

Strukturen von Integrinen und ihren Ligandkomplexen – Implikationen für das Medikamenten-Design und die Signaltransduktion

Kay-E. Gottschalk und Horst Kessler*

Integrine sind Schlüsselproteine bei der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion. Sie induzieren Signaltransduktion durch die Zellmembran und sind an vielen biologischen Prozessen wie der Regulation der Migration, Zellproliferation und Apoptose (natürlicher Zelltod) beteiligt. Diese Eigenschaften machen Integrine zu attraktiven Zielproteinen für Medikamente, besonders da Integrine beim Krebswachstum eine wesentliche Rolle spielen. Kürzlich wurde die Struktur der extrazellulären Domänen eines Integrin-Subtyps ohne und mit Ligand veröffentlicht. Diese Strukturen in Kombination mit elektronenmikroskopischen Bildern, NMR-Daten und theoretischen Molekül-Modellen führen zu einem besseren Verständnis der Signaltransduktion durch Integrine. Struktur-gestütztes Liganden-Design ist nun möglich.

1. Einleitung

Die Blockierung von Schlüsselproteinen der Signaltransduktion zur Entwicklung von Arzneimitteln ist das zentrale Thema der Postgenom-Ära. Dabei sind solche Rezeptoren Zielstrukturen für die meisten Arzneimittel, die wie die an G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), Ionenkanäle oder Integrine die Zellmembran durchdringen. Das größte Dilemma für das rationale Wirkstoff-Design besteht derzeit darin, dass für diese Zielproteine nicht genügend hochauflösende Strukturen vorhanden sind. In jüngster Zeit führte eine ganze Reihe von Strukturuntersuchungen an Integrinen zu neuen Erkenntnissen über die Ligandenbindung und die Signaltransduktion dieser wichtigen Rezeptorfamilie.

Integrine sind transmembrane Proteine, die an vielen zellulären Prozessen direkt oder indirekt beteiligt sind, z. B. Zell-Matrix-Adhäsion, Differenzierung, Proliferation, Stressantwort und Apoptose (natürlicher Zelltod).^[1] Sie koppeln intrazelluläre Signale mit extrazellulären Antworten und

umgekehrt. Integrine bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit, die nicht kovalent miteinander verknüpft sind. Für jede Untereinheit gibt es Subtypen. Verschiedene Subtyp-Kombinationen führen zu unterschiedlichen Spezifitäten in der Ligandenerkennung.

Diverse Signalwege sind mit Integrinen verknüpft.^[2] So sind Integrine Schlüsselproteine bei der Kommunikation zwischen Zellen, durch die viele Regulationsphänomene gesteuert werden. Integrine können aber auch extrazellulär mit Proteinen der eigenen Zelle reagieren (z. B. dem Urokinase-Rezeptor uPAR) oder intrazellulär mit Proteinen des Cytoskeletts. Die Homo- und Hetero-Oligomerisierung in den fokalen Adhäsions-Komplexen fügt eine weitere Dimension in das ohnehin komplexe Regulationsmuster der Integrine.

Zudem sind Integrine auch in viele weit verbreitete Krankheiten involviert. Ein Hauptgrund für das Interesse der Pharmaforscher an Integrinen liegt darin, dass bestimmte Integrin-Subtypen auf Tumorzellen überexprimiert werden, und sie dadurch attraktive Zielstrukturen für Krebsmedikamente sind.^[3, 4] Hier beschreiben wir, wie strukturelle Informationen über Integrine den Ansatz der Arzneimittelforschung vom Ligand-gestützten Design zum Protein-gestützten Design verschieben, und wie verschiedene Methoden, z. B. biochemische Untersuchungen, Röntgenbeugungsanalyse und NMR-Spektroskopie in Verbindung mit Elektronenmikroskopie und Computermethoden, neue Einsichten in die Signaltransduktion von Integrinen liefern.

2. Die Struktur der extrazellulären Domänen des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins

Integrine sind heterodimere Rezeptoren aus einer α - und einer β -Untereinheit, die je eine große extrazelluläre Domäne, eine Transmembran(TM)-Helix und eine kleine intrazelluläre Domäne pro Untereinheit enthalten.^[5] Kürzlich wurde von Xiong et al. mit der Struktur der extrazellulären Domäne von $\alpha_v\beta_3$ erstmals eine Integrin-Substruktur gelöst.^[6] In Übereinstimmung mit bereits früher erhaltenen elektronenmikroskopischen(EM) Bildern^[7] wurde ein ovaler Kopf und zwei lineare Stelzen-Regionen („Stalk“-Regionen) gefunden. Die Letzteren sind aber im Unterschied zu den EM-Untersuchungen in bestimmten Regionen abgeknickt (Abbildung 1, links). Dies könnte entweder ein Kristallisationsartefakt sein

[*] Prof. Dr. H. Kessler, K.-E. Gottschalk
Institut für Organische Chemie und Biochemie
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4 (Deutschland)
Fax: (+49) 89-289-13210
E-mail: horst.kessler@ch.tum.de

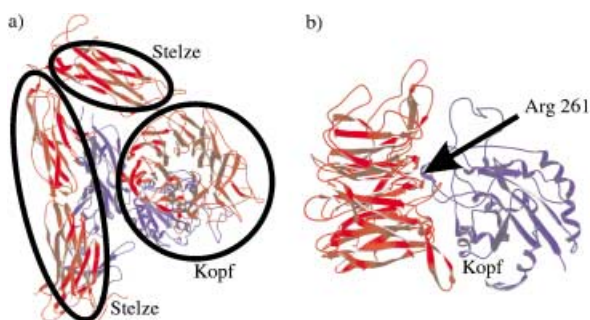


Abbildung 1. Struktur der extrazellulären Domäne von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin im Kristall. a) Die α -Untereinheit ist in rot gezeigt, die β -Untereinheit in blau. In der Stelzen-Region ist ein Knick zu sehen, der nicht in Einklang mit elektronenmikroskopischen Bildern steht. b) Die Kopfgruppen: In Übereinstimmung mit dem elektronenmikroskopischen Bild haben die Kopfgruppen eine eiförmige Gestalt. Eine enge Grenzfläche wird gebildet, wobei (β)-Arg261 sich in den Propeller der α -Untereinheit schiebt.

oder aber auch funktionelle Ursachen haben. Die Kopfgruppen der Integrine wurden als Hauptbindungs-Stelle identifiziert; ihre Struktur hat daher bevorzugtes Interesse für die Arzneimittelforschung (Abbildung 1, rechts).

Die Kopfgruppe der α -Untereinheit besteht aus einem siebenblättrigen Propeller; jedes Blatt besteht aus einem viersträngigen, antiparallelen β -Faltblatt (Abbildung 2 oben). Die β A-Domäne der β -Untereinheit zeigt eine Rossmann-Faltung, die auch in den $G\beta$ -Domänen und den α A-Domänen der Integrine gefunden wird: Helices umgeben ein zentrales sechssträngiges β -Faltblatt (Abbildung 2 Mitte). Der zentrale Rest zwischen den α - und β -Untereinheiten scheint das Arg261 der β -Untereinheit zu sein, das sich in den β -Propeller der α -Untereinheit einschiebt und den Komplex durch Kation- π -Wechselwirkung stabilisiert (Abbildung 2 unten).

