstumsfaktorrezeptors, auf der Ebene der Signalweiterleitung nach Aktivierung des Rezeptors und auf der Ebene der Translokation der aktivierten ERK vom Cytosol in den Kern (Übersicht [Juliano, 2002]) (Abb. 7A). Eine direkte Interaktion zwischen Integrinen und Wachstumsfaktorrezeptoren wurde für $\alpha\beta3$ mit dem PDGF-R (*platelet-derived growth factor receptor*) gezeigt [Schneller et al., 1997]. Die Vermittlung der Interaktion von Integrinen mit Wachstumsfaktorrezeptoren scheint über die FAK bzw. assoziierte Proteine, die an Wachstumsfaktorrezeptoren binden können, ebenfalls möglich zu sein [Renshaw et al., 1999].

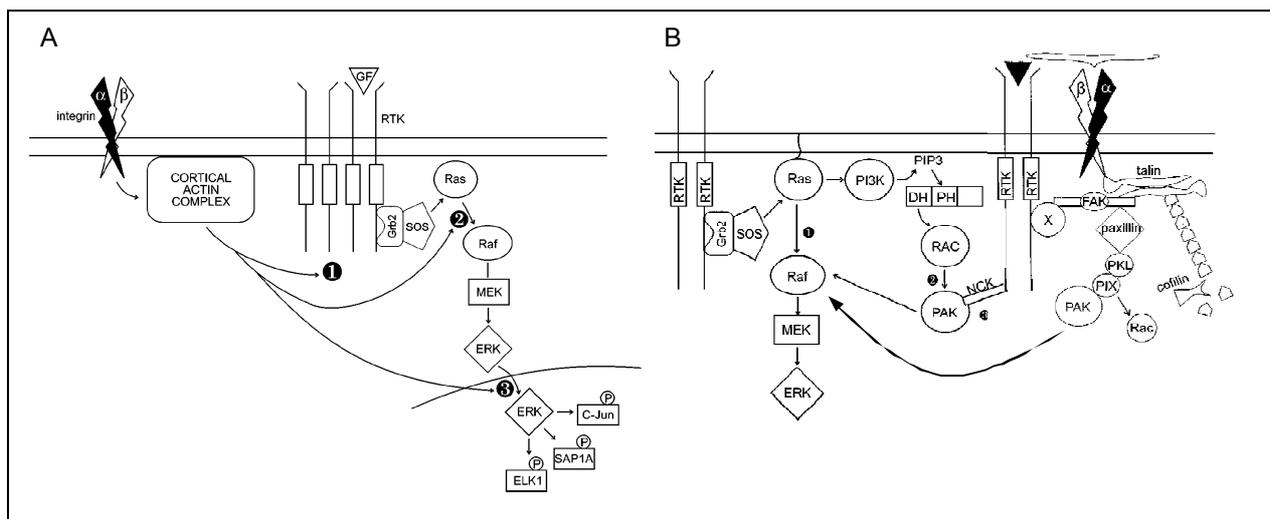


Abb.7 – Modulation des MAPK-Signalweges (modifiziert nach [Juliano, 2002])

Verwendete Abkürzungen: GF = growth factor, PAK = p21-aktivierte Kinase, RTK = Rezeptortyrosinkinase

A Der Integrin-abhängige cytoskelettale Komplex kann Signale unterhalb des Wachstumsfaktorrezeptors (RTK) an verschiedenen Stellen beeinflussen: 1) Aktivierung des Rezeptors selbst, 2) Weiterleitung des Signals 3) Translokation von Signalkomponenten in den Kern.

B Die effiziente Aktivierung von Raf bedarf der Phosphorylierung durch PAK. PAK wird sowohl durch die Aktivierung von Rac aktiviert, das durch den DH/PH-Domänen tragenden Austauschfaktor Vav aktiviert wird, als auch durch Integrin-vermittelte Signale über Paxillin. Die mit 1-3 gekennzeichneten Verbindungen sind von Zelladhäsion abhängig.

