

Betablocker in Aktion: die Struktur des β_2 -Adrenozeptors im Kristall**

Felix Hausch*

Betablocker · Medizinische Chemie · Membranproteine · Proteinstrukturen · Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind Transmembranproteine und für die Weitergabe von extrazellulären Signalen in das Zellinnere verantwortlich. Sie stellen mit über 800 Mitgliedern die größte Familie an Signaltransduktionsproteinen (ca. 3 % des Humangenoms kodieren GPCRs)^[1] und sind von enormer pharmakologischer Bedeutung: Über 30 % der verschriebenen Arzneimittel wirken auf einen GPCR.^[2] Medizinisch relevante GPCRs waren für ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign bisher nur indirekt zugänglich. Es gab nur hochauflöste Strukturen für einen einzigen GPCR, das lichtempfindliche Rhodopsin,^[3] das mit seinem kovalent gebundenen Cofaktor Retinal eine Sonderstellung unter den GPCRs einnimmt. Was macht die Strukturbiologie von GPCRs so schwierig? Zu den für eukaryotische Transmembranproteine typischen Schwierigkeiten wie präparative Überexpression und Reinigung kommt im Falle der GPCRs ein Mangel an polaren Kontaktflächen sowie eine ausgeprägte Konformationsheterogenität hinzu.^[4]

Für den β_2 -Adrenozeptor, einen Wirkungsort von Betablockern und Asthmamedikamenten, konnten Cherezov et al.^[5] und Rosenbaum et al.^[6] sowie Rasmussen et al.^[7] und Day et al.^[8] nun erstmals hochauflöste Strukturen eines klassischen, ligandenaktivierten GPCR bestimmen. In beiden Fällen wurde die Struktur im Komplex mit Carazolol erhalten, einem partiell inversen Agonisten mit pikomolarer Affinität, der den inaktiven Grundzustand des β_2 -Adrenozeptors erzwingt. Entscheidend für den Erfolg war in beiden Fällen ferner die konformative Stabilisierung des flexiblen intrazellulären Bereiches des β_2 -Adrenozeptors. Diese Stabilisierung wurde im ersten Fall erreicht, indem die dritte intrazelluläre Schleife durch das kleine, gut strukturierte Protein T4-Lysozym substituiert wurde. Im zweiten Fall wurde ein Antikörper generiert, der an eine native, membrangebundene Konformation der dritten intrazellulären Schleife bindet.

In beiden Fällen wurde sichergestellt, dass diese Modifikationen die biochemischen Eigenschaften des β_2 -Adrenozeptors nicht beeinträchtigen. Zunächst wurde in Bindungs-Assays nachgewiesen, dass sowohl das T4-Lysozym-Fusionskonstrukt als auch der Antikörperfragment-Komplex Ligan den mit nahezu gleicher Affinität binden wie der unmodifizierte β_2 -Adrenozeptor. Anschließend wurden Fluoreszenzmessungen mit markierten β_2 -Adrenozeptor-Konstrukten durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Bindung von Agonisten zu ähnlichen Konformationsänderungen führt, wie sie im aktivierte Zustand des Wildtyp- β_2 -Adrenozeptors beobachtet werden. Dies ist ein deutliches Indiz, dass die erhaltenen Kristallstrukturen relevanten endogenen Konformationen des β_2 -Adrenozeptors entsprechen. Die Fusion mit T4-Lysozym und die Komplexierung mit einem Antikörperfragment hatten zudem den gewünschten Nebeneffekt, dass deutlich mehr polare Oberflächenkontakte möglich wurden. In der Tat werden in den Kristallstrukturen die intermolekularen Kontakte zum Großteil von T4-Lysozym bzw. vom Antikörperfragment ausgebildet.