3. Die Struktur eines Integrin-Ligand-Komplexes

Die Struktur der extrazellulären Domäne des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins ändert sich im Kristall beim Binden des RGD-Liganden $c(-RGDf[NMe]V-)^{[8]}$ nur sehr wenig.^[9] Dies ist vermutlich auf Kristallkontakte zurückzuführen, die große Bewegungen verhindern. Die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (RMSD = root mean square deviation) der Kopfgruppen in freier und komplexierter Form ist kleiner als 1 Å. Die α -Untereinheit ändert sich dabei kaum; die größten Veränderungen treten in der β -Untereinheit nahe der Bindungs-Site auf. Die im Integrin ohne Ligand nicht besetzte Metallion-abhängige Adhäsions-Site(MIDAS)-Region wird besetzt. Eine benachbarte Schleife verschiebt sich dabei in Richtung der α -Untereinheit, sodass der Ligand nun mit beiden Untereinheiten wechselwirken kann. Die Asparaginsäure des RGD-Liganden bindet das Metallion in der MIDAS-Region. Der einzige Rest des Liganden, der mit der α -Untereinheit reagiert, ist das Arginin – es bindet an eine negativ geladene Region von α_v .

Eine ungewöhnliche Eigenschaft der Ligandenbindungs-Stelle ist, dass sie praktisch keine hydrophoben Wechselwir-

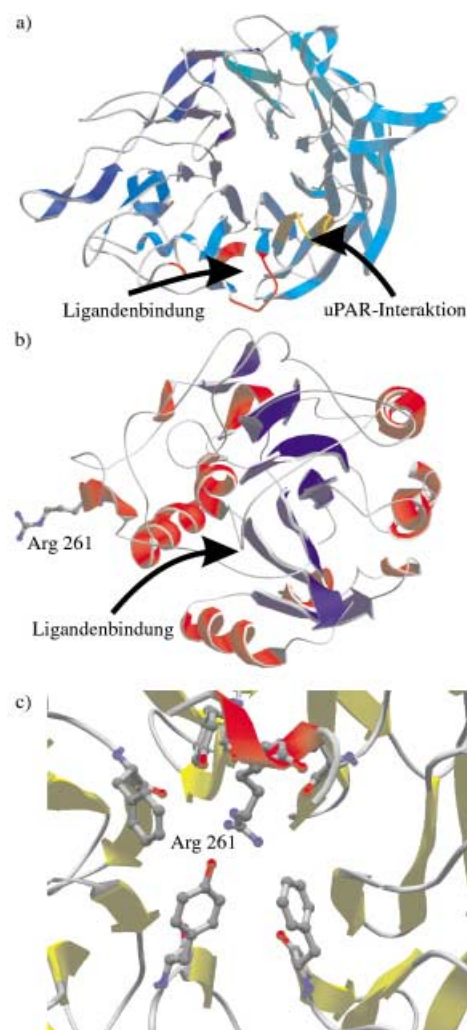


Abbildung 2. Die Interaktions-Stellen des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins: a) Der β -Propeller der α -Untereinheit. Die N-terminale Domäne der α -Untereinheit bildet einen siebenblättrigen Propeller. Die rote sowie die orangefarbene Schleife sind beim Binden des Liganden bzw. bei der Wechselwirkung mit dem Urokinase-Rezeptor uPAR (im Falle von $\alpha_v\beta_3$) involviert. b) Die β A-Domäne der β -Untereinheit. Arg261 schiebt sich in den β -Propeller der α -Untereinheit. Das Binden des Liganden erfolgt in der Nähe des Arg261. c) Kation- π -Wechselwirkung zwischen Arg261 von β_3 (rot) und umgebende Arylreste von α_v (gelb) stabilisieren die Interaktion der Kopfgruppen. Kation- π -Wechselwirkungen sind ideal für die Regulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen: Geringe Änderungen in der Position der involvierten Reste können die anziehende Wechselwirkung in Abstoßung verwandeln und damit große Konformationsänderungen induzieren.

kungen eingeht (Abbildung 3 oben). Nur D -Phe von $c(-RGDf[NMe]V-)$ ist in hydrophobe Wechselwirkungen involviert. Der zentrale Glycinrest liegt direkt auf der Integrin-Oberfläche und trägt vermutlich auch zur Stabilität des Komplexes bei. Die Substitution des Gly, z. B. durch Ala oder D -Ala, zerstört die Bindefähigkeit des Liganden mit $\alpha_v\beta_3$.^[10] Die wichtigsten Interaktionen bestehen zwischen dem positiv geladenen Argininrest und den negativ geladenen Seitenketten in der α -Untereinheit sowie zwischen dem anionischen Aspartatrest und dem Metallkation. Eine zusätzliche Stabilisierung erfolgt durch Wasserstoffbrücken zwischen der NH-Gruppe der Gly-Asp-Amidbindung und der Carbonylgruppe von (β)-R216 sowie zwischen der Asp-

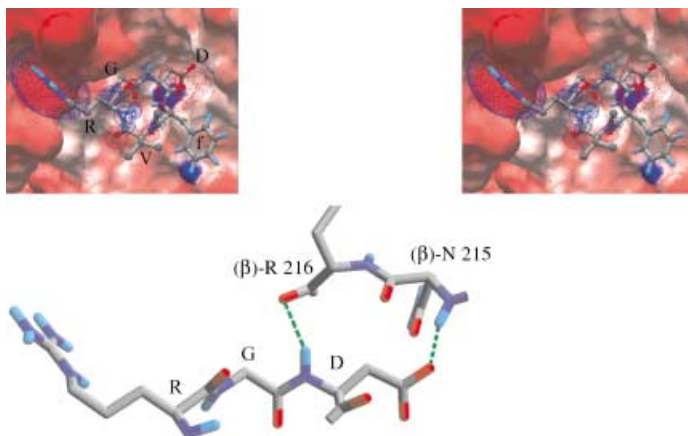


Abbildung 3. Struktur des Komplexes im Kristall. Oben: Stereobild: Wechselwirkung von c(RGDf[NMe]V-) mit $\alpha_v\beta_3$. Der Ligand scheint überwiegend durch elektrostatische Kräfte zu interagieren. R und D bilden eine Klammer, die an entgegengesetzten Ladungen im Protein bindet: Asp wechselwirkt mit einem Metallkation in der β -Untereinheit, Arg mit zwei Asp der α -Untereinheit. Gly bildet einen Kontakt zur Proteinoberfläche, D-Phe ist in hydrophobe Wechselwirkungen involviert. Weder die N-Methylgruppe noch die Seitenkette von (NMe)V haben Kontaktpunkte mit dem Protein. Unten: Die Interaktion wird weiter durch Wasserstoffbrücken zwischen dem Rückgrat des Proteins und dem Liganden stabilisiert. Das Wasserstoffatom der NH-Gruppe des Asp bildet eine Brücke zum Carbonylsauerstoffatom der CO-Gruppe des (β)-Arg216, während die Asp-Seitenkette nicht nur zum Metallion in der MIDAS-Region bindet, sondern auch durch eine Wasserstoffbrücke mit (β)-N215 Kontakt hat. MIDAS = Metallion-abhängige Adhäsions-Stelle.

Seitenkette und der NH-Gruppe von (β)-N215 (Abbildung 3 unten). Dies bestätigt frühere Untersuchungen an retroinversen Peptiden, bei denen eine Beteiligung des Peptidrückgrats an Bindungen nachgewiesen wurde.^[11]

Der Ligand ist in eine flache Furche eingebettet. Große Teile des Liganden haben praktisch keinen Kontakt mit dem Protein; der Asp- und Arg-Rest des RGD-Liganden gleichen einer elektrostatischen Klammer, die an die geladenen Regionen des Proteins geheftet ist. Normalerweise binden Liganden über van-der-Waals-Wechselwirkungen an hydrophobe Taschen mit großen Kontaktflächen.

