

- [4] **Kobe, B. und Deisenhofer, J.** (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* 19, 414-420
- [5] **Tilney, L. J. und Portnoy, D.A.** (1989) Actin filaments and the growth, movement and spread of the intracellular parasite *Listeria monocytogenes*. *J. Cell. Biol.* 109,1597-1608
- [6] **Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wächter, M., Wünscher, M. und Chakraborty, T.** (1992). A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J.* 11, 1981-1990
- [7] **Theriot, J. A., Mitchison, T. J., Tilney, L. G. und Portnoy, D.A.** (1992) The rate of actin-based motility of *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature* 357, 257-260
- [8] **Pistor, S., Chakraborty, T., Niebuhr, K., Domann, E. und Wehland, J.** (1994). The ActA protein of *Listeria monocytogenes* acts as a nucleator inducing reorganization of the actin cytoskeleton. *EMBO J.* 13, 758-763
- [9] **Pistor, S., Chakraborty, T., Walter, U. und Wehland, J.** (1995). The bacterial actin nucleator protein ActA of *Listeria monocytogenes* contains multiple binding sites for host microfilament proteins. *Current Biology* 5, 517-525
- [10] **Theriot, J.A., Rosenblatt, J., Portnoy, D. A., Goldschmidt-Clermont, P. J. und Mitchison, T. J.** (1994) Involvement of profilin in the actin-based motility of *Listeria monocytogenes* in cells and in cell-free extracts. *Cell* 76, 505-517
- [11] **Chakraborty, T., Ebel, F., Domann, E., Niebuhr, K., Gerstel, B., Pistor, S., Temm-Grove, C.J., Jockusch, B.M., Reinhard, M., Walter, U. und Wehland, J.** (1995). A focal adhesion factor directly linking intracellular motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J.* 14, 1314-1321
- [12] **Reinhard, M., Halbrügge, M., Scheer, U., Wiegand, C., Jockusch, B.M., und Walter, U.** (1992). The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *EMBO J.* 11, 2063-2070
- [13] **Reinhard, M., Giehl, K., Abel, K., Haffner, C., Jarchau, T., Hoppe, V., Jockusch, B.M. und Walter, U.** (1995) The prolin-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J.* 14, 1583-1589
- [14] **Gertler, F.B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J., und Soriano, P.** (1996). Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* 87, 227-239
- [15] **Frank, R.** (1992) Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48, 9217-9232
- [16] **Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U.D., Walter, U., Gertler, F.B., Wehland, J. und Chakraborty, T.** (1997). A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO J.* 16, 5433-5444
- [17] **Welch, M. D., Iwamatsu, A. und Mitchinson, T.J.** (1997). Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 385, 265-269
- [18] **Machesky, L.M., Atkinson, S.J., Ampe, C., Vandekerckhove, J. und Pollard, T.D.** (1994). Purification of a cortical complex containing 2 unconventional actins from *acanthamoeba* by affinity-chromatography on profilin-agarose. *J. Cell Biol.* 127, 107-115
- [19] **Welch, M. D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D.A. und Mitchison, T. J.** (1998) Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* 281, 105-108
- [20] **Mullins, R.D., Heuser, J.A. und Pollard, T.D.** (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6181-6186
- [21] **Sechi, A., Wehland, J. und Small, V.** (1997). The isolated comet tail pseudopodium of *Listeria monocytogenes*: a tail of two actin filament populations: long and axial and short and random. *J. Cell Biol.* 137, 155-167

Korrespondenzadressen

Prof. Dr. Jürgen Wehland

Abteilung Zellbiologie
 Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
 Mascheroder Weg 1
 D-38124 Braunschweig
 Tel.: 0049-531-6181-415, Fax: 0049-531-6181-444
 eMail: jwe@gbf.de

Prof. Dr. Trinad Chakraborty

Institut für Medizinische Mikrobiologie
 Universität Gießen
 Frankfurter Straße 107
 D-35392 Gießen
 Tel.: 0049-641-99-41280, Fax: 0049-641-99-41259
 eMail: trinad.chakraborty@mikrobio.med.uni-giessen.de

