

Das goldene Zeitalter der Strukturbio-logie von GPCRs: Einflüsse auf die Wirkstoffentwicklung?*

Peter Kolb* und Gerhard Klebe*

Extrazelluläre Schleifen · G-Protein-gekoppelte Rezeptoren · Ligandenbindung · Signaltransduktion

GPCRs (an das Guaninnukleotid-bindende Protein gekoppelte Rezeptoren) sind einer der gebräuchlichsten Wege in der Natur, um Signale in Zellen hinein zu übertragen. Diese Rezeptoren befinden sich in der Zellmembran und vermitteln, nach der Bindung eines Transmittermoleküls, durch Konformationsänderungen die Kommunikation des Signals aus dem extrazellulären Raum in das Zellinnere. Nach erfolgter Aktivierung bindet der intrazelluläre Teil die heterotrimeren G-Proteine. Die aktivierten G-Proteine regulieren ihrerseits unter Verbrauch von Guanosintriphosphat (GTP) weitere Effektorproteine. Obwohl die G-Proteine namensgebend waren, hat sich in den letzten Jahren herausgestellt, dass die Aktivierung von weiterführenden Signalwegen auch durch β -Arrestin oder die direkte Wechselwirkung mit Kinasen vermittelt werden kann.^[1] Die Schlüsselrolle von GPCRs manifestiert sich auch in der Tatsache, dass ca. 30 % der derzeit vermarkteten Medikamente an einen dieser Rezeptoren binden.^[2] Trotz dieser Bedeutung waren Kristallstrukturen bisher jedoch sehr selten. Es wurde zwar beharrlich versucht, aber diese Bemühungen wurden dadurch erschwert, dass GPCRs eine membranähnliche Umgebung benötigen, um strukturell intakt zu bleiben. Darüber hinaus weisen alle GPCRs äußerst flexible intra- und extrazelluläre Schleifen auf und lassen sich nur in geringen Mengen exprimieren. Noch hinderlicher ist die Tatsache, dass viele GPCRs (mit der Ausnahme von Rhodopsin; dies war auch der erste Rezeptor, der kristallisiert wurde)^[3] auch ohne gebundenen Liganden eine Grundaktivität, und damit verbunden größere konformative Flexibilität, aufweisen. GPCR-Liganden werden aufgrund des Effektes, den sie auf diese Grundaktivität haben, klassifiziert: Bei einer Erhöhung werden sie Agonisten genannt (griechisch $\alpha\gamma\omega\nu\sigma\tau\acute{\eta}\varsigma$: Widersacher), eine Erniedrigung macht ein Molekül zu einem inversen Agonisten, und keine Änderung ist charakteristisch für einen Antagonisten. Es ist erwähnenswert, dass die Klassifizierung eines

Liganden je nach betrachtetem Signalweg unterschiedlich ausfallen kann.^[4]

Bei den seit 2007 aufgeklärten Kristallstrukturen wurden die zuvor erwähnten Probleme auf eine von drei Arten umgangen: 1) durch thermostabilisierende und die Expressionsausbeute erhöhende Mutationen, 2) durch Ersetzen der besonders flexiblen intrazellulären Schleife 3 durch T4-Lysozym und 3) durch Stabilisierung mit Anti- oder Nanokörpern (spezielle Antikörper aus der Familie der Kamele). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die bisher verfügbaren Strukturen und die entsprechenden Kristallisationstechniken.

Tabelle 1: Bisher gelöste GPCR-Strukturen.