4. Untersuchungen zur Bindung an das freie Integrin

Noch bevor die Struktur des Integrin-Komplexes im Kristall veröffentlicht wurde, führten wir ausgehend von kristallinem freiem Integrin Modell-Rechnungen durch, um Konformationsänderungen vorhersagen zu können, die mit dem Binden eines Liganden einhergehen.^[12] Grundlage für diese Rechnungen waren folgende Überlegungen: In ausgedehnten rationalen Design-Untersuchungen auf Basis des Liganden („räumliches Screening“) war es gelungen, Selektivität zwischen verschiedenen α - und β -Integrin-Subtypen zu erhalten.^[13] Stand ursprünglich die Unterscheidung von $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_{Ib}\beta_3$ im Vordergrund, wurden später die Subtypen $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, und $\alpha_v\beta_6$ diskriminiert.^[14] Auch zwischen den nicht RGD-erkennenden Integrinen $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_4\beta_7$ konnte unterschieden

werden.^[15] Das belegt, dass der Ligand mit beiden Subtypen interagiert.

Es wurde frühzeitig postuliert, dass gebundenes Ca^{2+} in der MIDAS-Region der α A-Domäne der β_3 -Integrin Untereinheit mit dem Aspartatrest des RGD-Peptids und dem Rezeptor interagiert.^[5, 16, 17] Überraschenderweise enthielt kristallines $\alpha_v\beta_3$ in der MIDAS-Region kein Metallion, dafür aber in der nahegelegenen adMIDAS-Region (Nachbar-Region). Weitere Untersuchungen zeigten, dass der N-terminale β -Propeller der α -Untereinheit auch in die Ligandenbindung involviert ist und dass der Argininrest der RGD-Sequenz in dieser Region bindet.^[18, 19] Während der Abstand zwischen dem Argininrest und dem Asparaginsäurerest bei α_v -selektiven RGD-Peptiden etwa 13 Å groß ist,^[8] beträgt der kleinste Abstand zwischen dem Ca^{2+} , das in der adMIDAS-Region gebunden ist, und dem β -Propeller in der Untereinheit α_v etwa 17 Å. Eine Überlagerung der β A-Domäne von β_3 und der I-Domäne des Integrins α_2 zeigte, dass sich die beiden Strukturen sehr ähnlich sind (Abbildung 4).^[12] Die Bindung

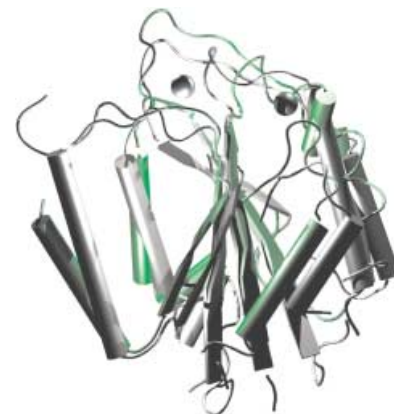


Abbildung 4. Überlagerung der I-Domäne der Kollagen-assoziierten α_2 -Integrin-Untereinheit (grau) mit der β A-Domäne der Integrin-Untereinheit β_3 (grün). Die Metallionen sind als Kugeln dargestellt: Die graue Kugel zeigt das Metallion in der MIDAS-Region von α_2 , die grüne Kugel das Ion in der adMIDAS-Region von β_3 . Die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichungen der überlagerten Rückgrat-Atome ist 1.6 Å, trotz der großen Unterschiede in der Metallion-Position.

des Liganden erfolgt unter Bewegung des Ca^{2+} -Ions und der MIDAS-Region bei der I-Domäne von α_2 , wie durch die Analyse der Strukturen der freien I-Domäne von α_2 und ihres Komplexes mit Kollagen nachgewiesen wurde.^[20] Unter der Annahme einer ähnlichen Strukturveränderung in β_3 konnten wir noch vor der Publikation der Struktur den Komplex mit einem Liganden modellieren.

5. Vergleich der Ergebnisse aus den Modell-Rechnungen mit denen aus der Röntgen-Strukturanalyse des Integrin-Peptid-Komplexes

Ein Vergleich zwischen der vorhergesagten und der experimentell bestimmten Protein- und Ligand-Konformation unterstreicht die Möglichkeiten von Modell-Rechnungen mithilfe menschlicher Intervention. Der Trend in der Änderung

der Schleife wurde korrekt vorhergesagt, obwohl das Modell die Strukturänderungen überschätzte (Abbildung 5 links). Das den Liganden bindende Metallion ist nahezu in der richtigen Position. Da die Hauptinteraktion des Asparaginsäurerests des Liganden mit dem Integrin über das Metallion

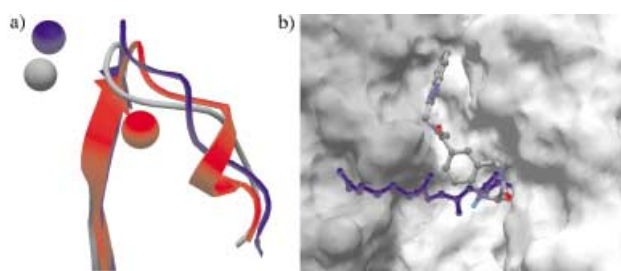


Abbildung 5. Strukturänderungen beim Binden der Liganden an $\alpha_v\beta_3$. a) Vergleich der Schleifenstrukturen und der Positionen des Metallions zwischen der Konformation des freien $\alpha_v\beta_3$ (rot), der Liganden-bindenden Konformation (blau) und der modellierten Komplexstruktur (grau). Der Haupttrend der Konformationsänderung wurde korrekt vorhergesagt, obwohl das Modell zu starke Strukturänderungen vorhersagt. Die Positionen der Metallionen im Modell und in der Struktur sind sehr ähnlich. b) Vergleich der RGD-Orientierung von Liganden im Kristall und der Computer-modellierten Form. Während die Carboxylgruppe nahezu identisch positioniert ist, zeigen die Arginin-Seitenkette des Peptids in der Röntgenstruktur und das Mimetikum in verschiedene Richtungen. Dies könnte zum einen auf Fehler beim Modellieren zurückgeführt werden, zum anderen aber auch durch die unterschiedlichen Ligandstrukturen verursacht werden.

erfolgt, hat die korrekte Position des Ions die richtige Anordnung der Säuregruppe des gebundenen Peptid-Mimetikums zur Folge. Das Arginin-Mimetikum im gebundenen Liganden dagegen ist anders als Arg im Kristall angeordnet (Abbildung 5 rechts). Das kann sowohl eine Folge der unterschiedlichen chemischen Natur des Liganden sein als auch ein Fehler des Modeling-Prozesses. Interessanterweise führen die Fehler in der Schleifen-Konformation der modellierten Integrinstruktur nicht zu einer falschen Anordnung der Säuregruppe; nur die Position des Metallions scheint wichtig zu sein. Insgesamt bestätigt dies die Annahme, dass bei RGD-Peptiden die Ligand-Protein-Wechselwirkungen elektronischer Natur sind.