*Dieter Langosch,
 Neurobiologie Department,
 Universität Heidelberg*

Molekulare Erkennung zwischen membranständigen Proteindomänen – struktur- und zellbiologische Aspekte

Wechselwirkungen membranintegrierter Polypeptidsegmente spielen eine wichtige Rolle bei Faltung, Oligomerisierung und auch Sortierung vieler integraler Membranproteine. Ein detailliertes Verständnis der strukturellen Grundlage dieser Interaktionen erweist sich zunehmend als hilfreich bei der Charakterisierung dieser Proteine im Kontext zellbiologischer Prozesse und pathologischer Zustände. Hier sollen die wichtigsten Prinzipien dieser Protein/Protein-Interaktionen und ihre mögliche Bedeutung für die Funktion einiger Membranproteine dargestellt werden.

► Membranproteine nehmen eine Vielzahl verschiedener Aufgaben im komplexen Netzwerk der Zelle wahr. Dies erfordert transiente oder permanente Wechselwirkungen mit anderen Membranproteinen, etwa bei intrazellulären Sortier- und Transportvorgängen, bei der Zell-Zell-Adhäsion oder der Transduktion extrazellulärer Signale. Spezifische Protein/Protein-Interaktionen sind auch bei der Selbstassoziation membranständiger Polypeptide zu stabilen, oligomeren Quartärstrukturen beteiligt. Während die Mehrzahl zytoplasmatischer und sekretierter Proteine monomer bleibt, existieren nahezu alle bisher untersuchten Membranproteine in Form nicht-kovalenter, homo- beziehungsweise heterooligomerer Komplexe.

Korrekte Oligomerisierung erfordert spezifische Erkennung

Die Bildung von Oligomerstrukturen ist ein frühes Ereignis im Lebenszyklus integraler Membranproteine, welche meist an Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert werden. Modellstudien zeigten, daß einzelne Untereinheiten dabei unabhängig voneinander an verschiedenen Ribosomen synthetisiert, in die ER-Membran eingebaut, posttranslational modifiziert und zu ihrer endgültigen Tertiärstruktur gefaltet werden – dabei häufig unterstützt durch ER-luminale Chaperone (Abb. 1). Ihre Oligomerisierung geschieht nach zufälligen Kollisionen der in der ER-Membran flotierenden Polypeptide. Nur korrekt gefaltete und assemblierte Moleküle können das ER verlassen und an ihren endgültigen Bestimmungsort in nachgeschalteten Organellen beziehungsweise der Plasmamembran transportiert werden. Proteine, welche diesen Qualitätskriterien nicht

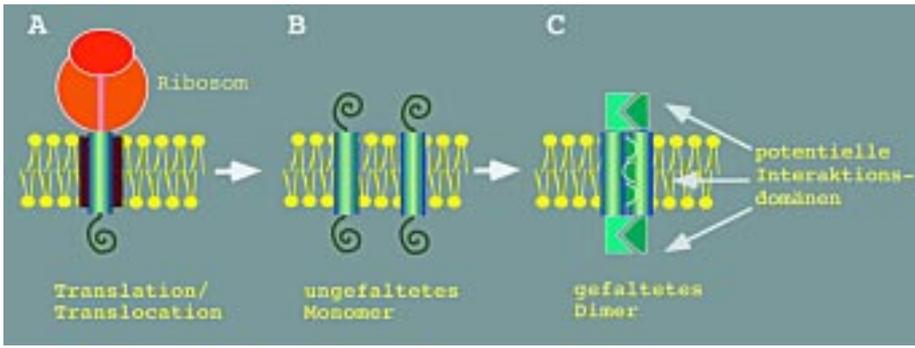


Abb. 1: Stadien der Membranproteinbiogenese. Integrale Membranproteine werden kotranslational in die ER-Membran eingebaut (A) und liegen zunächst als ungefaltete Monomere vor (B). Deren strukturelle Reifung ist häufig Voraussetzung für die Ausbildung oligomerer Komplexe (C).

