

特约综述



在炎症与癌症的病理过程中,淋巴细胞与癌细胞的运动是其中的关键步骤。而决定这些细胞运动的一类重要分子是细胞粘附分子(cell adhesion molecule, CAM),其中整合素(integrin)家族是最重要的一类粘附分子。我们实验室致力于研究炎症与癌症中相关整合素的功能及其作用机制。涉及 $\alpha 4$ 整合素介导的细胞粘附、运动及相关信号转导的分子、结构基础及其生理功能;整合素 $\alpha 6\beta 4$ 的功能调控及其信号网络与乳腺癌的关系;以整合素为靶的抗体药物筛选及其应用。

<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=3>

整合素亲和力调控的机制

潘有东* 张坤 岳姣 陈剑峰*

(中国科学院分子细胞生物学重点实验室,生物化学与细胞生物学研究所,
中国科学院上海生命科学研究院,上海 200031)

摘要 整合素是一类重要的细胞表面粘附分子,是由 α 和 β 两个亚基组成的异源二聚体跨膜蛋白。整合素作为细胞内外的桥梁,一方面负责介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质以及细胞与病原体的相互作用,另一方面可以双向传递跨膜信号,对于免疫反应、免疫细胞的组织定位、凝血、组织愈合、癌细胞转移以及组织和器官的发育等都至关重要。整合素与配体的结合及其相关的信号转导是受到精确调控的,这个过程伴随着整合素的一系列构象变化。整合素的另外一个特性是其与配体的结合受到二价金属阳离子的调控。本文重点介绍了整合素功能与构象的关系以及金属离子调控整合素功能的分子机制。

关键词 整合素;构象;亲和力;二价阳离子;信号转导

细胞粘附(cell adhesion)是指细胞间或细胞与胞外基质间的结合,是多细胞生物生命活动的基础。细胞粘附通常由细胞粘附分子(cell adhesion molecule, CAM)介导。整合素(integrin, 亦称整连蛋白)作为一类重要的细胞表面粘附分子,是由 α 和 β 两个亚基通过非共价键连接组成的异源二聚体,属于第一类跨膜蛋白^[1,2]。自1987年整合素被发现至今,在脊椎动物中已经发现了18种 α 亚基和8种 β 亚基,组成至少24种整合素^[2](图1A)。整合素的多样性和复杂性,决定了它生理功能的多样性和重要性。整合素一方面可以与胞外基质或其它细胞表面的受体结合行使其粘附分子的功能,包括介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质以及细胞与病原体之间的相互作用^[3-7];另一方面可以通过其胞内区与胞内的细胞骨架蛋白和信号分子结合,通过由内到外(inside-out)和由外

到内(outside-in)双向传递跨膜信号^[8-11](图1B)。这些功能对于生物体的免疫反应、细胞迁移、免疫细胞的组织定位、凝血、组织愈合、组织和器官的发育,甚至神经系统的正常功能等都至关重要^[12-16]。已有的研究显示整合素与许多人类疾病密切相关,如心血管疾病、血栓、炎症以及癌症等等^[17,18](图1A)。

1 整合素的结构

对整合素结构与功能的理解得益于X射线晶体衍射技术。从2001年整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的全部胞外结构获得解析至今,已经有三种整合素的整体胞外结构被

973国家重点基础研究发展计划(No.2010CB529703)和国家自然科学基金(No.30970604, No.30700119)资助项目

*通讯作者。Tel: 021-54921142, E-mail: ydpan@sibs.ac.cn; E-mail: jfchen@sibs.ac.cn

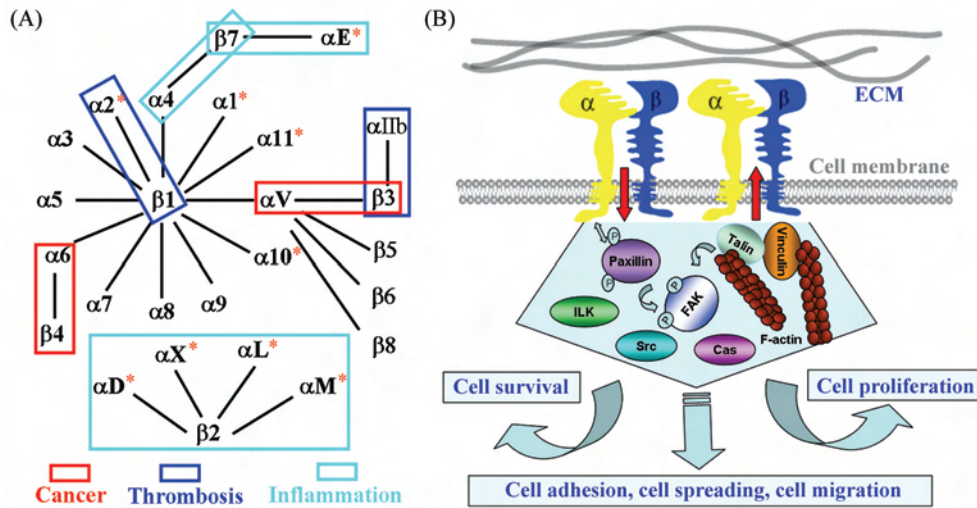


图1 整合素家族及其相关信号转导

A: 整合素家族与相关疾病。在脊椎动物中18种 α 亚基和8种 β 亚基相互组合形成24种不同的整合素。一种整合素可以识别多种配体蛋白；一些配体蛋白也可以被多种整合素所识别。在18种 α 亚基中，有9种 α 亚基含有I结构域(红色星号标注)；B: 整合素介导的信号转导。整合素可以通过inside-out和outside-in双向传递跨膜信号。一方面，细胞内的一些信号分子如talin、paxillin可以结合到整合素的胞内区，诱导胞内区构象变化并通过“远程传导”引发胞外结构域的一系列构象变化而激活整合素，这一过程被称为inside-out信号转导；另一方面，整合素通过其胞外区与胞外配体结合诱导其整体构象的变化和其在细胞膜表面的聚集，引起细胞内细胞骨架的变化，进而招募相关的胞内信号分子。同时整合素 α 和 β 亚基的胞内结构域也彼此分开与胞内的信号分子相结合，激活胞内的相应信号途径，介导细胞完成一系列的生理功能。这一过程被称为outside-in信号转导。

Fig.1 Integrin family and their related signaling

A: integrin family and related diseases. In vertebrates, 18 different α subunits and 8 different β subunits form at least 24 heterodimers. They recognize distinct but overlapping ligands. Half of the α subunits contain I domain (asterisks); B: integrin-mediated signal transduction. Integrin could transmit signals bidirectionally across the plasma membrane. On one hand, binding of particular proteins (for example, talin, paxillin) to integrin cytoplasmic domains induces conformational changes that activate integrin ligand binding (inside-out signaling). On the other hand, ligand binding triggers the propagation of extracellular conformational changes across the plasma membrane to the cytoplasmic domains and activates intracellular signaling (outside-in signaling), such as FAK phosphorylation and cytoskeleton rearrangement.