Rezeptor	PDB ID
β_2 -adrenerge	2RH1, ^[a] 2R4R, ^[b] 2R4S, ^[b] 3D4S, ^[a] 3KJ6, ^[b] 3NY8, ^[a] 3NY9, ^[a] 3NYA, ^[a] 3SN6 ^[b]
β_1 -adrenerge	2VT4, ^[c] 2Y00, ^[c] 2Y01, ^[c] 2Y02, ^[c] 2Y03, ^[c] 2Y04 ^[c]
Adenosin A _{2A}	2YDO, ^[c] 2YDV, ^[c] 3EML, ^[a] 3QAK ^[a]
Dopamin D ₃	3PBL ^[a,c]
CXCR4	3ODU, ^[a,c] 3OE0, ^[a,c] 3OE6, ^[a,c] 3OE8, ^[a,c] 3OE9 ^[a,c]
Histamin H ₁	3RZE ^[a]
Rhodopsin	1F88, 1GZM, 1HZX, 1LN6, 1L9H, 1U19, 2I35, 2Z73
Opsin	2J4Y, ^[c] 2I36, 2I37, 3DQB, 3CAP

[a] Insertion von T4-Lysozym. [b] Anti- oder Nanokörper. [c] Thermostabilisierte Mutante.

Alle bisher gelösten Strukturen weisen dieselbe Architektur auf: Die Membran wird, beginnend mit dem N-Terminus auf der Außenseite, von sieben α -Helices durchquert, und die Helices sind untereinander durch je drei intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden (Abbildung 1). Damit bestätigt sich der gleichartige Aufbau, den man nach der Aufklärung der Rhodopsinstrukturen vermutet hatte. Weit- aus interessanter sind jedoch die Bindungstaschen. Trotz der Konservierung der Helices war die Lokalisierung der Bindungstaschen (sowohl im Sequenzraum als auch im dreidimensionalen Raum) nicht vollständig klar. Es war daher auch die größte Überraschung, dass sich die Orientierungen der Liganden stark unterscheiden (Abbildung 1), vor allem im Fall des Antagonisten IT1t und des cyclischen 15er-Peptids CVX15, die beide an CXCR4 binden.^[5] Dies erklärt auch, warum Homologiemodelle, die vor 2007 erstellt wurden, die Helices sehr gut reproduzieren, die Bindungstaschen und

[*] Dr. P. Kolb, Prof. Dr. G. Klebe
Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg
Marbacher Weg 6, 35032 Marburg (Deutschland)
E-Mail: peter.kolb@uni-marburg.de
klebe@staff.uni-marburg.de
Homepage: www.kolblab.org, www.agklebe.de

[**] P.K. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für das Emmy-Noether Stipendium KO 4095/1-1.

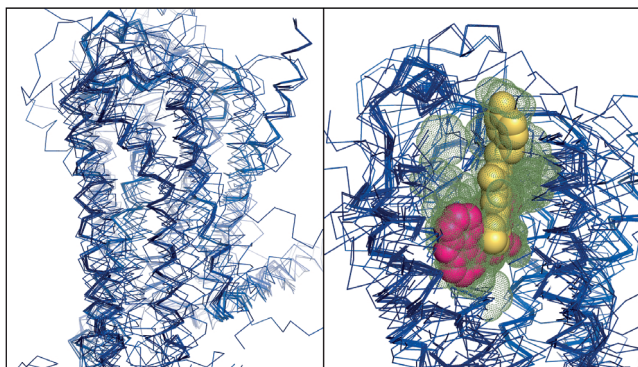


Abbildung 1. Links: Überlagerung von zwanzig GPCR-Strukturen (außer Rhodopsin) mit einem Liganden in der Bindungstasche. Die Strukturen sind als Strichmodell dargestellt, wobei sich die extrazelluläre Seite oben befindet. Zu beachten ist die nahezu perfekte Überlappung der Helices. Rechts: Detailansicht der überlagerten Bindungstaschen von mehreren Liganden, die als gemeinsame grüne Punktobersfläche dargestellt ist. Dies zeigt die unterschiedliche Ausnutzung des verfügbaren Volumens der Tasche. Zwei inverse Agonisten, Carazolol (2RH1, β_2 AR) und ZM241385 (3EML, A_{2A} R), sind als rote bzw. gelbe Kalotten dargestellt und dienen als Referenzpunkte. Einige Aminosäuren wurden zur besseren Übersicht weggelassen.

Ligandenpositionen jedoch manchmal daneben liegen, oft sogar in der Sequenz.