Die unterschiedliche Ligandenorientierung in beiden Untersuchungen unterstreicht die Bedeutung einer experimentell bestimmten Komplexstruktur für das rationale Design; besonders wenn Konformationsänderungen bei der Bindung erwartet werden können, ist dies unabdingbar. Reines Molecular Modeling konnte allerdings den Trend der Konformationsänderung korrekt vorhersagen und die Ligandenbindungs-Region identifizieren. Die Ergebnisse der Modell-Rechnungen können jedoch nur als Näherungen angesehen werden.

6. Vom Ligand- zum Protein-gestützten rationalen Wirkstoff-Design

In der Vergangenheit führten umfangreiche Screening-Untersuchungen ohne Kenntnis der Proteinstruktur zur Entwicklung superaktiver und selektiver RGD-Peptide.^[21, 22]

Die nun zugänglichen Strukturen der Integrin-Komplexe ermöglichen das Interpretieren der hierbei erhaltenen Resultate, insbesondere weil viele der synthetisierten cyclischen Peptide auch NMR-spektroskopisch untersucht wurden.

Die Rückgratkonformation des komplexierten Liganden im Kristall^[9] und in Lösung, die durch NMR-Spektroskopie in Wasser^[23] bestimmt wurde, sind sehr ähnlich (Abbildung 6 oben). Insbesondere die Abstände zwischen den C_α -Atomen

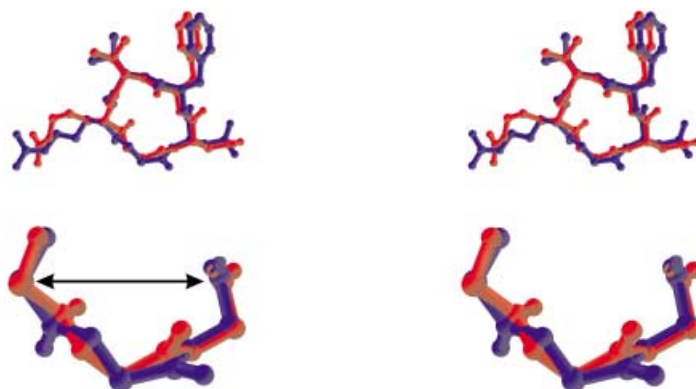


Abbildung 6. Stereodarstellung der Konformation des Liganden c-(RGDf[NMe]V-) im an das Protein gebundenen (rot) und freien Zustand (blau; in wässriger Lösung). Die Konformationen sind innerhalb der Fehlergrenzen gleich. Speziell der entscheidende Abstand zwischen den C_α -Atomen ändert sich beim Binden des Liganden nicht.

der Arg- und Asp-Reste sind gleich (Abbildung 6 unten).^[24, 25] Da die Struktur nur mit einer Auflösung von 3.1 Å erhalten wurde, ist eine detaillierte Diskussion der Unterschiede zwischen den beiden Ligandkonformationen nicht sinnvoll. Andererseits zeigt die Ähnlichkeit der beiden Strukturen die Stärke der NMR-Spektroskopie bei der Bestimmung der Struktur von konformativ eingeschränkten, cyclischen Peptiden in Lösung,^[26] ohne der Gefahr von Kristallisations-Artefakten zu unterliegen. Es unterstreicht weiterhin die Gültigkeit des Ligand-gestützten Design-Prinzips – ein Ziel besteht darin, starre Gerüste bereitzustellen, die ihre Konformation beim Binden an den Rezeptor möglichst wenig ändern. Ein starres Gerüst hat zwei entscheidende Vorteile: Der Ligand nimmt immer die richtige Konformation ein, sodass es kein vorgelagertes Gleichgewicht zwischen verschiedenen Konformationen gibt, das den Bindeprozess verlangsamen könnte, und die Bindung erfordert keine zusätzliche entropische Beiträge.^[26] Wenn gebundenes Wasser verdrängt wird, was bei geladenen Ligandenbindungs-Regionen der Fall sein kann, kann das Binden des Liganden sogar durch die Zunahme der Entropie forciert werden.

Screening-Untersuchungen von verschiedenen Seitenketten an den Val- und D-Phe-Positionen in c-(RGDf[NMe]V-) ergaben, dass bei $\alpha_v\beta_3$ im Peptid-Liganden Val durch viele andere Reste unterschiedlicher Größe ersetzt werden kann.^[10] Im Kristall hat Val keinen Kontakt zum Protein. Die Substitution von D-Phe durch D-Trp erhöht die Bindungsaffinität, während D-Pro als Seitenkette die Bindung verhindert.^[10] Die Überlagerung der NMR-Strukturen der RGD-Peptide mit der Röntgenstruktur des Integrins zeigt nun, dass die D-Trp-Substitution die hydrophoben Wechselwirkungen erhöht, während c-(RGDpV-) mit einer D-Pro-Seitenkette

das Protein nicht in gleicher Weise binden kann, weil es zur Kollision zwischen D-Pro und dem Integrin kommt (Abbildung 7 oben).

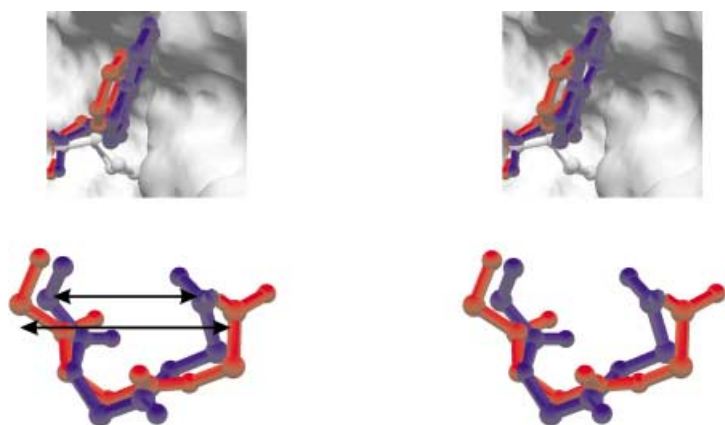


Abbildung 7. Der Effekt von Substitutionen am Liganden auf die Bindung (Stereobilder). Oben: Die Substitution von D-Phe (rot) durch D-Trp (blau) verstärkt die Bindung, durch D-Pro (weiß) wird sie verhindert. Dies ist leicht auf der Basis der Struktur erklärt werden: Während D-Trp die hydrophoben Wechselwirkungen verstärkt, kollidiert D-Pro mit der Proteinoberfläche. Unten: Der Methylierungseffekt (Methylierung der D-Phe-Val-Amidbindung; aus NMR-Untersuchungen des unmethylierten Proteins abgeleitet): Im nichtmethylierten Liganden (blau) ist der Abstand der C α -Atome kleiner als im methylierten (rot).

Die N-Methylierung von Val steigert die Bindungsaffinität etwa um den Faktor vier. Ein Vergleich der Konformation von c(-RGDfV-)^[27] mit der von c(-RGDf[NMe]V-) belegt eine Konformationsänderung: Der Abstand zwischen den C α -Atomen von Arg und Asp ist im N-methylierten Liganden kürzer als im nichtmethylierten (Abbildung 7, unten).