解析： $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 和 $\alpha_X\beta_2$ ^[19-24]。从整合素的晶体结构上看，整合素由头部和腿部两大部分组成，每一部分都包括多个结构域。

1.1 整合素的 α 亚基

整合素的 α 亚基由大约1 000个氨基酸组成，包括头部的 β -propeller结构域，腿部的thigh、genu、calf1、calf2四个结构域以及跨膜区和胞内区(图2A)。在18种 α 亚基中，有9种 α 亚基在 β -propeller结构域中插入了一段结构域(inserted domain, I结构域)(图1A和图2A)。对于 α 亚基含有I结构域的整合素， α 亚基I结构域是其配体结合区域^[25]。处于 α 亚基膝盖部位的genu结构域是 α 亚基最具柔性的部位，对整合素构象和配体亲和力的调节起着重要作用^[21,26]。

1.2 整合素的 β 亚基

整合素的 β 亚基由大约700个氨基酸组成，包括头部的 β I结构域，腿部的PSI、hybrid、I-EGF1、I-EGF2、I-EGF3、I-EGF4、 β -tail结构域以及跨膜区和胞内区(图2A)。不同于整合素家族中的其它 β 亚

基， β_4 亚基由大约1 700个氨基酸组成，其胞内区超过1 000个氨基酸。对于 α 亚基不含I结构域的整合素， β 亚基的I结构域是整合素与配体的结合区域。此外，处于 β 亚基转角位置的PSI结构域和I-EGF结构域对整合素的构象调节非常重要，像一个活塞调控着整合素的构象变化^[27-30]。通过突变改变PSI结构域的刚性或者I-EGF2结构域中C1-C2链的长度都可以改变整合素的配体亲和力^[31]。

2 整合素的构象调节

整合素与其配体的结合是一种动态可逆的过程，该过程是由整合素对其配体亲和力的动态调节决定的。研究显示整合素的胞外区可以通过快速的整体构象变化(小于1秒)来调节其对配体的亲和力。整合素的构象根据其配体亲和力的大小可分为以下3种：(1)低亲和力(low affinity)构象；(2)中间亲和力(intermediate affinity)构象；(3)高亲和力(high affinity)构象^[4]。

在低亲和力构象中，整合素的腿部结构域在 α

亚基 α 和 β 亚基I-EGF1-2部位弯曲并且紧密排列, 致使头部结构域朝向细胞膜呈现倒V型拓扑结构, 同时 α 和 β 亚基的跨膜区以及胞内区紧密联系在一起, 整合素配体结合位点处于低亲和力构象, 这时整合素与配体以低亲和力结合^[32,33](图2B和图2C)。当遇到某种激活信号后, 整合素 α 和 β 亚基的跨膜区以及胞内区彼此分开, 整合素膝盖部位完全伸展引起腿部结构域直立并以大约70 Å分离, 整合素头部结构域远离细胞膜(200 Å)并伴随整合素 β 亚基hybrid结构域外摆大约60度, 整合素配体结合位点构象也

发生相应的改变, 这时整合素呈现高亲和力构象与配体以高亲和力结合^[32,33](图2B和图2C)。介于上述两种构象之间的状态被称为中间亲和力构象。

在生理状态下, 细胞膜上的整合素不是完全处于低亲和力构象或者高亲和力构象, 而是在各种亲和力构象之间处于一种动态的平衡。在没有任何刺激物刺激的情况时, 这种平衡偏向于折叠的低亲和力构象, 整合素与配体以低亲和力结合。当细胞遇到激活信号后, 胞内的相关信号通路被激活。一些胞内蛋白, 如距蛋白(talin), 会结合到整合素的胞