Abbildung 7B zeigt das Zusammenspiel und Ineinandergreifen der Signale, welche die MAPK-Kaskade betreffen, etwas detaillierter. Die effektive Aktivierung der Kinase Raf bedarf der Phosphorylierung durch PAK [King et al., 1998]. Ras aktiviert die

Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K), die unter anderem Phosphatidyl-Inositol-Trisphosphat (PIP₃) bildet, welches zur Aktivierung des DH-/PH-Domänen-tragenden Rac-Austauschfaktors Vav führt. Rac aktiviert PAK, das über den Adapter Nck zum Wachstumsfaktorrezeptor rekrutiert werden kann, und PAK phosphoryliert und aktiviert Raf. Von den Integrinen kommen weitere Signale: die Aktivierung von Rac und Cdc42 führt zur Aktivierung der PAK, außerdem kann Paxillin die GTPase Pix binden, die wiederum über den Adapter Pkl PAK bindet und aktiviert.

1.3.7 Modulation der Integrine durch Phosphorylierung

Die meisten β -Integrin-Untereinheiten tragen phosphorylierbare Tyrosinreste in den konservierten NPXY- und NXXY-Motiven, jedoch wurde nur für die β 1- und β 3-Integrin-Untereinheit eine Tyrosin-Phosphorylierung in diesen Motiven nachgewiesen [Law et al., 1996; Tapley et al., 1989].

Die cytoplasmatischen Schwänze der meisten Integrine tragen außerdem potentielle Serin-/Threonin-Phosphorylierungsstellen, aber in den meisten Fällen ist die Regulation und Funktion der Phosphorylierung nicht verstanden. Das Integrin α 4 β 1 wird an Serin 988 der α 4-Integrin-Untereinheit durch die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert und die Phosphorylierung blockiert die Bindung von Paxillin [Goldfinger et al., 2003]. Die Aktivierung von T-Zellen führt zu Serin- und Threonin-Phosphorylierungen des β 2-Integrins [Valmu et al., 1999]. Die eng miteinander verwandten Laminin-Rezeptoren α 3 β 1- und α 6 β 1-Integrin werden an Serin- und an Tyrosinresten phosphoryliert [Hogervorst et al., 1993; Zhang et al., 2001b]. Zhang et al. haben gezeigt, daß die Mutation der Serin-Phosphorylierungsstelle der α 3-Integrin-Untereinheit (Ser1042Ala) die Tyrosinphosphorylierung von FAK, Paxillin und Cas verändert, zu veränderter Zellmorphologie nach Spreiten auf Laminin-5 und zu gesteigerter ungerichteter Migration von CHO-Zellen führt [Zhang et al., 2001b]. Obwohl α 6 β 1 in vitro von der Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert wird [Gimond et al., 1995] und die Phosphorylierung in vivo durch Behandlung mit Phorbolestern gesteigert werden kann, sind die Kinasen, die α 3 β 1 und α 6 β 1 in vivo phosphorylieren, nach wie vor nicht bekannt [Zhang et al., 2001b].

1.4 Das $\alpha 3\beta 1$ -Integrin

Das Ligandenspektrum des $\alpha 3\beta 1$ -Integrins wird kontrovers diskutiert und scheint u.a. vom untersuchten Zelltyp abhängig zu sein. Es wurde als Rezeptor für Kollagen-I und -IV, Fibronectin, Laminin-1 [Elices et al., 1991; Gehlsen et al., 1989; Gehlsen et al., 1988; Wayner und Carter, 1987], Laminin-2 [Tomaselli et al., 1993], Laminin-5 [Carter et al., 1991; Delwel et al., 1994], Laminin-8 [Fujiwara et al., 2001], Laminin-10/-11 [Kikkawa et al., 1998], Reelin [Dulabon et al., 2000], Thrombospondin [DeFreitas et al., 1995; DiPersio et al., 1995] und Entactin/Nidogen [Dedhar et al., 1992] beschrieben.

Das $\alpha 3\beta 1$ -Integrin wird in verschiedenen Zelltypen in Zell-Zell-Kontakten gefunden. Es wurde postuliert, daß es in Keratinocyten an $\alpha 2\beta 1$ -Integrin bindet und damit eine Rolle bei der Zell-Zell-Interaktion übernimmt [Symington et al., 1993]. Die homophile Bindung von Integrin $\alpha 3\beta 1$ wurde mit gereinigtem $\alpha 3\beta 1$ -Integrin nachgewiesen und die Adhäsion von Zellen auf gereinigtem $\alpha 3\beta 1$ -Integrin konnte mit spezifischem Antikörper gegen $\alpha 3\beta 1$ inhibiert werden [Sriramarao et al., 1993].