7. Die Spezifität der Wechselwirkung

Da nur der Argininrest des Liganden mit der α -Untereinheit in Kontakt tritt, kann die Spezifität zwischen den verschiedenen α -Untereinheiten nur durch unterschiedliche Orientierungen der Seitenketten relativ zum Asparaginsäurerest, durch Veränderungen des Argininrests oder aber durch sekundäre Effekte, z. B. eine Strukturänderung in der β -Untereinheit bedingt durch die verschiedenen α -Untereinheiten, hervorgerufen werden. Tatsächlich wurden beim Ligand-gestützten Design Spezifitäten gefunden, die durch den Argininrest ermittelt werden. Einerseits konnte gezeigt werden, dass der Ersatz von Arg durch Lys zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit an $\alpha_v\beta_3$, nicht aber der an $\alpha_{IIb}\beta_3$ führt. Andererseits lässt sich die Guanidiniumgruppe des Argininrests ohne Verlust der Bindungsfähigkeit an $\alpha_v\beta_3$ durch Aminopyridin und andere Arg-Mimetika ersetzen, während die gleiche Substitution bei $\alpha_{IIb}\beta_3$ nicht toleriert wird.^[14] Dieses Verhalten führte zu der Annahme, dass Arg in $\alpha_v\beta_3$ side-on gebunden ist, aber end-on in $\alpha_{IIb}\beta_3$. Die Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse bestätigen diese Annahme: Asp218 weist eine Side-on-Wechselwirkung mit Arg auf; eine weitere Stabilisierung erfolgt über Asp150 (Abbildung 8a).

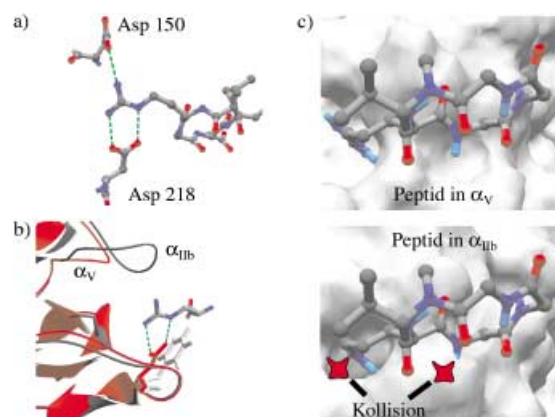


Abbildung 8. Vergleich von $\alpha_v\beta_3$ mit dem Homologie-Modell von $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin. a) Gebundenes Arg: Der Argininrest von c(-RGDf[NMe]V-) wird hauptsächlich durch Side-on-Bindung mit Asp218 und zusätzlich durch End-on-Bindung mit Asp150 der α -Untereinheit gebunden. b) Die Überlagerung eines Homologie-Modells von α_{IIb} (grau) mit α_v (rot) zeigt, dass (α_v)-Asp218 nicht konserviert ist. Der entsprechende Phe-Rest in α_{IIb} ermöglicht keine Side-on-Stabilisierung. Der dem (α_v)-Asp150 entsprechende Rest in α_{IIb} ist ein Glu, das end-on binden kann. Die entsprechende Schleife ist in den zwei Integrinen nicht konserviert. c) Während in α_v das Arg sich in eine negativ geladene Tasche des Proteins einschleibt (oben), ist diese Tasche in α_{IIb} viel kleiner (unten), sodass sowohl Arg als auch Gly starke sterische Wechselwirkungen mit dem Protein zeigen, welche die Spezifität dieses Liganden für α_v erhöhen.

Ein Vergleich der Sequenzen zeigt, dass in α_{IIb} der dem Asp218 entsprechende Rest Phe231 ist, der keine Side-on-Wechselwirkung mit Arg eingehen kann (Abbildung 8b). Der dem Asp150 in α_{IIb} entsprechenden Rest ist Glu157, welcher als End-on-Bindungspartner für Lys dienen kann. Die Überlagerung eines Homologie-Modells von α_{IIb} (unveröffentlichte eigene Ergebnisse) mit der Struktur von α_v zeigt, dass der α_v -spezifische RGD-Ligand nicht in der gleichen Orientierung an α_{IIb} wie an α_v binden kann. Die auf α_v -Asp150 oder α_{IIb} -Glu157 C-terminal folgende Schleife zwischen den beiden Integrin-Untertypen bleibt nicht erhalten. Die längere Schleife in α_{IIb} schließt die Tasche, in die c(-RGDf[NMe]V-) bindet. Andere ungünstige sterische Wechselwirkungen finden zwischen Gly in RGD und der Oberfläche von α_{IIb} statt (Abbildung 8c). Die Röntgenstruktur ermöglicht somit nicht nur das Erkennen der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Liganden von $\alpha_v\beta_3$, sondern kann auch helfen, die verschiedenen Spezifitäten für die Integrin-Subtypen zu verstehen.

8. Modelle der Signaltransduktion

Aus EM-Bilder lässt sich schließen, dass den bei der Ligandenbindung im Kristall auftretenden Strukturänderungen weitere konformative Umlagerungen folgen. In zahlreichen Untersuchungen konnten größere strukturelle Änderungen im Anschluss an die Ligandenbindung nachgewiesen werden,^[5, 28–32] wie sie aus der Röntgenstruktur der extrazellulären Domänen nicht ableitbar sind. Für die Signaltransduktion wurden ausgehend von verschiedenen experimentellen Ansätzen zwei Modelle vorgeschlagen und verfeinert (Abbildung 9).^[28, 31] Beide Modelle stimmen darin überein, dass eine scherenförmige Bewegung erfolgt; sie unterschei-

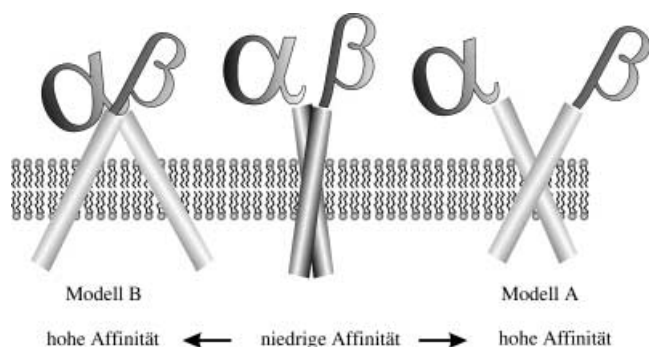


Abbildung 9. Zwei Modelle der Signaltransduktion bei Integrinen: Während im Modell A (rechts) die transmembrane Teile der Integrin-Untereinheiten assoziiert bleiben, liegt die Gelenk-Region im Modell B (links) näher bei den extrazellulären Kopfgruppen – die transmembranen Regionen werden getrennt.

den sich aber in der Lage des Gelenks der „Schere“. Während bei Modell A das Gelenk in der Membran-Region liegt, postuliert Modell B das Scherengelenk nahe der Integrin-Kopfgruppe. In Modell A dissoziieren die Kopfgruppen nach der Ligandenbindung, in Modell B bleiben sie hingegen assoziiert. Kürzlich wurde das Modell B verfeinert, indem die Röntgenstruktur und zusätzliche NMR-Untersuchungen der Stelzen-Region einbezogen wurden. Jetzt wird eine Kombination aus einer scherenähnlichen Bewegung und dem Öffnen der geknickten Integrin-Struktur (ähnlich dem Öffnen eines Klappmessers) vorgeschlagen (Abbildung 10).^[33] Dieses Modell, wie auch das mit dissoziierenden Kopfgruppen, kann Sedimentations-Experimente erklären, bei denen eine Vergrößerung des hydrodynamischen Radius nach Ligandenbindung nachgewiesen wurde. Die EM-Daten sind widersprüchlich und ermöglichen zur Zeit keine klare Bewertung der beiden Modelle. Für beide Modelle gibt es unterstützende Daten.^[7, 28, 34–37]

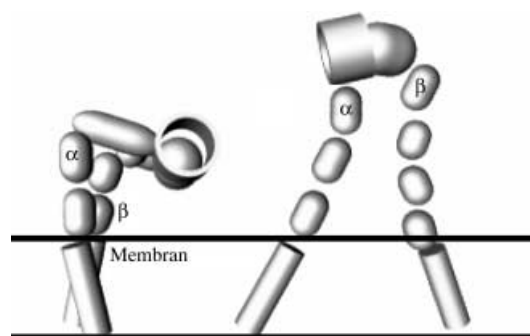


Abbildung 10. Klappmesser-Modell der Signaltransduktion: Dieses Modell der Transduktion wurde durch Kombination der Ergebnisse aus der Röntgenstrukturanalyse, elektronenmikroskopischer und NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Stelzen-Region der Integrine abgeleitet. Es steht auch mit Sedimentations-Experimenten in Einklang.