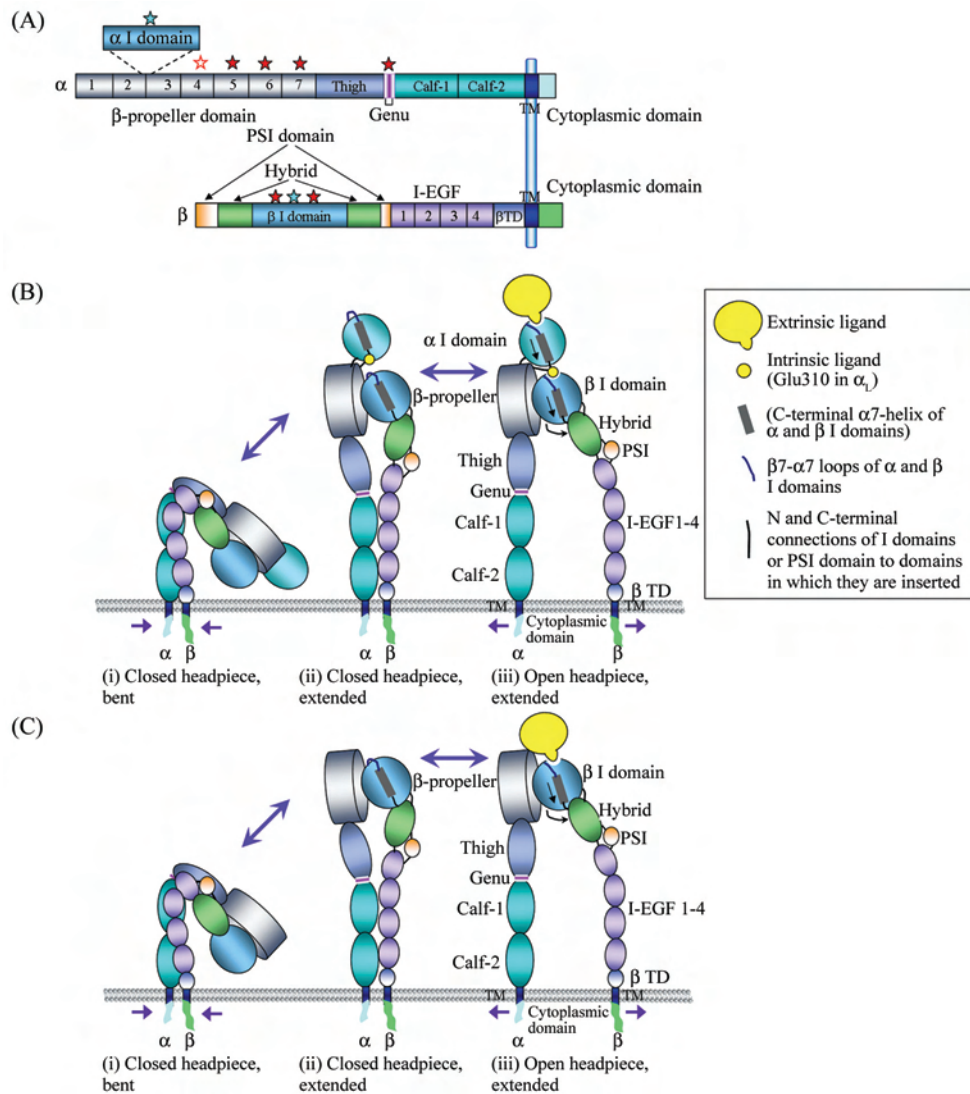


图2 整合素的一级结构及构象动态变化示意图

A: 整合素结构域在一级结构中的分布。黑色虚线表示 α 亚基I结构域的插入部位。星号表示金属离子结合位点, 钙离子和镁离子分别用红色和青色表示。空心星号表示部分整合素 α 亚基 β -propeller结构域第4个重复结构中含有的金属离子结合位点; B: α 亚基含有I结构域的整合素构象动态变化示意图; C: α 亚基不含I结构域的整合素构象动态变化示意图。

Fig.2 Integrin architecture and conformational rearrangement associated with affinity change

A: organization of domains within the primary structure. Some α subunits contain an I domain inserted in the position denoted by the broken lines. Red and cyan asterisks denote Ca^{2+} and Mg^{2+} binding sites, respectively. Open asterisk denotes the Ca^{2+} binding site in the fourth repeat of some α subunit β -propeller domain; B, C: conformational rearrangement of integrins containing α subunit I domain (B) and without α subunit I domain (C) during activation.

内区, 通过inside-out信号诱导整合素的构象变化而激活整合素, 使动态平衡偏向于伸展的高亲和力构象^[10,34-37]。另一方面胞外配体的结合也可以诱导整合素的构象变化以及整合素在细胞膜表面上的簇聚(clustering), 通过outside-in信号转导进一步引起整合素的构象变化, 激活相关的胞内信号通路^[38-40]。

3 整合素的配体结合位点

整合素可以识别多种胞外基质蛋白以及表达

在细胞表面的受体蛋白。一种整合素可以识别多种配体蛋白; 一些配体蛋白也可以被多种整合素所识别。整合素及其配体的多样性以及在生物体内的广泛分布, 决定了其生理功能的多样性和重要性。

3.1 整合素 α 亚基I结构域

对于 α 亚基含有I结构域的整合素, α 亚基I结构域是其配体结合区域(图2B和图3A)。由于整合素 α 亚基I结构域可以不依赖于其它结构域单独表达纯化, 至今已经获得了高、低亲和力构象的 α 亚基I结