In Bezug auf die Konformationsänderungen während der Rezeptoraktivierung bestätigen die Kristallstrukturen die Vermutung, dass es nicht nur einen aktiven und einen inaktiven Zustand gibt, sondern auch mehrere Zustände dazwischen. Vor allem Rhodopsin wurde in mehreren Zwischenstufen der Aktivierung kristallisiert. Vor kurzem wurde die Struktur von β_2 AR im Komplex mit dem stimulatorischen G-Protein (Gs) und einem gebundenen Agonisten aufgeklärt.^[6] Diese Struktur steht vermutlich für den höchsten Grad an Aktivierung, was man an der größten jemals beobachteten Bewegung der Helix 6 sieht. Die Bewegung der Helices 5 und 6 voneinander weg wird als notwendig für die Aktivierung angesehen, da diese die Bindungsstelle des G-Proteins öffnet. Überraschenderweise setzt sich diese Bewegung aber nicht bis in die Ligandenbindungstasche fort – obwohl sich einige Seitenketten an den Liganden anpassen, bleibt das Rückgrat des Proteins, auch in der zuletzt veröffentlichten G-Protein-gebundenen Struktur, stabil. Beim β_2 AR sind die einzigen Unterschiede eine leichte Kontraktion der Bindungstasche und Änderungen der Torsionswinkel der Seitenketten dreier Serine in Helix 5.^[7] Am augenfälligsten ist das geringe Ausmaß der Änderung beim β_1 AR, bei dem sich die agonist- und invers-agonistgebundenen Zustände nur durch 1 Å unterscheiden. Der Vergleich dieser Strukturen mit der thermostabilisierten und an zwei verschiedene Agonisten gebundenen Struktur des A_{2A} R ist von Interesse.^[8] Während die globalen Änderungen in den Transmembranhelices ähnlich sind (Auseinanderbewegung der Helices 5 und 6; Auftreten einer Ausbuchtung in Helix 5), fallen die Unterschiede in der Bindungstasche bei letzteren größer aus, vor allem aufgrund der Rotation einer Valin-Seitenkette.^[8]

Eine weitere interessante Facette ist die Konformation der Schleifen, speziell der extrazellulären. Bioinformatische

Analysen hatten gezeigt, dass Länge und Sequenz für die extrazelluläre Schleife 1 sehr stark, für die extrazelluläre Schleife 2 (EL2) aber sehr wenig konserviert sind. Durch die neuen Strukturen kommen zu diesem Bild nun noch verschiedene Sekundärstrukturen und Wechselwirkungen hinzu. EL2 besteht in β_1 AR und β_2 AR aus einer kurzen α -Helix, wohingegen sie in den meisten anderen GPCRs β -Faltblätter oder Haarnadelmotive bildet. Auch das Ausmaß der Abdeckung der Bindungstasche variiert stark, von vollständiger Abdeckung in Rhodopsin bis hin zu relativ freier Zugänglichkeit in A_{2A} R und CXCR4, eine Tatsache, die kürzlich von Peeters et al. untersucht wurde.^[9]

Die derzeit veröffentlichten Strukturen ermöglichen auch eine verlässlichere Proteinstruktur-basierte Auffindung von Liganden. Computergestützte Leitstruktursuchen können die Kristallstrukturen direkt verwenden, und solche Suchen fanden bereits hohe Trefferquoten sowie, wahrscheinlich noch bedeutender, chemisch neuartige Verbindungen.^[10] Weiter können *In-silico*-Ansätze von relevanteren Homologiemodellen, basierend auf den Strukturdaten von enger verwandten Rezeptoren, profitieren.^[11] Dies wurde in den Jahren 2008 und 2010 durch Vorhersagewettbewerbe mit mehreren teilnehmenden Arbeitsgruppen evaluiert.^[12] Nicht ganz überraschend funktionierte die Modellierung am besten in den Fällen, in denen die Vorlage eine hohe Sequenzähnlichkeit aufwies. Das Erstellen eines guten Alignments ist immer noch die größte Herausforderung, denn bei einer Verschiebung um eine Aminosäure ändert sich die Ausrichtung einer Seitenkette (aufgrund der spiralförmigen Geometrie einer Helix) um ca. 120°. Da die Bindungsweisen der Liganden recht unterschiedlich sind, kann es sehr schwierig sein, diese vorherzusagen, selbst wenn das verwendete Homologiemodell gut der Kristallstruktur entspricht.