Das $\alpha 3\beta 1$ -Integrin ist außerdem Rezeptor des bakteriellen Proteins Invasin von *Yersinia* spp. [Isberg und Leong, 1990] und des Kaposi-Sarcoma-assoziierten Herpesvirus [Akula et al., 2002].

Die $\alpha 3$ -Untereinheit bildet ausschließlich mit der $\beta 1$ -Untereinheit Dimere, wohingegen die $\beta 1$ -Untereinheit auch mit vielen anderen α -Untereinheiten assoziiert sein kann. Die $\alpha 3$ -Untereinheit liegt in zwei Spleißvarianten des cytoplasmatischen Anteils vor, die Isoform A besitzt 1051, die Isoform B 1066 Aminosäuren. Die cytoplasmatische Domäne ist bei der Isoform A 37 und bei der Isoform B 54 Aminosäuren lang. Die $\beta 1$ -Untereinheit umfaßt 779 Aminosäuren mit etwa 45 cytosolischen Resten.

Die Isoform A der $\alpha 3$ -Untereinheit ist immunhistologisch auf sämtlichen Geweben des adulten Organismus zu finden, im Gehirn wird sie jedoch nach de Melker et al. ausschließlich im Endothel kleiner Blutgefäße exprimiert [de Melker et al., 1997], während Pinkstaff et al. auf mRNA-Ebene die Expression in verschiedenen Hirnregionen in Neuronen nachweisen konnten [Pinkstaff et al., 1999]. Die Isoform A kann im Gegensatz zur Isoform B nach Aktivierung der PKC phosphoryliert werden [de Melker et al., 1997]. Die Expression der Isoform B beschränkt sich im adulten Organismus auf Gehirn und Herz, wobei sie im Herz nur in Endothelzellen der Venen auftritt, während die Isoform A in glatten Muskelzellen der Blutgefäße exprimiert wird [de Melker et al., 1997].

Das $\alpha3\beta1$ -Integrin wird schon früh während der Embryonalentwicklung exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Einwanderung des präsumptiven Mesoderms während der Gastrulation und der Gewebsorganisation während der Embryogenese [Whittaker und DeSimone, 1993]. Mäuse ohne $\alpha3\beta1$ -Integrin sterben kurz nach der Geburt [Kreidberg et al., 1996]. $\alpha3\beta1$ -Integrin ist essentiell für die Ausbildung der Basalmembran bei der Organogenese von Nieren und Lunge [Kreidberg et al., 1996] und für die Entwicklung der Basalmembran der Haut [DiPersio et al., 1997]. Die basalen Keratinocyten des Doppel-Knock-Outs der $\alpha3$ - und der $\alpha6$ - bzw. der $\beta4$ -Integrin-Untereinheit sind erstaunlicherweise weiterhin in der Lage zu differenzieren und zeigen einen relativ geordneten Aufbau der Epidermis [DiPersio et al., 2000], was entweder auf andere Integrine oder andere Adhäsionsrezeptoren zurückzuführen ist. Der Doppel-Knock-Out der $\alpha3$ - und der $\alpha6$ -Integrin-Untereinheit zeigt den Synergismus der beiden Untereinheiten von Laminin-Rezeptoren, erhellt jedoch auch die Beteiligung des $\alpha3\beta1$ -Integrins an Entwicklungsprozessen während der Embryogenese, wie z.B. der Trennung der Finger, dem Verschließen des Neuralrohrs und der Ausbildung von Laminae im Gehirn und im Auge [De Arcangelis et al., 1999].