Die Strukturen im Kristall konnten mit einer Auflösung von 2.4 Å für das Lysozym-Fusionskonstrukt und 3.4/3.7 Å für den Antikörperkomplex bestimmt werden. Beide Strukturen zeigen den charakteristischen heptahelicalen Aufbau eines GPCR und eine achte intrazelluläre Helix, die parallel zur Membran verläuft (Abbildung 1). Mehrere Helices weisen charakteristische Knicke auf, die durch konservierte Prolin-Reste induziert werden und die vermutlich für die Funktion von GPCRs wichtig sind. Der Ligand Carazolol bindet zwischen den Helices am Ende einer negativ geladenen Spalte, die zum extrazellulären Milieu führt. Dies entspricht in etwa der Position, die das kovalent gebundene Retinal im Falle von Rhodopsin einnimmt. Ein wesentlicher Unterschied zu Rhodopsin ist eine Helix in der zweiten extrazellulären Schleife, die durch eine zusätzliche Disulfidbrücke stabilisiert wird und den Zugang zur Ligandenbindungtasche offen zu halten scheint. Ein weiterer überraschender Unterschied zu Rhodopsin ist die Orientierung des so genannten E/DRY-Motivs am Ende von Helix III, das in GPCRs hoch konserviert ist.^[10] Die ionischen Wechselwirkungen dieser Reste mit Helix VI wurden für die Stabilisierung des inaktiven Zustandes von GPCRs verantwortlich gemacht.^[11] In beiden Strukturen wurden ähnliche Kontakte des DRY-Motivs und ein deutlich größerer Abstand zu Helix VI gefunden, unabhängig vom verwendeten Konstrukt. Dies

[*] Dr. F. Hausch
Max-Planck-Institut für Psychiatrie
Kraepelinstraße 2, 80804 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-30622-610
E-Mail: hausch@mpipsykl.mpg.de
Homepage: <http://www.mpipsykl.mpg.de/research/groups/hausch>

[**] Ich danke Prof. Florian Holsboer für die großzügige Unterstützung.

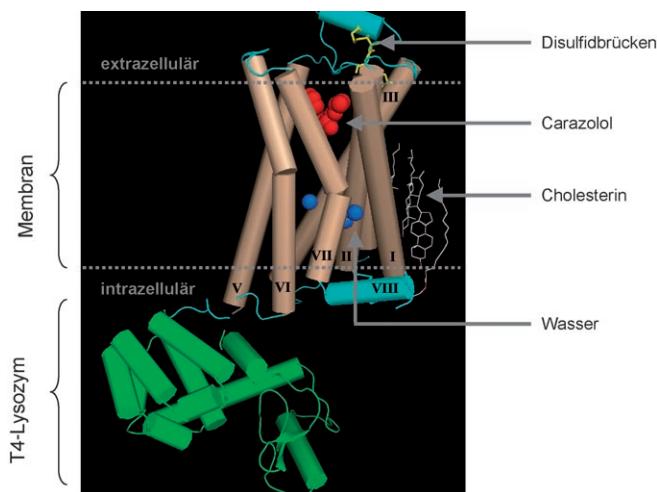


Abbildung 1. 2.4-Å-Struktur des β_2 -Adrenozeptors.^[5] Die Helices I–VIII sind mit römischen Ziffern gekennzeichnet, mit Helix IV im Hintergrund. Deutlich zu sehen sind zwei Prolin-induzierte Knicke in den Helices VI und VIII. Das DRY-Motiv in Helix III wird von Helix VI verdeckt. Das fusionierte T4-Lysozymprotein ersetzt die flexible dritte intrazelluläre Schleife zwischen Helix V und VI. Das zweite Protein des β_2 -Adrenozeptor-Dimers ist nicht gezeigt.^[9]

spricht gegen ein Artefakt, das von T4-Lysozym, vom Antikörperfragment oder von Kristallpackungseffekten induziert wurde. Ob die alternative Anordnung des DRY-Motivs ein spezielles Phänomen des Carazolol- β_2 -Adrenozeptor-Komplexes oder eine generelle Eigenschaft von Klasse-A-GPCRs ist, wird anhand von Strukturen mit anderen Liganden oder von anderen GPCRs zu klären sein.

Ein interessantes Merkmal der T4-Lysozymfusionsstruktur ist eine relativ dichte, parallele, paarweise Packung zweier β_2 -Adrenozeptormoleküle. Diese Anordnung ist in Einklang mit einer Dimerisierung zweier Rezeptormoleküle in der Plasmamembran von Zellen, ein Phänomen, das in den letzten Jahren intensiv für GPCRs diskutiert wurde.^[12] Die β_2 -Adrenozeptor-Dimerisierung wird im Kristall durch vier gut geordnete Cholesterin-Moleküle vermittelt; interessanterweise war Cholesterin essenziell für die Kristallisation und ist darüber hinaus wichtig für die Funktion des β_2 -Adrenozeptors *in vivo*.