genügen, werden abgebaut. Ausgehend von einer Gesamtzahl von rund 80.000 durch Säugergenome kodierte Proteine und einem etwa 30prozentigen Anteil von Membranproteinen daran, ergibt sich, daß eine durchschnittliche Zelle zu jedem Zeitpunkt hunderte bis tausende unterschiedlicher Membranproteine gleichzeitig synthetisiert. Die Ausbildung korrekter Oligomerstrukturen aus diesem gemischten Vorrat an Untereinheiten erfordert daher komplementäre Strukturelemente, welche auf zytosolischen, membranständigen und/oder luminalen beziehungsweise extrazellulären Domänen lokalisiert sein können. Assemblierungsdomä-

nen im Extramembranbereich wurden zum Beispiel auf den Untereinheiten liganden- oder spannungsgesteuerter Ionenkanalproteine und viraler Oberflächenproteine nachgewiesen [1], wobei jüngeren Arbeiten zufolge jedoch auch Transmembran(TM)-Segmente bei der Oligomerisierung dieser Proteine beteiligt sind. In den neunziger Jahren wurde deutlich, daß TM-Segmente die Oligomerisierung gewisser Membranproteine – wie etwa Glycophorin A, Phospholamban, T-Zellrezeptor, MHC II-Komplex, M13-Hüllprotein, N-Syndecan etc. – sogar entscheidend steuern können [2]. Ich möchte mich im folgenden auf Interaktionen zwischen TM-Segmenten konzentrieren.

ben Effekts zu nennen, also des Entropiegewinns beim Abstreifen geordneter Hydrathüllen von interagierenden Oberflächen. Zudem sind ionisierbare Aminosäuren in TM-Segmenten sehr selten und elektrostatische Wechselwirkungen deshalb nicht zu erwarten, obwohl einzelne Ausnahmen davon bekannt sind. Für Interaktionen zwischen TM-Segmenten werden vor allem schwache Dipol-Dipolkräfte vom van der Waals-Typ in dicht gepackten hydrophoben Kontaktflächen verantwortlich gemacht. Diese theoretischen Überlegungen werden durch experimentelle Arbeiten untermauert. Das derzeit am genauesten untersuchte Modellsystem interagierender TM-Helices ist das Glycophorin A, ein bitopisches Protein der Erythrozytenmembran. Die sogar unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-Gelelektrophorese stabile Dimerisierung des Glycophorin A-TM-Segments wird bereits durch minimale Veränderungen der Seitenkettenvolumina an bestimmten Sequenzpositionen unterdrückt [3]. Das Muster dieser sensitiven Positionen, kombiniert mit molekularer Modellierung, implizierte eine dichte Seitenkettenpackung beider TM-Helices im Dimer; deren Längsachsen sind dabei nicht parallel, sondern kreuzen sich unter einem negativen Winkel. Die NMR-Struktur des TM-Helix-Dimers bestätigte dieses Modell und die räumliche Selbstkomplementarität der interagierenden Helixoberflächen als Grundlage der spezifischen Homodimerisierung [4].

Spezifische Erkennung erfordert räumliche Komplementarität

Der Nachweis spezifischer Interaktionen zwischen TM-Segmenten war zunächst überraschend, da diese, im Gegensatz zu den ausgedehnten, häufig diskontinuierlichen Interaktionsdomänen löslicher Proteine, nur 20 bis 25 Aminosäuren in meist α -helikaler Konformation umfassen. Darüber hinaus können verschiedene Triebkräfte, welche für Interaktionen löslicher Domänen verantwortlich sind, im unpolaren Milieu der Lipiddoppelschicht nicht wirksam werden. In erster Linie ist hier die Abwesenheit des sogenannten hydropho-

Um die Wechselwirkungen zwischen TM-Domänen in einer natürlichen Lipidumgebung meßbar zu machen, wurde ein Werkzeug aus der molekularen Genetik adaptiert. Dieser Ansatz basiert auf einem membranständigen prokaryotischen Transkriptionsaktivator, dem ToxR-Protein. Die Aktivität dieses Proteins wird durch Dimerisierung induziert und macht damit Interaktionen heterologer TM-Segmente in der bakteriellen Membran meßbar (Abb. 2 A). Der Einbau des TM-Segments von Glycophorin A bewirkte die Dimerisierung des chimären ToxR-Proteins und systematische Mutagenesestudien zeigten, daß die für die Dimerisierung kritischen Aminosäuren in der Membran [5, 6] und in Detergenzlösung [3] nahezu identisch sind (Abb. 2 B, C). Insbesondere erwies sich ein GxxxG-Motiv als zentral für die Interaktion. Veränderungen des Abstands zwischen beiden Glyzinresten reduzierten die Interaktion und dieses Motiv alleine bewirkte die Dimerisierung heterologer Gastsequenzen [6].