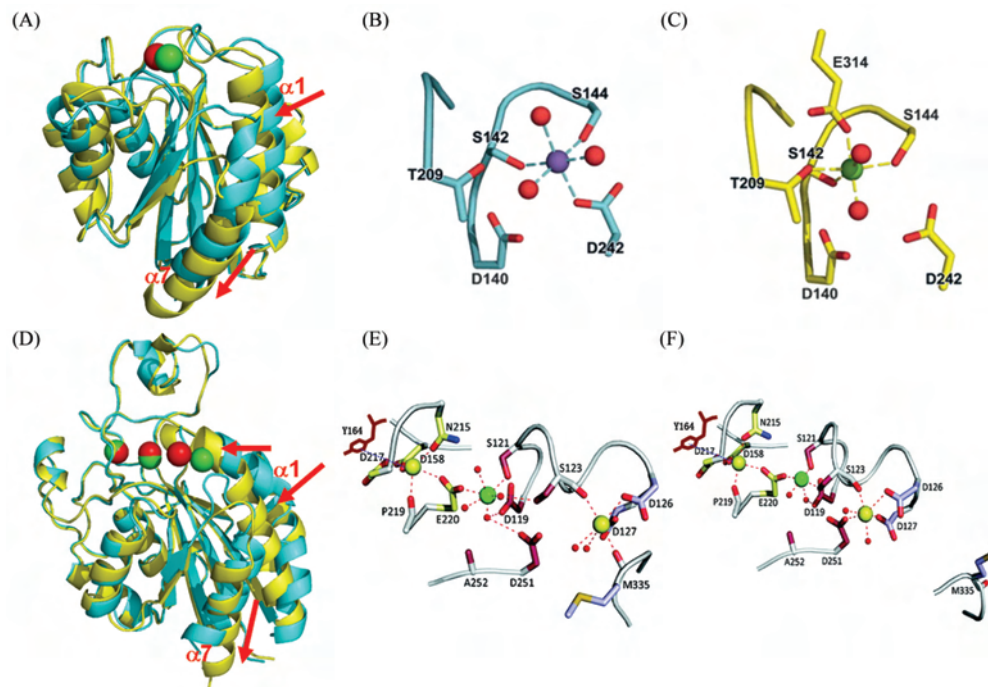


图3 整合素 α 亚基I结构域与 β 亚基I结构域结构及构象调节

A: 整合素 α_M 亚基I结构域低亲和力构象(pdb1JLM)和高亲和力构象(pdb1IDO)Superposition结果。青色和黄色分别代表 α_M 亚基I结构域低亲和力构象和高亲和力构象。绿色球体代表低亲和力构象中MIDAS金属离子, 红色球体代表高亲和力构象中MIDAS金属离子; B: 整合素 α_M 亚基I结构域低亲和力构象(pdb1JLM)中MIDAS与金属离子相互作用示意图; C: 整合素 α_M 亚基I结构域高亲和力构象(pdb1IDO)中MIDAS与金属离子相互作用示意图; D: 整合素 $\alpha_{Ib}\beta_3$ 折叠的低亲和力构象(pdb3FCS)和伸展的高亲和力构象(pdb3FCU)中 β_3 亚基I结构域Superposition结果。青色和黄色分别代表 β_3 亚基I结构域的低亲和力构象和高亲和力构象。绿色球体代表低亲和力构象中结合的金属离子, 红色球体代表高亲和力构象中结合的金属离子; E: 整合素 $\alpha_{Ib}\beta_3$ 折叠的低亲和力构象(pdb3FCS)中 β_3 亚基I结构域金属离子结合位点与金属离子相互作用示意图; F: 整合素 $\alpha_{Ib}\beta_3$ 伸展的高亲和力构象(pdb3FCU)中 β_3 亚基I结构域金属离子结合位点与金属离子相互作用示意图。金属离子结合位点从左到右依次为SyMBS、MIDAS和ADMIDAS。与金属离子相互作用的N原子和O原子分别用蓝色和红色表示。红色虚线表示O原子与金属离子之间形成的相互作用, 蓝色虚线表示Y164所带的苯环与SyMBS金属离子之间形成的阳离子- π 相互作用。

Fig.3 Structure and conformational rearrangements of integrin α subunit I domain and β subunit I domain

A: superposition of integrin α_M subunit I domains in low affinity conformation (pdb1JLM, cyan) and high affinity conformation (pdb1IDO, green). Green and red spheres denote the MIDAS metal ions in low and high affinity conformation, respectively; B: metal ion binding sites in α_M subunit I domain with low affinity conformation (pdb1JLM). The coordination is shown by blue dashed lines; C: metal ion binding sites in α_M subunit I domain with high affinity conformation (pdb1IDO). The coordination is shown by yellow dashed lines; D: superposition of integrin β subunit I domains from $\alpha_{Ib}\beta_3$ in low affinity conformation (pdb3FCS, cyan) and high affinity conformation (pdb3FCU, yellow). Green and red spheres denote the metal ions in low- and high-affinity β subunit I domain, respectively; E: metal ion binding sites in β subunit I domain from $\alpha_{Ib}\beta_3$ in low affinity conformation (pdb3FCS); F: metal ion binding sites in β subunit I domain from $\alpha_{Ib}\beta_3$ in high affinity conformation (pdb3FCU). The linear cluster of β I domain metal binding sites are shown as SyMBS, MIDAS, and ADMIDAS from left to right, with coordinated metal ions shown as spheres. Ca^{2+} and Mg^{2+} ions are colored in yellow and green, respectively. N and O atoms involved in metal-coordinating side chains or carbonyl backbones are colored in blue and red, respectively. Polar between O atoms and metal ions is shown by red dashed lines and the cation- π interaction between the aromatic side chain of Y164 and SyMBS metal ion is shown by blue dashed lines.

构域晶体结构^[41,42], 因此对 α 亚基I结构域的结构和构象变化研究得相对比较清楚。该结构域是一个Rossmann折叠, 其核心是一个被 α 螺旋包围的 β 片层(图3A)。在I结构域的顶部为一个金属离子结合位点(metal ion-dependent adhesion site, MIDAS)。该位点可以被一个二价金属离子占据, 如镁离子(图3B和图3C)。对于 α 亚基含有I结构域的整合素, 含有RGD序列的小的环状多肽就结合于I结构域 β 片层之间的凹槽中。当整合素处于低亲和力构象时, α 亚基I结构域MIDAS不利于配体的结合。当整合素受到某种刺激后, α 亚基I结构域构象会发生系列变化: β 1- α 1、 β 4- α 5以及 β 6- α 7侧链发生重排, α 7螺旋下移, 诱导 α 亚基I结构域转变为高亲和力构象, 从而配体可与整合素以高亲和力结合^[42](图2B和图3A)。

3.2 整合素 β 亚基I结构域

整合素 β 亚基I结构域与 α 亚基I结构域结构基本类似, 主要有以下两点不同: (1) β 亚基I结构域中多出一段由20~30个氨基酸组成的序列(specificity-determining loop, SDL), 负责调控整合素的配体结合特异性^[43,44]。SDL序列的突变或者互换可以影响整合素与配体的结合^[44,45]。例如将 β 3整合素SDL的一部分替换到 β 1整合素相应的位置上可以改变其配体特异性, 使 β 1整合素识别 β 3整合素的配体^[45]。(2)整合素 β 亚基I结构域除了MIDAS金属离子结合位点之外, 在它两侧还有两个金属离子结合位点-SyMBS (the synergistic metal ion binding site)和ADMIDAS (the adjacent to MIDAS)(图3D)^[19,20,23]。

对于 α 亚基不含I结构域的整合素, β 亚基I结构域是整合素与配体直接结合区域。在整合素活化过程中, 伴随着 β 亚基hybrid结构域的外摆, β 亚基I结构域的构象也会发生系列变化: β 1- α 1、 β 4- α 5以及 β 6- α 7侧链发生重排, α 7螺旋下移以及MIDAS和ADMIDAS附近构象变化, 最终将MIDAS附近构象转变为配体高亲和力构象^[21](图2C和图3D)。

3.3 整合素 α 亚基I结构域和 β 亚基I结构域之间的联系

整合素 α 亚基和 β 亚基通过 α 亚基I结构域 α 7螺旋上的一个称为内源配体的负电氨基酸(在 α L中Glu310)与 β 亚基I结构域的MIDAS相联系。对于 α 亚基含有I结构域的整合素, 如 α L β 2, 伴随着整合素的激活, β 2亚基I结构域构象发生变化, β 2亚基MIDAS与 α L亚基Glu310发生作用引起 α L亚基I结构域 α 7螺旋

