



# Vorhersage der Ligandenerkennung in einem Geruchsrezeptor durch Kombination von ortsgereichteter Mutagenese und dynamischer Homologie-Modellierung\*\*

Lian Gelis, Steffen Wolf, Hanns Hatt, Eva M. Neuhaus und Klaus Gerwert\*

Das Riechsystem von Säugetieren nutzt eine große Familie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), um eine Vielzahl flüchtiger Liganden zu erkennen und zu unterscheiden. Mehr als 350 menschliche Gene kodieren funktionale olfaktorische Rezeptoren (ORs),<sup>[1]</sup> die zur Familie der Klasse-A-GPCRs (Rhodopsin-ähnlichen GPCRs) gehören.<sup>[2]</sup> Aufgrund der schwierigen funktionalen Expression von Geruchsrezeptoren in heterologen Zellsystemen<sup>[3,4]</sup> sind bislang

nur wenige ORs charakterisiert worden. Die meisten ORs mit bekanntem Ligandenspektrum erkennen mehrere, strukturell ähnliche Duftstoffe.<sup>[5]</sup> Es wird vermutet, dass hypervariable Residuen in den sieben Transmembranhelices (7TM I-VII) die Basis für die Ligandenspezifität bilden.<sup>[6]</sup> Um die Selektivität von ORs verstehen zu können, müssen zunächst die räumlichen Eigenschaften der Liganden-Bindendenche analysiert werden. Hierzu wurden bisher verschiedene Ansätze genutzt:<sup>[7]</sup> Liganden-basierte Herangehensweisen, wie Pharmakophor-Modellierung oder quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehung (QSAR), können Modelle der nötigen Ligandenstruktur für die Unterscheidung zwischen aktivierenden und inaktiven Liganden liefern und ermöglichen dadurch Rückschlüsse auf die Form der Bindetasche.<sup>[8-11]</sup> Rezeptorbasierte Ansätze, wie Homologie-Modellierung, generieren ein detailliertes Modell des Proteins und der Bindetasche und geben auf diese Weise Informationen über die Ligandenbindung.<sup>[12-18]</sup> Beide Techniken können auch kombiniert werden.<sup>[19-22]</sup> Für solche Rezeptor-basierten und kombinierten Ansätze stehen bislang Röntgenstrukturen von sieben GPCRs zur Verfügung,<sup>[23-32]</sup> es konnte jedoch noch keine Röntgenstruktur eines OR gelöst werden. Frühere Studien erstellten basierend auf den Strukturen von Rhodopsin<sup>[12-21]</sup> und dem  $\beta_2$ -adrenogenen Rezeptor (B2AR)<sup>[33]</sup> statische Strukturmodelle von verschiedenen ORs. Da Duftstoffe aber oftmals hochflexible Verbindungen sind, ist zu vermuten, dass die Erschließung der Dynamik des Protein/Ligand-Komplexes essenziell für das Verständnis der Ligandenerkennung in Geruchsrezeptoren sein könnte. Deshalb untersuchten wir die der Rezeptoraktivierung zugrunde liegende dynamische Interaktion zwischen Ligand und Protein, anstatt die Ligandenbindung in statischen Modellen zu analysieren. Im Unterschied zu anderen Studien über flexible GPCR-Bindetaschen<sup>[34-37]</sup> nutzten wir die Vorhersagekraft von Moleküldynamik(MD)-Simulationen<sup>[38-40]</sup> zur Untersuchung des Protein/Liganden-Komplexes.

In dieser Studie entwickelten wir ein dynamisches Modell des funktional gut charakterisierten Riechrezeptors hOR2AG1.<sup>[41]</sup> Die Startstruktur für die dynamische Homologie-Modellierung von hOR2AG1 war die Röntgenstruktur von Rinderrhodopsin<sup>[24]</sup> mit einer Auflösung von 2.2 Å, da beide Rezeptoren den Klasse-A-GPCRs angehören und beide hydrophobe Liganden binden. Dieser Ansatz wurde bereits durch die auf einer Rhodopsinstruktur basierende Homologie-Modellierung der B2AR-Liganden-Bindendenche getestet (siehe Abschnitt 1a der Hintergrundinformationen).<sup>[40]</sup> Die negativen Auswirkungen der relativ geringen Sequenzübereinstimmungen innerhalb der Klasse-A-GPCRs