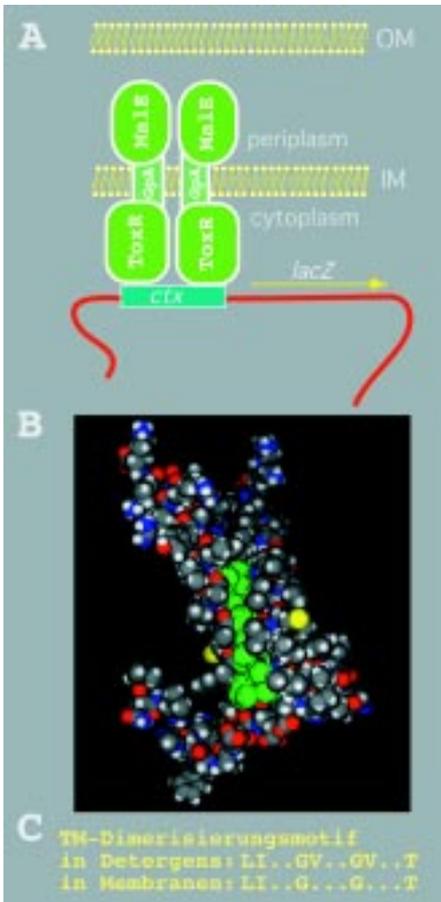


Abb. 2: TM-Helix-Helix-Erkennung am Beispiel des Glycophorin A. A. Schematischer Aufbau des ToxR-Systems. Die zytosolische ToxR-Domäne ist durch das Glycophorin A TM-Segment mit der periplasmatischen MalE-Domäne verbunden. Nach Dimerisierung des TM-Segments bindet die ToxR-Domäne an den ctx-Promotor und induziert damit die Expression des lacZ-Reportergens. OM, äußere Membran; IM, innere Membran. B. NMR-Struktur des Glycophorin A-TM-Helixdimers (aus Ref. 4). Aminosäuren, die sich im ToxR-System als kritisch für die Dimerisierung erwiesen, sind in der Helix-Helix-Kontaktfläche lokalisiert (grün markiert). C. Vergleich der Dimerisierungsmotive wie sie in Detergenzlösung (s. Ref. 3) bzw. Lipidmembranen (s. Ref. 5, 6) identifiziert wurden.

Interaktionen zwischen TM-Segmenten unterstützen die Oligomerisierung von SNARE-Proteinen

Auch die Dimerisierung von Synaptobrevin II, eines Membranproteins präsynaptischer Vesikel, beruht auf Selbstinteraktion des

TM-Segments. Synaptobrevin nimmt zusammen mit anderen sogenannten SNARE-Proteinen – Syntaxin 1A und SNAP-25 – eine zentrale Stellung bei der Neurotransmitterausschüttung ein. Ein stabiler ternärer Komplex dieser Proteine ist wesentlich für das Andocken der Vesikel an – beziehungsweise ihrer Fusion mit – der präsynaptischen Plasmamembran (Abb. 3 A; [7]). Während die Interaktionen zwischen ihren zytoplasmatischen Domänen bereits sehr gut charakterisiert sind [8], ist über die Struktur und Funktion der TM-Segmente noch wenig bekannt. Auch die Homodimerisierung des Synaptobrevins hängt jedoch von einem definierten Aminosäuremuster im TM-Segment ab. Dieses Muster läßt auf negative Kreuzungswinkel beider Helices im Dimer und damit auf eine strukturelle Homologie zu Glycophorin A schließen (Abb. 3 B,C; [9]). Überraschenderweise ist dieses Motiv nahezu vollständig im TM-Segment von Syntaxin 1A konserviert. Dies weist auf eine Rolle des TM-Segments bei der Homodimerisierung von Syntaxin 1A beziehungsweise dessen heterotypischer Wechselwirkung mit Synaptobrevin II hin. Auf eine funktionelle Bedeutung dieser Interaktionen deuten Beobachtungen am Nematoden *C. elegans*: Mutationen in den TM-Segmenten dessen Synaptobrevin- beziehungsweise Syntaxinproteine korrelieren mit defekter Neurotransmission [10]. Eine attraktive Spekulation ist, daß Wechselwirkungen zwischen TM-Segmenten zur Ausbildung eines transienten Kanals, der sogenannten Fusionspore [11], bei der Neurotransmitterausschüttung beitragen.