下移, 进一步诱发 α L亚基I结构域配体结合区域的构象变化, 激活整合素^[46-48](图2B)。同时配体的结合也可以通过 α L亚基I结构域 α 7螺旋上的Glu310与 β 2亚基I结构域MIDAS相作用, 将拉力传给 β 2亚基引起 β 2亚基构象变化, 进一步激活整合素。Yang^[48]等的研究提供了 α L亚基和 β 2亚基之间这种相互作用的证据。通过把 α L Glu310和 β 2 MIDAS位Ala210同时突变成半胱氨酸在它们之间引入一对固定的二硫键可以组成增强整合素的配体亲和力, 而把这两个位点单独突变成半胱氨酸则可以抑制整合素的活化^[48]。

4 金属离子对整合素的调控

作为一种金属蛋白, 整合素与配体的结合必须依赖于二价金属阳离子^[49]。在生理条件下, 钙离子与镁离子同时存在(约1 mmol/L)。通常钙离子对整合素与配体的结合具有抑制作用, 将钙离子从钙、镁中去除后, 可以激活整合素^[50,51]。微摩尔水平低浓度的钙离子可以通过与镁离子的协同作用促进整合素与配体的结合, 而毫摩尔水平高浓度的钙离子则可以抑制整合素与配体的结合^[52]。另外, 锰离子作为一种特殊的激活剂, 可以引起整合素的高度活化^[53]。

近十年来对整合素金属离子调控机制的研究有了很大进展。目前已经鉴定出的整合素金属离子结合位点有: 部分 α 亚基 β -propeller第4个重复结构上的一个金属离子结合位点; α 亚基 β -propeller第5~7重复结构上的三个金属离子结合位点; α 亚基genu结构域的一个金属离子结合位点; β 亚基I结构域的三个金属离子结合位点-SyMBS, MIDAS和ADMIDAS; 对于 α 亚基含有I结构域的整合素, α 亚基I结构域顶部的一个金属离子结合位点-MIDAS(图2A)。

4.1 α 亚基金属离子结合位点

对整合素 α 亚基金属离子结合位点的研究主要集中在I结构域MIDAS, 而对 α 亚基其它几个金属离子结合位点的研究相对较少。目前认为 α 亚基中除MIDAS以外的金属离子结合位点的功能主要是辅助整合素在金属离子结合部位形成特定的结构以维持整合素的整体构象^[54]。蛋白晶体结构显示在整合素活化前后 α 亚基所有金属离子结合位点都被相应的金属离子占据^[19]。

4.1.1 α 亚基MIDAS 对于 α 亚基含有I结构域的整合素, α 亚基I结构域MIDAS是整合素与配体的直

接作用位点。以 α_M 亚基I结构域为例,当整合素处于低亲和力构象时,MIDAS附近的Ser142、Ser144以及Asp242与镁离子之间形成直接相互作用以稳固镁离子的结合,这时整合素与配体以低亲和力结合(图3B);当整合素被激活转变为高亲和力构象后,MIDAS附近构象发生重排,Asp242发生位移从而不能与MIDAS镁离子形成直接相互作用,取而代之的是Thr209提供的羟基和配体上Glu314提供的酸性侧链,这时整合素与配体以高亲和力结合(图3C)。利用等温滴定量热法(isothermal titration calorimetry, ITC)和表面等离子共振技术(surface plasmon resonance, SPR), Vorup-Jensen等^[25]研究证实处于不同构象的 α_M 亚基I结构域对镁离子的亲和能力有所不同,低亲和力构象更有利于镁离子的结合。

4.2 β 亚基金属离子结合位点

整合素 β 亚基I结构域的金属离子结合位点是一个由三个金属离子结合位点组成的金属离子结合位点簇,从左往右依次为SyMBS、MIDAS和ADMIDAS(图3D~图3F)。对整合素 β 亚基金属离子结合位点功能的研究相对比较清楚,但是还存在一些问题有待解决。

4.2.1 β 亚基MIDAS MIDAS作为联系 α 亚基和 β 亚基的关键性位点(α 亚基含有I结构域的整合素)或整合素与配体的直接结合位点(α 亚基不含I结构域的整合素),对整合素的配体结合亲和力以及信号转导至关重要。整合素 $\alpha_{1b}\beta_3$ 蛋白晶体结构显示, β_3 亚基I结构域MIDAS Glu220、Asp119、Ser121以及Ser123都参与了金属离子相互作用(图3E和图3F)。对整合素 $\alpha_2\beta_1$ 和 $\alpha_4\beta_7$ 的研究发现,将 β_1 MIDAS Asp130(在 β_3 中为Asp119)以及 β_7 MIDAS Asp140或Ser142(在 β_3 中分别对应于Asp119和Ser121)突变成Ala都可以抑制整合素与配体的结合^[55,56]。另外在整合素的不同亲和力构象中,MIDAS附近的氨基酸排列也有所不同^[23](图3E和图3F),因此推测整合素通过改变MIDAS附近的构象以及MIDAS的极性来调控MIDAS金属离子的结合和整合素的配体亲和力。

4.2.2 β 亚基SyMBS SyMBS是整合素的正调控位点,整合素的活化依赖于SyMBS与金属离子的结合^[55-58]。一般认为SyMBS主要通过协同MIDAS行使功能。当钙离子和镁离子浓度分别处于微摩尔水平时,钙离子通过与SyMBS的结合与结合在MIDAS的镁离子一起介导整合素与配体的结合^[52]。

最近对整合素 $\alpha_4\beta_7$ 的研究发现,SyMBS通过与其附近的F185(在 β_3 中为Y164)的苯环之间形成阳离子- π 相互作用而行使其功能^[59](图3D~图3F)。该阳离子- π 相互作用将整合素 β 亚基金属离子结合位点与整合素的另外一个调控元件-SDL联系起来^[59]。阳离子- π 相互作用的丧失严重影响了高亲和力 $\alpha_4\beta_7$ 介导的细胞稳定粘附,但是对低亲和力 $\alpha_4\beta_7$ 介导的细胞滚动粘附影响很小。此外,阳离子- π 相互作用的破坏抑制了 $\alpha_4\beta_7$ 介导的双向跨膜信号传递以及整合素介导的细胞铺展和迁移^[59]。