In der 2.4-Å-Struktur konnten mehrere Wassermoleküle zwischen den Transmembranhelices lokalisiert werden, ein zunächst überraschender Befund, der schon in den bisherigen Rhodopsin-Strukturen beobachtet wurde. Diese Wassermoleküle bilden ein ausgedehntes Netzwerk an Wasserstoffbrücken, oft mit hoch konservierten Aminosäureresten an der Innenseite der Helices. Kürzlich schlugen Pardo et al. vor, dass diese Wassermoleküle ein konserviertes Merkmal der GPCRs sind, eine These, die durch die jetzige β_2 -Adrenozeptorstruktur eindrucksvoll bestätigt wird.^[13]

Die hoch aufgelöste Cokristallstruktur des β_2 -Adrenozeptors wird die medizinische Chemie von GPCRs nachhaltig verändern. Sie zeigt den detaillierten Bindungsmodus von Carazolol (Abbildung 2), einem Vertreter der Klasse der Betablocker. Betablocker hemmen β -adrenerge Rezeptoren und werden bei Herz-Kreislauf-Beschwerden eingesetzt.

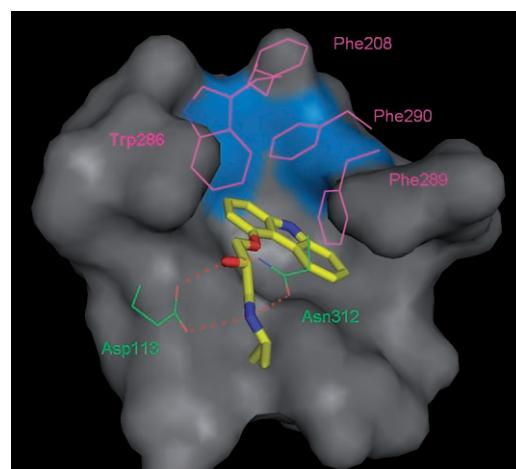


Abbildung 2. Bindungstasche des β_2 -Adrenozeptors.^[6] Der partiell inverse Agonist Carazolol ist in Gelb dargestellt, die vier Wasserstoffbrücken von Asp113 und Asn312 zum Liganden sind rot gestrichelt, das aromatische Netzwerk um Trp286 und Phe290 ist in Pink gezeigt. Die für das Lösungsmittel zugängliche Oberfläche der übrigen Bindungstasche ist grau, die Interaktionspartner (Ser204/Ser207) für potentielle Catechol-Agonisten sind blau angedeutet.

Durch die Kristallstruktur wird klar, wie die vicinale Aminoalkohol-Einheit, die von den endogenen Catecholamin-Liganden Adrenalin und Noradrenalin abgeleitet ist und in vielen adrenergen Medikamenten vorkommt, vom β_2 -Adrenozeptor erkannt wird. Der Aminoalkohol wird von Asparagin 312 und von Aspartat 113 über je zwei Wasserstoffbrücken fixiert. Von beiden Resten ist bekannt, dass eine Mutation zum totalen Verlust der Bindungsfähigkeit des Rezeptors führt.

Der Heterocyclus von Carazolol ist in eine hydrophobe Tasche eingebettet, die zum Teil von den Phenylalaninen 289 und 290 gebildet wird. Phe290 wird dabei zusätzlich von Phe208 und Trp286 fixiert. Trp286 ist ein hoch konservierter Rest, auch als „toggle switch“ bezeichnet, für den eine Rotamer-Umlagerung als zentraler Schritt in der Rezeptoraktivierung vorgeschlagen wurde.^[14] Cherezov et al. postulieren, dass inverse Antagonisten wie Carazolol das aromatische Netzwerk rund um Trp286 in einer inaktiven Konformation stabilisieren.

Eine Analyse der Bindungstasche ermöglichte es den Autoren auch, Hypothesen über den Bindungsmodus von Agonisten aufzustellen. So wurde ein Bindungsmodell des prototypischen Agonisten Isoproterenol unter der Annahme generiert, dass die Alkylaminoalkohol-Einheit wie bei Carazolol mit Asn312 und Asp113 wechselwirken würde. Aus Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und Mutagenesestudien war zudem bereits seit längerem bekannt, dass die Hydroxygruppen am aromatischen Ring von Catechol-Agonisten mit zwei Serinresten (Ser204 und Ser207) wechselwirken. In der Cokristallstruktur mit Carazolol sind diese Reste zu weit von einem hypothetischen Catechol-Agonisten entfernt. Rosenbaum et al. schlagen daher vor, dass bei der Bindung von Agonisten die Reste Asp113 (Helix III) und Asn312 (Helix VII) sowie die Reste Ser204 und Ser207 (Helix V) näher zusammenrücken, um sowohl die Wechselwirkungen der Al-

kylaminoalkohol-Einheit als auch die der Catechol-Einheit zu ermöglichen. Diese Konformationsänderung könnte Teil der ligandeninduzierten Signaltransduktion sein.