Unser Verständnis des Aufbaus und Aktivierungsmechanismus der GPCRs hat sich durch die neuen Strukturen erheblich verbessert. Interessanterweise unterscheiden sich trotz Ähnlichkeit des globalen Aufbaus alle bisher aufgeklärten Strukturen in einigen wichtigen Aspekten der Ligandenerkennung und Aktivierung. Die Konformationsunterschiede zwischen agonist- und invers-agonistgebundenen Strukturen sind jedoch kleiner als erwartet, was es wiederum schwierig macht, selbige mit strukturbasierten Methoden auszunutzen. Wir können daher jeder neu veröffentlichten Struktur und den darin enthaltenen Unterschieden mit Spannung entgegensehen.

Eingegangen am 19. August 2011

Online veröffentlicht am 3. November 2011

[1] S. K. Shenoy, R. J. Lefkowitz, *Sci. STKE* **2005**, 2005, cm10.

[2] J. P. Overington, B. Al-Lazikani, A. L. Hopkins, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, 5, 993–996.

[3] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Moto-shima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, *Science* **2000**, 289, 739–745.

[4] S. Galandrin, M. Bouvier, *Mol. Pharmacol.* **2006**, 70, 1575–1584.

[5] B. Wu, E. Y. Chien, C. D. Mol, G. Fenalti, W. Liu, V. Katritch, R. Abagyan, A. Brooun, P. Wells, F. C. Bi, D. J. Hamel, P. Kuhn,

- T. M. Handel, V. Cherezov, R. C. Stevens, *Science* **2010**, 330, 1066–1071.
- [6] S. G. Rasmussen, B. T. Devree, Y. Zou, A. C. Kruse, K. Y. Chung, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. S. Chae, E. Pardon, D. Calinski, J. M. Mathiesen, S. T. Shah, J. A. Lyons, M. Caffrey, S. H. Gellman, J. Steyaert, G. Skiniotis, W. I. Weis, R. K. Sunahara, B. K. Kobilka, *Nature* **2011**, DOI: 10.1038/nature10361.
- [7] D. M. Rosenbaum, C. Zhang, J. A. Lyons, R. Holl, D. Aragao, D. H. Arlow, S. G. Rasmussen, H. J. Choi, B. T. Devree, R. K. Sunahara, P. S. Chae, S. H. Gellman, R. O. Dror, D. E. Shaw, W. I. Weis, M. Caffrey, P. Gmeiner, B. K. Kobilka, *Nature* **2011**, 469, 236–240.
- [8] G. Lebon, T. Warne, P. C. Edwards, K. Bennett, C. J. Langmead, A. G. W. Leslie, C. G. Tate, *Nature* **2011**, 474, 521–525.
- [9] M. C. Peeters, G. J. P. van Westen, Q. Li, A. P. IJzerman, *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, 32, 35–42.
- [10] M. Sabio, K. Jones, S. Topiol, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 5391–5395; P. Kolb, D. M. Rosenbaum, J. J. Irwin, J. Fung, B. K. Kobilka, B. K. Shoichet, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 6843–6848; J. Carlsson, L. Yoo, Z. G. Gao, J. J. Irwin, B. K. Shoichet, K. A. Jacobson, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 3748–3755.
- [11] R. Kiss, B. Kiss, A. Konczol, F. Szalai, I. Jelinek, V. Laszlo, B. Noszal, A. Falus, G. M. Keseru, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 3145–3153.
- [12] M. Michino, E. Abola, GPCR Dock 2008 participants, C. L. Brooks III, J. S. Dixon, J. Moulton, R. C. Stevens, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, 8, 455–463; I. Kufareva, M. Rueda, V. Katritch, GPCR Dock 2010 participants, R. C. Stevens, R. Abagyan, *Structure* **2011**, 19, 1108–1126.