4.2.3 β 亚基ADMIDAS ADMIDAS的功能比较复杂。在整合素活化过程中,伴随着ADMIDAS附近构象的变化以及ADMIDAS的位移(图3D~图3F)。ADMIDAS被钙离子占据可以使整合素处于低亲和力构象。在整合素 β_3 低亲和力构象中,位于 β_6 - α_7 loop上的Met335主链碳酰基的氧原子与ADMIDAS的钙离子发生直接相互作用,限制了ADMIDAS和 α_7 螺旋的空间位移,使整合素处于低亲和力构象(图3E)。当整合素活化后, β_3 亚基I结构域 α_7 螺旋的下移和ADMIDAS的左移破坏了Met335与ADMIDAS金属离子之间的相互作用。而Asp251侧链羧基向ADMIDAS的位移使之同时与ADMIDAS和MIDAS金属离子之间形成相互作用,从而稳定ADMIDAS与MIDAS金属离子的结合及其相对空间位置,使整合素处于高亲和力构象(图3F)。对 $\alpha_4\beta_7$ 的研究发现,高浓度的钙离子(5 mmol/L)可以通过与ADMIDAS的结合抑制整合素的活性,而锰离子通过竞争钙离子在ADMIDAS的结合激活整合素^[55,58]。其原因可以通过钙离子与锰离子的特性得以解释:钙离子为七配位而锰离子为六配位,因此钙离子可以很好地与Met335(β_3 编号)主链碳酰基的氧原子形成相互作用维持整合素的低活性构象,而锰离子无法与主链氧原子形成很好的相互作用从而破坏了Met335与ADMIDAS之间的相互作用,进而诱导整合素的活化。有趣的是,ADMIDAS的突变(影响ADMIDAS金属离子的结合)对整合素配体亲和力的影响呈现种属特异性:在只能介导细胞在配体表面紧密粘附的整合素 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 以及 $\alpha_{1b}\beta_3$ 中,ADMIDAS的突变抑制了整合素与配体的结合^[56,57,60];在既可以介导细胞滚动粘附也可以介导紧密粘附的整合素 $\alpha_4\beta_7$ 和 $\alpha_1\beta_2$ 中,ADMIDAS的突变增强了整合素与配体的结合^[55,58]。关于这种区别的具体分子机制还不清楚。从 β_3 和 β_2

的晶体结构上推测原因如下: 在 β_3 中, 紧接着Asp251的氨基酸是Ala252, 而在 β_2 中相对应的则是Asp242和Asp243。在整合素活化过程中, Ala252和Asp243都向ADMIDAS位移了0.7 Å。在 β_3 中Ala252的位移可能不起作用, 而在 β_2 中Asp243的位移能够增强MIDAS的负性, 从而降低MIDAS的配体结合亲和力, 整合素与配体以低亲和力结合介导细胞的滚动粘附。当把ADMIDAS突变后, 在 β_3 中ADMIDAS不能继续结合金属离子, 从而不能稳固整合素的高亲和力构象致使整合素的配体结合能力丧失。而在 β_2 中Asp243向ADMIDAS的位移增强了ADMIDAS的负性使之仍能结合金属离子, 同时由于ADMIDAS向MIDAS的位移最终导致MIDAS的正性提高, 从而增强整合素与配体的结合。这种机制需要后续实验进一步验证。

另一方面, 对整合素 β_1 、 β_2 、 β_3 以及 β_7 ADMIDAS突变的研究发现, ADMIDAS的突变都影响了整合素介导的信号传递^[55-58,60]。从构象上分析ADMIDAS处于MIDAS和hybrid结构域之间, 通过 α_7 螺旋将两者联系起来。因此, 推测ADMIDAS同时也作为MIDAS和hybrid结构域之间的变构抑制剂行使信号转导的作用。

5 展望

整合素家族在人体各组织、细胞中分布广泛, 通过介导细胞与细胞之间以及细胞与胞外基质之间的粘附、信号转导发挥其生理功能并参与多个病理过程。在药物研发以及临床治疗上, 整合素作为一个重要的药物靶点一直以来都是各大制药公司的研究热点。近些年来对整合素拮抗剂的研究策略大部分集中在阻碍配体与整合素的结合上, 通过制备整合素特异性抗体或设计特殊的小分子化合物或者合成类似RGD多肽小片段竞争性阻断配体与整合素的结合, 从而影响整合素的功能^[16]。

虽然对整合素的构象调节和金属离子调节机制研究有很大的进展, 但是还有很多问题有待阐明: (1)整合素与配体的结合位点在胞外头部区域, 而破坏胞内段的相互结合就可以提高其与配体的亲和力, 那么胞内段如何实现这样一个精确的“远程控制”? (2)整合素活化过程伴随整体构象的一系列变化, 头部远离细胞膜大约200 Å的距离以及胞内段相互分离, 那么这个过程是否需要能量消耗? 如果

需要, 这种能量又从何而来? (3)单独的镁离子和锰离子都可以增强整合素的配体亲和力, 但是它们所激活的水平和特异性有所区别, 那么, 这两种离子是分别通过何种机制调控整合素活性的? (4)在生理条件下, 机体是如何利用金属离子来调控由整合素介导的一系列生理过程的? 对以上这些问题的阐明将有助于我们进一步了解与整合素相关的生理、病理过程, 并为相关药物的开发提供理论基础和指导。

参考文献(References)