[\*] Prof. Dr. K. Gerwert<sup>[4]</sup>

Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr-Universität Bochum  
Universitätsstraße 150, 44780 Bochum (Deutschland)  
E-Mail: gerwert@bph.ruhr-uni-bochum.de  
Homepage: <http://www.bph.ruhr-uni-bochum.de/>

Dr. S. Wolf,<sup>[4]</sup> Prof. Dr. K. Gerwert<sup>[4]</sup>

Department of Biophysics, CAS-Max-Planck Partner Institute for Computational Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences  
320 Yue Yang Road, 200031 Shanghai (V.R. China)

Dr. L. Gelis,<sup>[4]</sup> Prof. Dr. H. Hatt

Lehrstuhl für Zellphysiologie  
Ruhr-Universität Bochum (Deutschland)

Prof. Dr. E. M. Neuhaus<sup>[4]</sup>

Neuroscience Research Center, Cluster of Excellence NeuroCure,  
Charité-Universitätsmedizin Berlin  
Charitéplatz 1, 10117 Berlin (Deutschland)

[+] L.G. und S.W. trugen in gleichem Maße zur Bearbeitung des Forschungsthemas, E.M.N. und K.G. in gleichem Maße zur Betreuung der Studie bei.

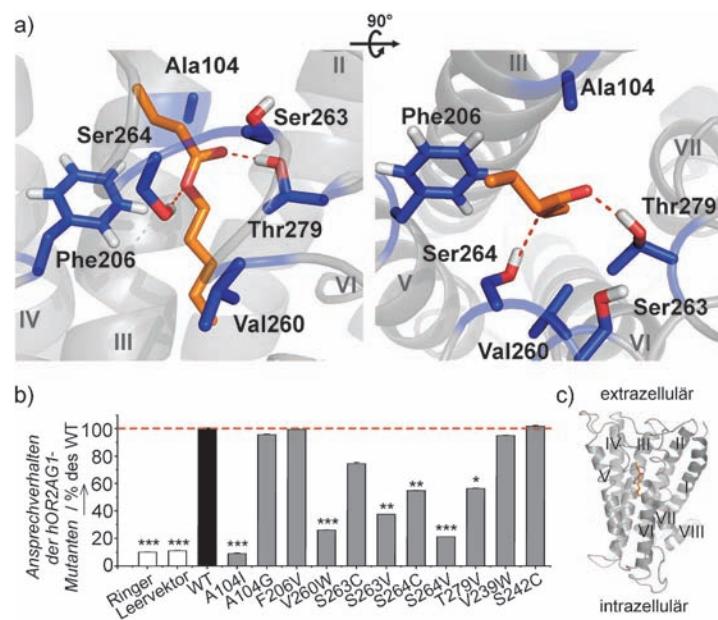
[\*\*] Wir danken H. Bartel und J. Gerkrath für technische Unterstützung, W. Zhang (Pharmaceutical Product Development, Inc., Beijing) für ihre Beteiligung bei Pilotexperimenten für diese Studie und J. Panten (Symrise, Holzminden) sowie T. Gerke (Henkel, Düsseldorf) für die Bereitstellung von Duftstoffen. Rechnungen wurden auf dem PICB HPC Cluster durchgeführt. Wir danken dem NIC Jülich (Projekt-Nr. hbo26) und dem RRZ Köln für die Bereitstellung von zusätzlicher Rechenkapazität und U. Höweler für Diskussionen. Molekulare Darstellungen wurden mit PyMol (DeLano Scientific) erstellt. Diese Studie wurde durch Forschungsgelder der DFG an E.M.N., H.H. und K.G. (SFB642), der Ruhr-University Research School und der Ruth und Gerd Massenberg Stiftung unterstützt. S.W. wird durch ein CAS Young International Scientist Stipendium finanziert. E.M.N. wird von Exc 257 NeuroCure finanziell unterstützt. K.G. erhält Förderung durch die Mercator Stiftung. L.G. führte experimentelle Untersuchungen durch, S.W. führte theoretische Untersuchungen durch. H.H., E.M.N. und K.G. leiteten die Forschung. Alle Autoren schrieben das Manuskript.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Details zu Zellkultur- und Transfektionstechniken, Western Blot, Einzelzell-Ca<sup>2+</sup>-Imaging, Mutagenese durch Overlap-Extension-PCR und Klonierung, Immunzytochemie, Computer-Modellierung von hOR2AG1 und MD-Simulationen) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201103980> zu finden.