Während Modell A vom unversehrten Integrin abgeleitet wurde, benutzt Modell B ein Konstrukt, in dem der Aktivierungsschritt aus der Abspaltung einer der transmembranen Domänen des Integrins besteht. Obwohl bekannt ist, dass die Abspaltung der transmembranen Domäne das Integrin aktiviert, kann die Entfernung der durch die Membran beding-

ten strukturellen Einschränkungen die Validität des Modells beeinträchtigen. Frühere EM-Untersuchungen haben gezeigt, dass die Abspaltung der transmembranen Domänen nicht zu einer Dissoziation der Kopfgruppe führt,^[38] während das Binden von Liganden genau dies zu bewirken scheint.^[7, 28] Auf der anderen Seite gibt es auch Untersuchungen, bei denen keine Dissoziation der Kopfgruppen beschrieben wurden.^[34]

Durch biochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung nicht ein zwei-, sondern eher ein mehrstufiger Prozess ist, der wahrscheinlich drei Stufen involviert.^[39, 40] Dies wird durch intensive moleküldynamische Rechnungen der Transmembran(TM)-Regionen von vielen verschiedenen Integrin-Subtypen bestätigt.^[41] Zwei Konformationen der TM-Region, eine mit hoher und eine mit niedriger Bindungsaffinität, wurden anhand von Rechnungen und experimentellen Daten identifiziert. Die hochaffine Konformation hat große Ähnlichkeit mit der Struktur von Glycophorin A,^[42] einem homodimeren Glycoprotein.

Die Rechnung der Umlagerung des einen Konformers in das andere offenbarte eine dritte Stufe und beschreibt eine komplexe Bewegung der Helices beim Übergang. Die aktivierende Bewegung ist eine Rotation der α -Untereinheit; die Dissoziation der Membran-nahen Regionen ist begleitet von einer Rückrotation der α -Untereinheit, einer Vergrößerung des Kreuzungswinkels zwischen den Helices und von einer Rotation der β -Untereinheit. Wie sich diese transmembranen Bewegungen auf die Bewegungen der Kopfgruppe auswirken, ist noch nicht klar. Wir nehmen an, dass das neue Intermediat ein aktivierten Zustand ist, der der Struktur ohne die transmembranen und intrazellulären Domänen entspricht.^[41] Die Struktur im Kristall sollte dann aus mehreren Gründen dem aktivierten Zustand entsprechen:

- 1) Die transmembrane und die intrazelluläre Domäne fehlen, wodurch das Integrin aktiviert wird.^[5]
- 2) Die Substitution von Ca^{2+} - durch Mg^{2+} -Ionen, die das Integrin auch aktiviert, ändert die Struktur nicht.^[5, 16, 43]
- 3) Die Strukturänderung nach der Ligandenbindung ist klein, jedenfalls sind die Kopfgruppen noch assoziiert.

Dies bestätigt die Ergebnisse, die durch die Rechnungen erhalten wurden: Bei der Aktivierung dissoziieren die Kopfgruppen nicht, sondern sie ändern lediglich ihre relative Orientierung. Auch wenn sich die Rechnungen auf das Scheren-Modell der Integrin-Aktivierung stützen, kann doch die konformative Änderung der TM-Domänen auch eine Umlagerung der Disulfidbrücken in der Stelzen-Region hervorrufen, was in Einklang mit dem Klappmesser-Modell ist.

Ein möglicher Dissoziationsmechanismus der Kopfgruppen nach dem Binden der Liganden schließt den zentralen Rest an der α/β -Grenzfläche ein, das Arg261 der β -Untereinheit. Zwei Schleifen, die ihre Konformation beim Binden von Liganden ändern, befinden sich in der Nähe des (β)-Arg261. (β)-Arg261 insertiert in den β -Propeller der α -Untereinheit. Es ist von Arylresten der β -Propeller-Domäne von α_v umgeben (Abbildung 2). Daher könnten Kation- π -Wechselwirkungen dazu beitragen, die α/β -Wechselwirkung zu verstärken.^[6] Eine kleine Änderung der Position von (β)-Arg261, die durch allosterische Umlagerungen beim Binden von Liganden induziert wird, könnte zu einer abstoßenden Kation- π -Wechselwirkung führen.^[44] Das wiederum könnte die Dissoziation

der Kopfgruppen bewirken. Die Dissoziation könnte bei cyclischen RGD-Peptiden als Liganden ausbleiben, oder sie könnte im Kristall beim „Soaking“ mit dem Liganden inhibiert sein. Es ist noch nicht geklärt, ob und wo RGD-Peptide nach der Dissoziation der Kopfgruppe binden. Ein möglicher Mechanismus ist die Substitution des (β)-Arg261 durch das Arg der RGD-Peptide, wodurch in der β -Propeller-Domäne die erneute Assoziation der Kopfgruppe verhindert wird.

9. Cluster-Bildung

Die Signaltransduktion in die Zelle nach dem Binden des Liganden geht mit der Bildung von Integrin-Clustern einher. Dieser Effekt wird teilweise durch Wechselwirkungen der Integrine mit anderen transmembranen Proteinen wie Calveolin, dem Urokinase-Rezeptor (uPAR = CD87) und anderen reguliert.^[45–48] Ob Integrine bei der Cluster-Bildung direkt interagieren oder nur durch ihre Liganden oder andere Proteine an der Zelloberfläche verknüpft sind, ist unklar. Kürzlich konnte eine kurze Peptidsequenz in der β -Propeller-Domäne der α_3 -Untereinheit identifiziert werden, die die $\alpha_3\beta_2$ -uPAR-Wechselwirkung inhibiert (Abbildung 2).^[45] Die entsprechende Schleife ist im Kristall an die β -Untereinheit gebunden. Um in die Integrin-uPAR-Wechselwirkung involviert zu werden, müssen die Kopfgruppen dissoziieren, sodass die Schleife freigelegt wird – vorausgesetzt, das $\alpha_3\beta_2$ -Integrin hat eine ähnliche Struktur wie $\alpha_v\beta_3$ (Abbildung 11). Diese Experimente weisen zusammen mit den verfügbaren Strukturdaten darauf hin, dass die Kopfgruppen vor der Cluster-Bildung dissoziieren müssen. Querverbindungen zu anderen