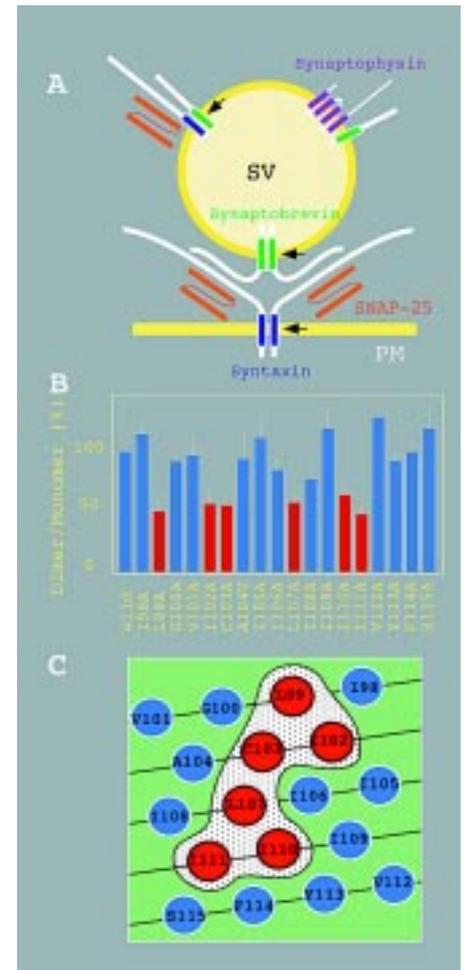
Ein Leuzinzippermotiv in interagierenden TM-Segmenten

TM-Segmente sind nicht nur bei der Erkennung zwischen Untereinheiten oligomerer Strukturen beteiligt, sondern auch bei der Faltung von polytopischen Membranproteinen. Bakteriorhodopsin – der Prototyp heptahelikaler Rezeptoren – kann nach Spaltung der Verbindungssequenzen zwischen den TM-Helices in Teilfragmente zerlegt und diese wieder zu einem funktionellen Protein rekonstituiert werden [2]. Die Information für die Anordnung der TM-Helices ist also weitgehend in diesen selbst enthalten. Damit übereinstimmend sind TM-Helices im Bakteriorhodopsin, dem photosynthetischen Reaktionszentrum und der Cytochrom C-Oxidase sehr dicht aneinander gepackt. Die Mehrzahl benachbarter TM-Helices in diesen Strukturen kreuzt sich unter positiven Winkeln und erinnert damit an Helix-Helix-Interaktionsdomänen vom Leuzinzipper-Typ. Die Analyse der Kontaktflächen zwischen diesen TM-Helixpaaren durch Messung von Atom-Atomabständen bestätigten diese strukturelle Homologie.