können durch die Berücksichtigung von experimentellen Daten, die als Zusatzinformationen für die Homologie-Modellierung dienen, kompensiert werden.<sup>[34]</sup> Um das Homologie-Modell von hOR2AG1 experimentell zu validieren, wendeten wir in der vorliegenden Studie ortsgerichtete Mutagenese und Funktionsstudien durch Ca<sup>2+</sup>-Imaging an. Durch die Kombination theoretischer und experimenteller Techniken, in einem Wechselspiel zwischen dynamischen computergestützten Vorhersagen und der funktionalen Charakterisierung punktmutierter Rezeptoren, konnten wir die dreidimensionale Struktur der Liganden-Bindenische im hOR2AG1-Strukturmodell verfeinern und die Ligandenbindung in einem bisher unerreichten Umfang charakterisieren.

Zunächst suchten wir nach einer passenden Liganden-Bindekavität, die durch die experimentelle Analyse bestätigt wurde. Simulationen des initialen Rhodopsin-basierten hOR2AG1-Modells (für Details zur Modellierung und zur Wahl der zu Grunde liegenden Strukturen siehe Abschnitt 1a der Hintergrundinformationen) zeigten eine Kavität zwischen den Helices III, V, VI und VII als vielversprechende Liganden-Bindestelle (Kavität A in Abbildung S1; Details finden sich im Textabschnitt 2b der Hintergrundinformationen). Zur experimentellen Validierung wurden Wildtyp (WT) und mutierte hOR2AG1-Rezeptoren in Hana3a-Zellen exprimiert. Die rekombinanten Rezeptoren wurden anschließend durch Einzelzell-Ca<sup>2+</sup>-Imaging funktional untersucht (siehe Abbildung S2; Details sind dem Abschnitt 2a der Hintergrundinformationen zu entnehmen).

Simulationen des Liganden Amylbutyrat zeigten zwei mögliche Orientierungen in der mutmaßlichen Bindekavität: Der Ligand konnte horizontal oder vertikal zur Membranebene positioniert sein. Zur Überprüfung der Bindekavität und der korrekten Ligandenorientierung mutierten wir die Residuen Ala104<sup>3,32</sup>, Val260<sup>6,48</sup>, Ser263<sup>6,51</sup>, Ser264<sup>6,52</sup> und Thr279<sup>7,42</sup> (Abbildung 1a; hochgestellte Zahlen entsprechend der Ballersteros-Weinstein-Nummerierung<sup>[44]</sup>), die alle während der MD-Simulationen Kontakte zum Liganden im vertikalen Bindemodus bildeten (Details siehe Abschnitte 2b und 2c der Hintergrundinformationen). Die experimentelle Analyse der punktmutierten Rezeptoren hOR2AG1-A104I, -V260W, -S263V, -S264V, -S264C und -T279V durch Ca<sup>2+</sup>-Imaging zeigte verminderte Aktivierbarkeiten gegenüber dem Wildtyp-Rezeptor (Abbildung 1b und Tabelle 1). Durch den Vergleich der theoretischen Vorhersage mit den Befunden der experimentellen Untersuchung konnten wir die vorgeschlagene Kavität als tatsächliche Bindestelle für Amylbutyrat bestätigen und zeigen, dass Amylbutyrat in vertikaler Ori-