Das $\alpha3\beta1$ -Integrin spielt eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung. Es ist ein Rezeptor für Reelin, eine Komponente der extrazellulären Matrix des ZNS (zentrales Nervensystem) [Dulabon et al., 2000] und entscheidend für den Kontakt zwischen den Reelin-sezernierenden Cajal-Retzius-Zellen und Neuronen. Dieser Kontakt bewirkt den Migrationsstop der Neuronen und die korrekte Schichtenbildung der Neuronen im Cortex [Dulabon et al., 2000]. Es spielt eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion von Neuroblastomzellen und dem Auswachsen der Neuritenfortsätze auf Laminin-5 [Smith et al., 1996] und vermittelt den Kontakt zwischen Neuronen und Gliazellen während der Migration der Nervenzellen bei der Corticogenese [Anton et al., 1999]. In vivo scheint diese Interaktion jedoch nicht ausschließlich durch $\beta1$ -Integrine vermittelt zu werden, da der $\beta1$ -Integrin-Knock-Out in Mäusen die Migration von Neuronen nicht beeinträchtigt [Fassler und Meyer, 1995]. Das $\alpha3\beta1$ -Integrin ist bei der Konsolidierung von Langzeitpotenzierung im Hippocampus beteiligt [Kramar et al., 2002].

Das $\alpha3\beta1$ -Integrin wird in den Axonen und Wachstumskegeln von sympathischen Neuronen exprimiert und agiert dort als Haupt-Rezeptor für Thrombospondin-1 während der Entwicklung des Nervensystems [DeFreitas et al., 1995]. In *Xenopus* wurde die Anreicherung des $\alpha3\beta1$ -Integrins in den Nervenendigungen von muskel-

innervierenden Nerven nachgewiesen und seine Beteiligung beim Aufbau der neuromuskulären Endplatte und der Übertragung von Signalen postuliert [Cohen et al., 2000]. Die aus einem Pheochromocytom aus dem Nebennierenmark der Ratte stammende Zelllinie PC12 exprimiert hauptsächlich die β 1-Integrine α 1 β 1 und α 3 β 1 [Tomaselli et al., 1990]. Diese Zelllinie ist unter Einwirkung von Wachstumsfaktoren in der Lage, zu sympathischen Neuronen zu differenzieren [Greene und Tischler, 1976] und dient häufig als Modell für Untersuchungen zur neuronalen Differenzierung.

Veränderungen der Expression des α 3 β 1-Integrins lassen sich in verschiedenen Tumoren beobachten und werden zum Teil als Prognosefaktoren benutzt. Je nach Ursprung des Tumors beobachtet man einen Anstieg oder ein Absinken bzw. völliges Ausbleiben der α 3 β 1-Expression. So ist z.B. in Astrocytomen [Paulus et al., 1993], Melanomen [Schumacher und Schaumburg-Lever, 1999] und Gliomen [Kishima et al., 1999] die Expression erhöht, während in Tumoren der Lunge [Adachi et al., 1998], der Eierstöcke [Bartolazzi et al., 1993], der Brust [Pignatelli et al., 1991] und des Darms [Stallmach et al., 1992] die Expression reduziert ist.

1.4.1 Interaktionspartner des α 3 β 1-Integrins

Das α 3 β 1-Integrin steht mit einigen membranständigen Proteinen in engem Kontakt. Dabei sind vor allem die Tetraspanine zu nennen, welche die Membran viermal durchspannen und eine Rolle bei der Modulation der Integrin-abhängigen Adhäsion und Migration zu spielen scheinen (Übersicht [Berditchevski, 2001; Hemler, 2001]). Das α 3 β 1-Integrin assoziiert so mit CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82, NAG2, CO-029 und besonders eng mit CD151 (Übersicht [van der Flier und Sonnenberg, 2001]). An den intrazellulären Bereich des Tetraspanins CD151 bindet in einigen Fällen die Phosphatidyl-Inositol-4-Kinase (PI4K) [Berditchevski et al., 1997b] und PKC [Zhang et al., 2001a] und koppelt so das Integrin an Signatransduktionsketten.

Die Integrine interagieren mit dem transmembranären Protein Caveolin [Wary et al., 1998; Wei et al., 1999] und sind darüber mit der Kinase Fyn assoziiert. In einigen Fällen, nicht jedoch beim α 3 β 1-Integrin, bewirkt die Integrin-Ligandenbindung die Aktivierung von Fyn, Rekrutierung und Phosphorylierung von Shc, wodurch Grb2 rekrutiert und der Ras-ERK-Signalweg initiiert werden kann, was letztlich zur Proliferation der Zellen führt [Wary et al., 1998].