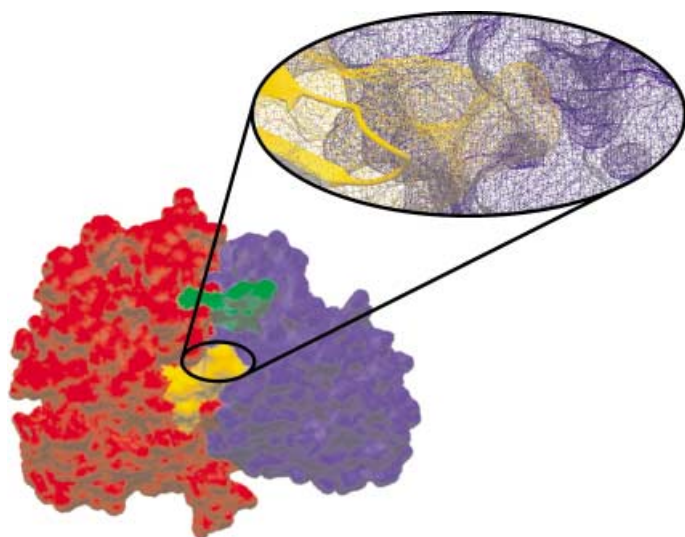


Abbildung 11. Wechselwirkungen von Integrinen mit uPAR: Eine Schleife auf der β -Propeller-Domäne von α_3 wurde als Interaktions-Stelle mit uPAR identifiziert. Die β -Propeller-Domäne in der α -Untereinheit ist in rot gezeigt; der den Liganden bindende Teil der Oberfläche ist grün markiert. Die Schleife, die mit uPAR interagiert (orange), liegt nahe der grün gekennzeichneten Interaktions-Stelle und ist teilweise mit der β -Untereinheit (blaue Oberfläche und Vergrößerung) assoziiert. Um mit uPAR wechselwirken zu können, müssen die Kopfgruppen des Integrins dissoziieren.

transmembranen Rezeptoren wie den humanen Wachstumsfaktoren wurden ebenfalls beschrieben.^[49, 50]

Sogar direkte Interaktionen zwischen Integrinen können prinzipiell an allen Integrin-Domänen erfolgen. Ein Modell für diese Wechselwirkungen ist die Dissoziation der Kopfgruppen. Hierbei macht das dissoziierende Integrin-Heterodimer dem entsprechenden Gegenstück eines anderen Integrin-Dimeren Platz. Die Untersuchungen zu den $\alpha_2\beta_3$ -uPAR-Wechselwirkungen jedoch legen nahe, dass die Kopfgruppen mit anderen Membran-assoziierten Rezeptoren wechselwirken, was letztlich zur Cluster-Bildung führt. EM-Aufnahmen deuten auf einen möglichen Mechanismus, bei dem die Stelzen-Regionen der Integrine in Abwesenheit anderer Proteine interagieren.^[37]

10. Neue Aspekte der Signaltransduktion

Bei einer genauen Betrachtung des Signaltransduktions-Mechanismus von Integrinen sowie von GPCR zeigen sich konzeptionelle Ähnlichkeiten, die einen gemeinsamen allgemeinen Mechanismus beider Signaltransduktionswege nahe legen (Abbildung 12). In beiden Fällen gibt es eine

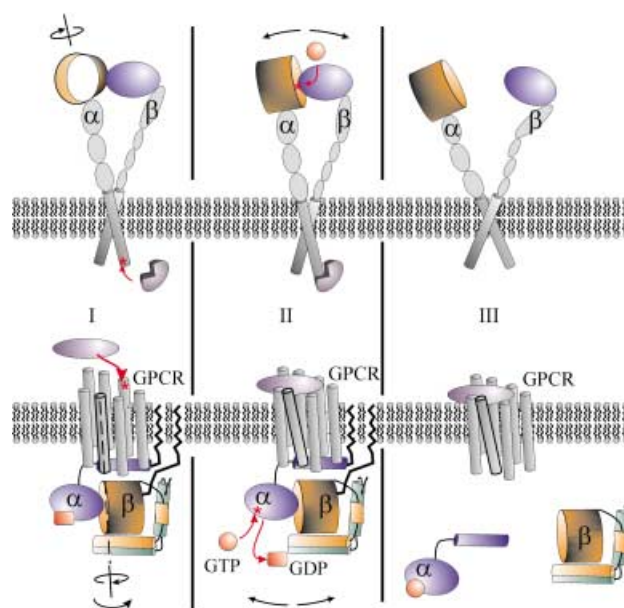


Abbildung 12. Ähnlichkeiten bei der Signaltransduktion von Integrinen und G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR; allerdings sind innen und außen vertauscht): In beiden Fällen induziert ein Ligand die Umlagerung der transmembranen Helices (Teilbild I). Diese Konformationsänderung wird zur Ligandenbindungs-Domäne auf der anderen Seite der Membran geleitet, wodurch ein Ligand gebunden (bei Integrin) oder ausgetauscht werden kann (bei GPCR; Teilbild II). Dieser Prozess führt zur Separation der zwei Domänen nahe der Bindungs-Region (Teilbild III). Die Trennung ist der Startpunkt für weitere Signalkaskaden.

inaktive Konformation, die durch intra- oder extrazelluläre Signale aktiviert wird. Im Falle der Integrine lässt sich aus Rechnungen ableiten, dass die Aktivierung durch eine Rotation einer der Untereinheiten erfolgt.^[41] Bei GPCR schließt die Aktivierung auch eine strukturelle Umlagerung von Helices ein (Abbildung 12, I).^[51–57]

Nach der Konformationsänderung werden im Falle der Integrine die extrazellulären Liganden gebunden,^[5] bei den GPCR wird GDP durch GTP ersetzt (Abbildung 12, II). Das Binden der Liganden und der Ersatz von GDP durch GTP führt zu weiteren Strukturänderungen: Die Kopfgruppen der Integrine dissoziieren bzw. die α -Untereinheiten der G-Proteinen trennen sich vom $\beta\gamma$ -Komplex ab (Abbildung 12, III).^[28, 58] Auch hier gibt es auffallende strukturelle Ähnlichkeiten: Die Grenzflächen der wechselwirkenden Domänen gleichen sich weitgehend.^[6, 59, 60] Kation- π -Wechselwirkungen stabilisieren die Assoziation bei $\alpha_v\beta_3$, nicht jedoch bei GPCR. Dort führt ein Netzwerk von Salzbrücken zu starken Wechselwirkungen zwischen G-Protein und GPCR. Kation- π -Wechselwirkungen sind gut geeignet für die Regulation der Affinität zwischen Protein-Domänen, weil bereits geringe strukturelle Änderungen eine anziehende Wechselwirkung in eine abstoßende umwandeln kann. Die dann folgende Dissoziation ist der Startpunkt für eine Reihe weiterer Ereignisse. Bei den Integrinen ist dies die Wechselwirkung mit anderen Rezeptoren und die Cluster-Bildung.^[50]

Die Signaltransduktionswege haben somit einen gemeinsamen Mechanismus, der drei Stufen umfasst: eine inaktive, eine aktivierte und eine dissoziierte. Möglicherweise kann sich daran eine Cluster-Bildung anschließen.