Abb. 3: Oligomerisierung von SNARE-Proteinen.
A. Synaptobrevin II kommt als Homodimer als auch im Komplex mit Synaptophysin beziehungsweise mit Syntaxin 1A/SNAP-25 vor. Interaktionen zwischen den TM-Segmenten (Pfeile) sind wichtig bei der Homodimerisierung des Synaptobrevins und vermutlich auch des Syntaxins bzw. der Interaktion beider Proteine in der gleichen Membran. SV, synaptisches Vesikel; PM, Plasmamembran.
B. Charakterisierung der Synaptobrevin II-TM-Helix-Helix-Kontaktfläche. Das Dimer/Monomerverhältnis wurde nach schonender Gelelektrophorese zwischen rekombinantem Wildtyp (=100%) Synaptobrevin und einzelnen Punktmutanten im TM-Segment verglichen. Kritische Reste sind rot markiert. B. Modellierung der kritischen Reste auf einem Helixnetzdiagramm ergibt eine zusammenhängende Kontaktfläche (modifiziert aus Ref. 9). Diese windet sich in rechtshändiger Weise um die Helix und läßt damit auf einen negativen Kreuzungswinkel der Helices im Dimer schließen.

Nahezu alle benachbarten Aminosäuren folgen nämlich einem für Leuzinzipper [12] typischen Heptadenmuster und einer entsprechenden Geometrie der Seitenkettenpackung. Dabei bilden die Seitenketten an den *a*, *d*, *e* und *g* Positionen mehrerer *abc-defg*-Heptaden geometrisch komplementäre und damit interaktionsfähige Helixoberflächen aus (Abb. 4 A, B, C; [13]). Um die Funktion membranständiger Leuzinzipper durch Proteindesign zu bestätigen, entwarf unsere Arbeitsgruppe eine Reihe artifiziel-ler TM-Segmente auf der Grundlage des Heptadenmotivs. Dazu wurden Hybridsequenzen aus Leuzin und Alanin konstruiert, das heißt aus einer Aminosäure mit einer voluminösen, hydrophoben und flexiblen Seitenkette und der Aminosäure mit der kleinsten Seitenkette (Abb. 4 D, E). Ihre Charakterisierung bestätigte, daß ein Heptadenmotiv aus Leuzin auf einer Alaningastsequenz als homotypisch interagierendes TM-Segment fungiert [14].

Bei einer Recherche in Proteinsequenzdatenbanken konnten degenerierte Versionen dieses idealisierten Leuzinzippermotivs in den TM-Segmenten verschiedener Membranproteine identifiziert werden. Tatsächlich belegt eine Reihe experimenteller Befunde eine Rolle dieser TM-Segmente bei homo- und heterotypischen Interaktionen eines Teils dieser Proteine. Ein Beispiel ist die, auch medizinisch relevante, Wechselwirkung zwischen dem Erythropoietinrezeptor (EpoR) in erythroiden Vorläuferzellen und dem gp55-Hüllmembranprotein von Friend-Leukämieviren. Diese Interaktion in der Plasmamembran virusinfizierter Zellen bewirkt die ligandenunabhängige Aktivierung des EpoR und damit eine unkontrollierte Proliferation der Erythrozyten. Interessanterweise ist die Struktur der TM-Segmente beider Proteine kritisch für diese heterotypische Interaktion [15]. Da beide TM-



Segmente bei der Datenbanksuche mit dem Leuzinzippermodell identifiziert wurden, dürfte auch der EpoR/gp55 Wechselwirkung ein membranständiger Leuzinzipper zugrunde liegen [14]. Inwieweit Interaktionen zwischen TM-Segmenten eine Rolle bei der ligandenaktivierten, konformationellen Umlagerung des EpoR [16] und anderer Zytokinrezeptoren spielen, ist gegenwärtig nicht klar. Dafür spricht jedoch, daß bestimmte hereditäre Sequenzvariationen ligandenunabhängige Rezeptoraktivierung auslösen können. So wird zum Beispiel der Neu-Rezeptor durch eine Punktmutation in der TM-Domäne in ein konstitutiv aktives Oncogen konvertiert [17] und eine aktivierende Mutation in der FGF3 Rezeptor TM-Domäne scheint für den Zwergwuchs des Menschen (Achondroplasie) verantwortlich zu sein [18].

Zusammenfassung und Ausblick

Diese Beispiele belegen die Funktion membranständiger Polypeptidsegmente bei der Faltung und Oligomerisierung integrierter Membranproteine. Die Interaktion zwischen TM-Helices erfordert in erster Linie eine strikte räumliche Komplementarität ihrer durch die Primärstruktur definierten