Des weiteren sind Assoziationen mit dem Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (uPAR) (Übersicht [Ossowski und Aguirre-Ghiso, 2000; Reuning et al., 2003]), mit dem Transferrin-Rezeptor [Coppolino et al., 1995] und mit EWI-2 [Stipp et al., 2003] beschrieben worden, die eine regulatorische Funktion des $\alpha 3\beta 1$ -Integrins auf andere Rezeptoren nahelegen.

Das $\alpha 3\beta 1$ -Integrin assoziiert mit CD36 [Thorne et al., 2000], was die Migration zu fördern und Integrine in Membranmikrodomänen (*rafts*) zu lokalisieren scheint. Der Komplement-Regulator CD46 assoziiert mit Tetraspaninen und sämtlichen $\beta 1$ -Integrinen [Lozahic et al., 2000]. Eine weitere Assoziation besteht zwischen CD147, einem Mitglied der Ig-Superfamilie (Immunglobulin) und dem $\alpha 3\beta 1$ -Integrin [Berditchevski et al., 1997a]. Die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion ist noch nicht geklärt.

Dem $\alpha 3\beta 1$ -Integrin [Hodivala-Dilke et al., 1998] wird eine dominant-negative Wirkung auf andere Integrine zugeschrieben, da zu beobachten ist, daß bei Zellen, die kein $\alpha 3\beta 1$ -Integrin mehr exprimieren, die Adhäsion auf Fibronectin und Kollagen-IV, welche durch die in der Zelle verbliebenen Integrine vermittelt wird, stark erhöht ist [Hodivala-Dilke et al., 1998].

Die Funktion des $\alpha 3\beta 1$ -Integrins ist komplex und läßt sich nicht einfach auf Adhäsion oder die Weiterleitung eines Proliferations- oder Differenzierungssignals begrenzen. In den meisten bisher untersuchten Fällen scheint es Vorgänge zu modulieren, die von anderen Integrinen oder weiteren Rezeptoren des Adhäsionssystems aktiviert werden.

Für die Aufklärung des Mechanismus der regulatorischen Funktion des $\alpha 3\beta 1$ -Integrins ist vor allem die Klärung der Ereignisse an den cytoplasmatischen Schwänzen der Integrin-Untereinheiten von Interesse. Da die $\alpha 3$ -Untereinheit die Spezifität des $\alpha 3\beta 1$ -Integrins bestimmt, gilt das Augenmerk in dieser Arbeit den cytosolischen Interaktionspartnern dieser Untereinheit. Abbildung 8 stellt die bislang identifizierten Bindungspartner der cytosolischen Bereiche der $\alpha 3$ - und der $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit schematisch dar (Übersicht [van der Flier und Sonnenberg, 2001]), wobei erwähnt werden muß, daß nicht geklärt ist, ob die für die $\beta 1$ -Integrin-Untereinheiten in verschiedenen experimentellen Zusammenhängen beschriebenen Interaktionspartner auch an das $\alpha 3\beta 1$ -Heterodimer binden.