11. Zusammenfassung und Ausblick

Die Untersuchungen an $\alpha_v\beta_3$ und anderen Integrinen führen zu einem besseren Verständnis der Ligandenbindung und der Signalweiterleitung durch Integrine. Trotzdem bleiben zahlreiche Fragen unbeantwortet, die die weiteren strukturellen Änderungen als Folge der Ligandenbindung sowie die dynamischen Prozesse betreffen, z. B. die Wechselwirkungen mit weiteren Proteinen oder die Cluster-Bildung. Die Aufklärung der Strukturen der extrazellulären Domänen des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins in freier Form und im Komplex mit dem cyclischen RGD-Peptid sind Meilensteine der Integrin-Forschung. Sie werden die Forschungen in der medizinischen Chemie ebenso beflügeln, wie sie biophysikalische und biochemische Untersuchungen stimulieren. Das Ziel der verschiedenen Forschungen wird sein, hochpotente Integrin-Antagonisten durch rationales, Struktur-gestütztes Design zu entwickeln und ein tieferes Verständnis der bei der Zelladhäsion durch Integrine vermittelten Signaltransduktion zu erhalten.

Eingegangen am 6. Mai 2002 [M1570]

- [1] A. E. Aplin, A. K. Howe, R. L. Juliano, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1999**, *11*, 737.
- [2] K. H. Martin, J. K. Slack, S. A. Boerner, C. C. Martin, J. T. Parsons, *Science* **2002**, *296*, 1652.
- [3] C. C. Kumar, L. Armstrong, Z. Yin, M. Malkowski, E. Maxwell, H. Ling, B. Yaremko, M. Liu, J. Varner, E. M. Smith, B. Neustadt, T. Nechuta, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2000**, *476*, 169.
- [4] G. P. Curley, H. Blum, M. J. Humphries, *Cell Mol. Life Sci.* **1999**, *56*, 427.
- [5] M. J. Humphries, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 311.
- [6] J. P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2001**, *294*, 339.
- [7] J. W. Weisel, C. Nagaswami, G. Vilaire, J. S. Bennett, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16637.
- [8] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033.
- [9] J. P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2002**, *296*, 151.
- [10] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461.
- [11] J. Wermuth, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1328.
- [12] K. E. Gottschalk, R. Gunther, H. Kessler, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 470.
- [13] M. Pfaff, K. Tangemann, B. Müller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. Timpl, J. Engel, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20233.
- [14] S. L. Goodman, G. Hölzemann, G. A. G. Sulyok, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1045.
- [15] J. Boer, D. Gottschling, A. Schuster, M. Semmrich, B. Holzmann, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2586.
- [16] D. D. Hu, C. F. Barbas, J. W. Smith, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 21745.
- [17] E. C. Tozer, R. C. Liddington, M. J. Sutcliffe, A. H. Smeeton, J. C. Loftus, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 21978.
- [18] S. Honda, Y. Tomiyama, N. Pampori, H. Kashiwagi, T. Kiyoi, S. Kosugi, S. Tadokoro, Y. Kurata, S. J. Shattil, Y. Matsuzawa, *Blood* **2001**, *97*, 175.
- [19] J. D. Humphries, J. A. Askari, X. P. Zhang, Y. Takada, M. J. Humphries, A. P. Mould, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 20337.
- [20] J. Emsley, C. G. Knight, R. W. Farndale, M. J. Barnes, R. C. Liddington, *Cell* **2000**, *101*, 47.
- [21] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1440; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1374.
- [22] G. Hölzemann, *IDrugs* **2001**, *4*, 72.
- [23] E. Plancker, H. Kessler, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [24] M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911.
- [25] M. Pfaff, K. Tangemann, B. Müller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. T. J. Engel, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20233.
- [26] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 509; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512.
- [27] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50.
- [28] R. R. Hantgan, C. Paumi, M. Rocco, J. W. Weisel, *Biochemistry* **1999**, *38*, 14461.
- [29] R. C. Liddington, L. A. Bankston, *Exp. Cell Res.* **2000**, *261*, 37.
- [30] C. Lu, J. Takagi, T. A. Springer, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 14642.
- [31] J. Takagi, H. P. Erickson, T. A. Springer, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 412.
- [32] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. W. Smith, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785.
- [33] N. Beglova, S. C. Blacklow, J. Takagi, T. A. Springer, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 282.
- [34] E. M. Erb, K. Tangemann, B. Bohrmann, B. Muller, J. Engel, *Biochemistry* **1997**, *36*, 7395.
- [35] J. Engel, *Methods Enzymol.* **1994**, *245*, 469.
- [36] X. Du, M. Gu, J. W. Weisel, C. Nagaswami, J. S. Bennett, R. Bowditch, M. H. Ginsberg, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 23087; Berichtigung: *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 11673.
- [37] R. R. Hantgan, M. Rocco, C. Nagaswami, J. W. Weisel, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1614.
- [38] J. Wippler, W. C. Kouns, E. J. Schlaeger, H. Kuhn, P. Hadvary, B. Steiner, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 8754.
- [39] D. Boettiger, F. Huber, L. Lynch, S. Blystone, *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 1227.
- [40] D. Boettiger, L. Lynch, S. Blystone, F. Huber, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31684.
- [41] K. E. Gottschalk, P. D. Adams, A. T. Brunger, H. Kessler, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 1800.
- [42] K. R. MacKenzie, J. H. Prestegard, D. M. Engelman, *Science* **1997**, *276*, 131.
- [43] D. D. Hu, J. R. Hoyer, J. W. Smith, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 9917.
- [44] J. P. Gallivan, D. A. Dougherty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9459.
- [45] Y. Wei, J. A. Eble, Z. Wang, J. A. Kreidberg, H. A. Chapman, *Mol. Biol. Cell.* **2001**, *12*, 2975.

-
- [46] Y. Wei, M. Lukashev, D. I. Simon, S. C. Bodary, S. Rosenberg, M. V. Doyle, H. A. Chapman, *Science* **1996**, 273, 1551.
 - [47] Y. Wei, X. Yang, Q. Liu, J. A. Wilkins, H. A. Chapman, *J. Cell. Biol.* **1999**, 144, 1285.
 - [48] H. T. Maecker, S. C. Todd, S. Levy, *FASEB J.* **1997**, 11, 428.
 - [49] M. A. Schwartz, M. H. Ginsberg, *Nat. Cell. Biol.* **2002**, 4, E65.
 - [50] C. K. Miranti, J. S. Brugge, *Nat. Cell. Biol.* **2002**, 4, E83.
 - [51] S. W. Lin, T. P. Sakmar, *Biochemistry* **1996**, 35, 11149.
 - [52] D. L. Farrens, C. Altenbach, K. Yang, W. L. Hubbell, H. G. Khorana, *Science* **1996**, 274, 768.
 - [53] A. D. Jensen, F. Guarnieri, S. G. Rasmussen, F. Asmar, J. A. Ballesteros, U. Gether, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 9279.
 - [54] U. Gether, *Endocr. Rev.* **2000**, 21, 90.
 - [55] U. Gether, B. K. Kobilka, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 17979.
 - [56] U. Gether, S. Lin, P. Ghanouni, J. A. Ballesteros, H. Weinstein, B. K. Kobilka, *EMBO J.* **1997**, 16, 6737.
 - [57] S. Subramaniam, R. Henderson, *Nature* **2000**, 406, 653.
 - [58] A. Bohm, R. Gaudet, P. B. Sigler, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, 8, 480.
 - [59] M. A. Wall, B. A. Posner, S. R. Sprang, *Structure* **1998**, 6, 1169.
 - [60] M. A. Wall, D. E. Coleman, E. Lee, J. A. Iniguez-Lluhi, B. A. Posner, A. G. Gilman, S. R. Sprang, *Cell* **1995**, 83, 1047.
-