Wie Konformationsänderungen der Ligandenbindungstasche auf den intrazellulären Teil des Rezeptors übertragen werden, ist derzeit eine der wichtigsten Fragen der GPCR-Forschung. Auch hier geben die Kristallstrukturen einen ersten Anhaltspunkt, indem z. B. die genauen Positionen und die Interaktionsmuster von konstitutiv aktivierenden oder deaktivierenden Mutationsstellen lokalisiert wurden. Von diesen Resten nimmt man an, dass sie für die Stabilisierung des inaktiven bzw. des aktiven β_2 -Adrenozeptors wichtig sind. Den besten Einblick in den molekularen Mechanismus der GPCR-Aktivierung würde jedoch eine hoch aufgelöste Struktur liefern, die einem aktivierte Zustand des Rezeptors zugeordnet werden kann. Der entscheidende Schritt dahin scheint die Stabilisierung eines einheitlich aktivierte Zustandes eines GPCR aus einem Ensemble möglicher Konformationen zu sein. Eng damit verbunden ist die Frage, wie der aktivierte Rezeptor an den heterotrimeren G-Protein-Komplex bindet.^[15] Detaillierte Informationen zu dieser Frage wird nur die Struktur eines ternären Agonist-GPCR-G-Protein-Komplexes geben können.

Online veröffentlicht am 17. März 2008

-
- [1] R. Fredriksson, M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin, H. B. Schioth, *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 1256.
 - [2] a) J. Drews, *Science* **2000**, *287*, 1960; b) A. L. Hopkins, C. R. Groom, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 727; c) E. Jacoby, R.
-

Bouhelal, M. Gerspacher, K. Seuwen, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 760.

- [3] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. L. Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, *Science* **2000**, *289*, 739.
- [4] a) B. K. Kobilka, X. Deupi, *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28*, 397; b) P. S. Park, D. T. Lodowski, K. Palczewski, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2008**, *46*, 107.
- [5] V. Cherezov, D. M. Rosenbaum, M. A. Hanson, S. G. F. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H.-J. Choi, P. Kuhn, W. I. Weis, B. K. Kobilka, R. C. Stevens, *Science* **2007**, *318*, 1258.
- [6] D. M. Rosenbaum, V. Cherezov, M. A. Hanson, S. G. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H. J. Choi, X. J. Yao, W. I. Weis, R. C. Stevens, B. K. Kobilka, *Science* **2007**, *318*, 1266.
- [7] S. G. Rasmussen, H. J. Choi, D. M. Rosenbaum, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. C. Edwards, M. Burghammer, V. R. Ratnala, R. Sanishvili, R. F. Fischetti, G. F. Schertler, W. I. Weis, B. K. Kobilka, *Nature* **2007**, *450*, 383.
- [8] P. W. Day, S. G. Rasmussen, C. Parnot, J. J. Fung, A. Masood, T. S. Kobilka, X. J. Yao, H. J. Choi, W. I. Weis, D. K. Rohrer, B. K. Kobilka, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 927.
- [9] W. L. Delano, *The Pymol Molecular Graphics System* **2002**, www.pymol.org.
- [10] T. Mirzadegan, G. Benko, S. Filipek, K. Palczewski, *Biochemistry* **2003**, *42*, 2759.
- [11] G. E. Rovati, V. Capra, R. R. Neubig, *Mol. Pharmacol.* **2007**, *71*, 959.
- [12] a) T. Durroux, *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26*, 376; b) G. Miligan, *Drug Discovery Today* **2006**, *11*, 541.
- [13] L. Pardo, X. Deupi, N. Dolker, M. L. Lopez-Rodriguez, M. Campillo, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 19.
- [14] T. W. Schwartz, T. M. Frimurer, B. Holst, M. M. Rosenkilde, C. E. Elling, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2006**, *46*, 481.
- [15] W. M. Oldham, H. E. Hamm, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 60.