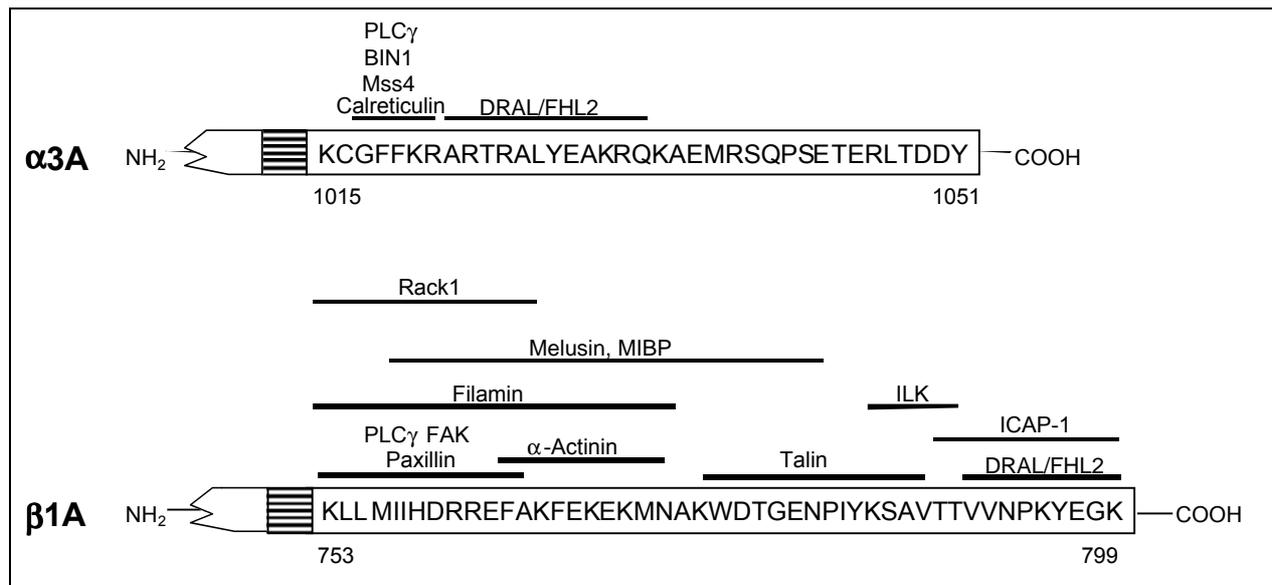


Abb.8 – Schematische Darstellung der cytosolischen Interaktionspartner der $\alpha 3A$ - und der $\beta 1A$ -Integrin-Untereinheit

Benutzte Abkürzungen: DRAL/FHL2 = down-regulated in rhabdomyosarcoma LIM protein/four and a half LIM protein 2, FAK = focal adhesion kinase, ICAP-1 = integrin cytoplasmic-domain associated protein 1, ILK = integrin-linked kinase, MIBP = muscle-specific $\beta 1$ -integrin-binding protein) PLC γ = Phospholipase C γ , Rack1 = receptor for activated C kinase 1.

Während bereits einige Interaktionspartner für die Isoform A der $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit etabliert sind, wie z.B. Talin [Calderwood et al., 1999; Patil et al., 1999; Pfaff et al., 1998], Filamin [Loo et al., 1998; Pfaff et al., 1998] und FAK [Chen et al., 2000; Schaller et al., 1995], sind nur wenige cytosolische Proteine wie Calreticulin [Rojiani et al., 1991], Phospholipase C γ (PLC γ) [Vossmeier et al., 2002], Mss4 – ein Guaninnucleotid-Austauschfaktor für Rab-Proteine – und BIN1 – ein wahrscheinlicher Tumorsuppressor [Wixler et al., 1999] für die Isoform A der $\alpha 3$ -Integrin-Untereinheit beschrieben. Alle diese Interaktionspartner scheinen an die innerhalb der α -Integrin-Untereinheiten konservierte membran-nahe KXGFFKR-Sequenz zu binden. Der einzige $\alpha 3$ -spezifische membran-distale Bindungspartner, der auch an Sequenzen der $\alpha 7$ - und verschiedene β -Integrin-Untereinheiten binden kann, ist das DRAL/FHL2-Protein (*down-regulated in rhabdomyosarcoma LIM protein/four and a half LIM protein 2*) [Wixler et al., 2000]. LIM-Proteine tragen ein stark konserviertes Motiv, das aus zwei Zink-Fingern besteht, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können und an der Transkriptionskontrolle beteiligt sind. Das DRAL/FHL2-Protein bindet an Presenilin-2, das bei der Alzheimer-Krankheit eine Rolle spielt [Tanahashi und Tabira, 2000]. Das Protein fungiert unter anderem als Koaktivator des Androgen-Rezeptors [Muller et al.,

2000] und ist in der Lage, Rho-induzierte Signale von der Zellmembran in den Zellkern zu übermitteln [Muller et al., 2002]. Es scheint des weiteren bei der Muskelentwicklung involviert zu sein und fördert durch die Interaktion mit β -Catenin die Differenzierung von Myoblasten [Martin et al., 2002]. Außerdem assoziiert es sowohl mit ERK2 [Purcell et al., 2004] als auch mit FAK [Gabriel et al., 2004].