- 1 Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 1990; 4: 2868-80.
- 2 Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signalling machines. *Cell* 2002; 110(6): 673-87.
- 3 Arnaout MA. Integrin structure: new twists and turns in dynamic cell adhesion. *Immunol Rev* 2002; 186: 125-40.
- 4 Askari JA, Buckley PA, Mould AP, Humphries MJ. Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 2): 165-70.
- 5 Caswell PT, Norman JC. Integrin trafficking and the control of cell migration. *Traffic* 2006; 7(1): 14-21.
- 6 Huttenlocher A, Sandborg RR, Horwitz AF. Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7(5): 697-706.
- 7 Huttenlocher A, Ginsberg MH, Horwitz AF. Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. *J Cell Biol* 1996; 134(6): 1551-62.
- 8 Zhu J, Carman CV, Kim M, Shimaoka M, Springer TA, Luo BH. Requirement of α and β subunit transmembrane helix separation for integrin outside-in signaling. *Blood* 2007; 110(7): 2475-83.
- 9 Arnaout MA, Mahalingam B, Xiong JP. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 381-410.
- 10 Bouaouina M, Lad Y, Calderwood DA. The N-terminal Domains of Talin Cooperate with the Phosphotyrosine Binding-like Domain to Activate β_1 and β_3 Integrins. *J Biol Chem* 2008; 283(10): 6118-25.
- 11 Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 2002; 110(5): 599-611.
- 12 Bon G, Folgiero V, Di Carlo S, Sacchi A, Falcioni R. Involvement of $\alpha_6\beta_4$ integrin in the mechanisms that regulate breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 2007; 9(1): 203.
- 13 Di Sabatino A, Rovedatti L, Rosado MM, Carsetti R, Corazza GR, MacDonald TT. Increased expression of mucosal addressin cell adhesion molecule 1 in the duodenum of patients with active celiac disease is associated with depletion of integrin $\alpha_4\beta_7$ -positive T cells in blood. *Hum Pathol* 2009; 40(5): 699-704.
- 14 Varner JA, Cheresh DA. Tumor angiogenesis and the role of vascular cell integrin $\alpha_v\beta_3$. *Important Adv Oncol* 1996; 69-87.
- 15 Tanaka T, Ohtsuka Y, Yagita H, Shiratori Y, Omata M, Okumura K. Involvement of α_1 and α_4 integrins in gut mucosal injury of graft-versus-host disease. *International Immunology* 1995; 7(8): 1183-9.
- 16 Cox D, Brennan M, Moran N. Integrins as therapeutic targets:

- lessons and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9(10): 804-20.
- 17 Garmy-Susini B, Varner JA. Roles of integrins in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Lymphat Res Biol* 2008; 6(3-4): 155-63.
- 18 von Andrian UH, Engelhardt B. α_4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. *N Engl J Med* 2003; 348(1): 68-72.
- 19 Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott DL, *et al.* Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$. *Science* 2001; 294(5541): 339-45.
- 20 Xiong JP, Stehle T, Zhang R, Joachimiak A, Frech M, Goodman SL, *et al.* Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 2002; 296(5565): 151-5.
- 21 Xiong JP, Mahalingham B, Alonso JL, Borrelli LA, Rui X, Anand S, *et al.* Crystal structure of the complete integrin $\alpha_v\beta_3$ ectodomain plus an α/β transmembrane fragment. *J Cell Biol* 2009; 186(4): 589-600.
- 22 Xie C, Zhu J, Chen X, Mi L, Nishida N, Springer TA. Structure of an integrin with an α I domain, complement receptor type 4. *Embo J* 2010; 29(3): 666-79.
- 23 Zhu J, Luo BH, Xiao T, Zhang C, Nishida N, Springer TA. Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. *Mol Cell* 2008; 32(6): 849-61.
- 24 Springer TA, Zhu J, Xiao T. Structural basis for distinctive recognition of fibrinogen YC peptide by the platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J Cell Biol* 2008; 182(4): 791-800.
- 25 Vorup-Jensen T, Waldron TT, Astrof N, Shimaoka M, Springer TA. The connection between metal ion affinity and ligand affinity in integrin I domains. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1774(9): 1148-55.
- 26 Xie C, Shimaoka M, Xiao T, Schwab P, Klickstein LB, Springer TA. The integrin α subunit leg extends at a Ca^{2+} -dependent epitope in the thigh/genu interface upon activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(43): 15422-7.
- 27 Zang Q, Springer TA. Amino acid residues in the PSI domain and cysteine-rich repeats of the integrin β_2 subunit that restrain activation of the integrin $\alpha_x\beta_2$. *J Biol Chem* 2001; 276(10): 6922-9.
- 28 Peterson JA, Nyree CE, Newman PJ, Aster RH. A site involving the "hybrid" and PSI homology domains of GPIIIa (β_3 -integrin subunit) is a common target for antibodies associated with quinine-induced immune thrombocytopenia. *Blood* 2003; 101(3): 937-42.
- 29 Takagi J, Beglova N, Yalamanchili P, Blacklow SC, Springer TA. Definition of EGF-like, closely interacting modules that bear activation epitopes in integrin β subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(20): 11175-80.
- 30 Shi M, Sundramurthy K, Liu B, Tan SM, Law SK, Lescar J. The crystal structure of the plexin-semaphorin-integrin domain/hybrid domain/I-EGF1 segment from the human integrin β_2 subunit at 1.8-Å resolution. *J Biol Chem* 2005; 280(34): 30586-93.
- 31 Smagge BJ, Huang PS, Ban YE, Baker D, Springer TA. Modulation of integrin activation by an entropic spring in the β -knee. *J Biol Chem* 2010; 285(43): 32954-66.
- 32 Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 619-47.
- 33 Mould AP, Barton SJ, Askari JA, McEwan PA, Buckley PA, Craig SE, *et al.* Conformational changes in the integrin βA domain provide a mechanism for signal transduction via hybrid domain movement. *J Biol Chem* 2003; 278(19): 17028-35.
- 34 Calderwood DA. Talin controls integrin activation. *Biochem Soc Trans* 2004; 32(Pt3): 434-7.
- 35 Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, *et al.* Talin binding to integrin β tails: a final common step in integrin activation. *Science* 2003; 302(5642): 103-6.
- 36 Guan JL. Role of focal adhesion kinase in integrin signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29 (8-9): 1085-96.
- 37 Liu S, Thomas SM, Woodside DG, Rose DM, Kiosses WB, Pfaff M, *et al.* Binding of paxillin to α_4 integrins modifies integrin-dependent biological responses. *Nature* 1999; 402(6762): 676-81.
- 38 Upla P, Marjomaki V, Kankaanpaa P, Ivaska J, Hyypia T, Van Der Goot FG, *et al.* Clustering induces a lateral redistribution of $\alpha_2\beta_1$ integrin from membrane rafts to caveolae and subsequent protein kinase C-dependent internalization. *Mol Biol Cell* 2004; 15(2): 625-36.
- 39 Gottschalk KE, H. Kessler. A computational model of transmembrane integrin clustering. *Structure* 2004; 12(6): 1109-16.
- 40 Cluzel C, Saltel F, Lussi J, Paulhe F, Imhof BA, Wehrle-Haller B. The mechanisms and dynamics of $\alpha_v\beta_3$ integrin clustering in living cells. *J Cell Biol* 2005; 171(2): 383-92.
- 41 Lee JO, Rieu P, Arnaout MA, Liddington R. Crystal structure of the A domain from the α subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* 1995; 80(4): 631-8.
- 42 Lee JO, Bankston LA, Arnaout MA, Liddington RC. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure* 1995; 3(12): 1333-40.
- 43 Takagi J, DeBottis DP, Erickson HP, Springer TA. The role of the specificity-determining loop of the integrin β subunit I-like domain in autonomous expression, association with the α subunit, and ligand binding. *Biochemistry* 2002; 41(13): 4339-47.
- 44 Tsuruta D, Hopkinson SB, Lane KD, Werner ME, Cryns VL, Jones JC. Crucial role of the specificity-determining loop of the integrin β_4 subunit in the binding of cells to laminin-5 and outside-in signal transduction. *J Biol Chem* 2003; 278(40): 38707-14.
- 45 Takagi J, Kamata T, Meredith J, Puzon-McLaughlin W, Takada Y. Changing ligand specificities of $\alpha_v\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ integrins by swapping a short diverse sequence of the β subunit. *J Biol Chem* 1997; 272(32): 19794-800.
- 46 Huth JR, Olejniczak ET, Mendoza R, Liang H, Harris EA, Lupher ML, Jr., *et al.* NMR and mutagenesis evidence for an I domain allosteric site that regulates lymphocyte function-associated antigen 1 ligand binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(10): 5231-6.
- 47 Alonso JL, Essafi M, Xiong JP, Stehle T, Arnaout MA. Does the integrin αA domain act as a ligand for its βA domain? *Curr Biol* 2002; 12(10): R340-2.
- 48 Yang W, Shimaoka M, Salas A, Takagi J, Springer TA. Inter-subunit signal transmission in integrins by a receptor-like interaction with a pull spring. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(9): 2906-11.
- 49 Xiong JP, Stehle T, Goodman SL, Arnaout MA. Integrins, cations and ligands: making the connection. *J Thromb Haemost* 2003; 1(7): 1642-54.
- 50 Leitinger B, McDowall A, Stanley P, Hogg N. The regulation of

- integrin function by Ca^{2+} . *Biochim Biophys Acta* 2000; 1498(2-3): 91-8.
- 51 Mould AP, Akiyama SK, Humphries MJ. Regulation of integrin $\alpha_5\beta_1$ -fibronectin interactions by divalent cations. *J Biol Chem* 1995; 270(44): 26270-7.
- 52 Chen JF, Takagi J, Xie C, Xiao T, Luo BH, Springer TA. The relative influence of metal ion binding sites in the I-like domain and the interface with the hybrid domain on rolling and firm adhesion by integrin $\alpha_4\beta_7$. *J Biol Chem* 2004; 279(53): 55556-61.
- 53 Ni H, Li A, Simonsen N, Wilkins JA. Integrin activation by dithiothreitol or Mn^{2+} induces a ligand-occupied conformation and exposure of a novel NH_2 -terminal regulatory site on the β_1 integrin chain. *J Biol Chem* 1998; 273(14): 7981-7.
- 54 Springer TA, Jing H, Takagi J. A novel Ca^{2+} -binding β -hairpin loop better resembles integrin sequence motifs than the EF-hand. *Cell* 2000; 102(3): 275-7.
- 55 Chen JF, Salas A, Springer TA. Bistable regulation of integrin adhesiveness by a bipolar metal ion cluster. *Nat Struct Biol* 2003; 10(12): 995-1001.
- 56 Valdramidou D, Humphries MJ, Mould AP. Distinct roles of β_1 metal ion-dependent adhesion site (MIDAS), adjacent to MIDAS (ADMIDAS), and ligand-associated metal-binding site (LIMBS) cation-binding sites in ligand recognition by integrin $\alpha_2\beta_1$. *J Biol Chem* 2008; 283(47): 32704-14.
- 57 Raborn J, Wang W, Luo BH. Regulation of Integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ Ligand Binding and Signaling by the Metal Ion Binding Sites in the β I Domain. *Biochemistry* 2011; 50(12): 2084-91.
- 58 Chen J, Yang W, Kim M, Carman CV, Springer TA. Regulation of outside-in signaling and affinity by the β_2 I domain of integrin $\alpha_1\beta_2$. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(35): 13062-7.
- 59 Pan Y, Zhang K, Qi J, Yue J, Springer TA, Chen J. Cation- π interaction regulates ligand-binding affinity and signaling of integrin $\alpha_4\beta_7$. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(50): 21388-93.
- 60 Mould AP, Barton SJ, Askari JA, Craig SE, Humphries MJ. Role of ADMIDAS cation-binding site in ligand recognition by integrin $\alpha_5\beta_1$. *J Biol Chem* 2003; 278(51): 51622-9.

The Mechanism of Integrin Affinity Regulation

You-Dong Pan*, Kun Zhang, Jiao Yue, Jian-Feng Chen*

(Laboratory of Molecular Cell Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Integrins are a family of α/β heterodimeric cell adhesion molecules that mediate cell-cell, cell-matrix and cell-pathogen interactions. They transmit signals bidirectionally across the plasma membrane and play key roles in development, immune responses, leukocyte trafficking, hemostasis, and cancer. The ligand binding affinity and signaling of integrin are regulated dynamically and precisely by different stimuli, and are associated with the conformational rearrangement of the integrin molecule. Moreover, the receptor function of integrin is regulated by different divalent cations. This article mainly focuses on the relationship between integrin function and its conformation, and the regulation of integrin function by divalent cations.

Key words integrin; conformation; affinity; divalent cations; signal transduction

This work was supported by Grants from the National Basic Research Program of China (No.2010CB529703) and the National Natural Science Foundation of China (No.30970604, No.30700119)

*Corresponding author. Tel: 86-21-54921142, E-mail: ydpan@sibs.ac.cn; E-mail: jfchen@sibs.ac.cn