**Abbildung 1.** Charakterisierung der Amylbutyrat-Bindenische. a) Nahansicht der putativen Liganden-Bindenische für Amylbutyrat im vertikalen Bindemodus in hOR2AG1 nach 10 ns freier Moleküldynamiksimulation. Residuen, die im Kontakt zum Liganden stehen, sind in Blau hervorgehoben, TMAs in Grau. b) Auswirkung von Aminosäure-Mutationen in TM III, V, VI und VII auf die Aktivierbarkeit der Rezeptoren, gemessen durch Ca<sup>2+</sup>-Imaging-Experimente an heterolog in Hana3a exprimierten hOR2AG1-Varianten. Das Balkendiagramm zeigt die relative Rezeptoraktivierung durch Amylbutyrat (600 μM). Die mittlere Rezeptoraktivierung (Antwortwahrscheinlichkeit) wurde auf die Antwortwahrscheinlichkeit von WT-hOR2AG1 exprimierenden Zellen normiert (schwarzer Balken). Fehlerbalken bilden den Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) ab. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 15–40 unabhängige Experimente, jedes mit 600–1600 Zellen. Signifikanzen wurden mit Students t-Test im Bezug auf die Amylbutyrat-Antwortwahrscheinlichkeit von WT-hOR2AG1 ermittelt (\*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001). Die Applikation von Amylbutyrat rief keinen zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Anstieg in Leervektor-transfizierten Zellen hervor, der größer war als die Spontanaktivität bei Applikation von Ringer-Lösung (weiße Balken). c) Computermodell von hOR2AG1 (grau) mit Amylbutyrat (orangene Stäbe). Der Ligand wird zwischen den Helices III, V, VI und VII in einer Orientierung vertikal zur Membranebene gebunden.

**Tabelle 1:** Aus Simulationen ermittelte Wasserstoffbrückenkontakte von Amylbutyrat mit hOR2AG1-Mutanten. Die Frequenz der Wasserstoffbrückenkontakte ist als Prozentsatz von 10 ns Simulationszeit dargestellt.

hOR2AG1-Variante	Wasserstoffbrückenkontakte während der MD-Simulation			Aktivitätsbewertung <sup>[a]</sup>	In-vivo-Aktivität
	Ser263 <sup>6,51</sup>	Ser264 <sup>6,52</sup>	Thr279 <sup>7,42</sup>		
WT	12 %	6 %	92 %	aktiv	aktiv
A104G	10 %	8 %	87 %	aktiv	aktiv
A104I	66 %	6 %	43 %	–	–
F206V	3 %	40 %	61 %	aktiv	aktiv
V260W	11 %	–	94 %	–	–
S263C	2% <sup>[b]</sup>	2 %	98 %	aktiv	aktiv
S263V	– <sup>[b]</sup>	41 %	74 %	–	–
S264C	6 %	– <sup>[b]</sup>	91 %	–	–
S264V	4 %	– <sup>[b]</sup>	19 %	–	–
T279V	60 %	35 %	– <sup>[b]</sup>	–	–

[a] Temporäre Wasserstoffbrückenbindung (> 0%) zu Ser263<sup>6,51</sup>, Ser264<sup>6,52</sup> und stabile Wasserstoffbrückenbindung (> 49%) zu Thr279<sup>7,42</sup> wurden als Aktivitätskriterium definiert. [b] Die Mutation betrifft die jeweilige Aminosäure.

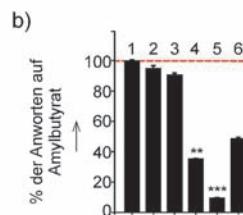
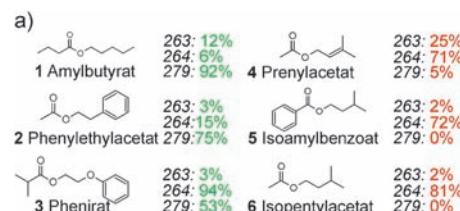
tierung gebunden wird (wie in Abbildung 1c dargestellt).

Eine Liste aller putativen Liganden-Kontaktresiduen ist in Abschnitt 3a der Hintergrundinformationen aufgeführt. Die Aminosäuren an den Positionen von Ala104<sup>3,32</sup>, Phe206<sup>5,47</sup>, Val260<sup>6,48</sup>, Ser263<sup>6,51</sup>, Ser264<sup>6,52</sup> und Thr279<sup>7,42</sup> sind innerhalb der Protein Familie der Geruchsrezeptoren hochvariabel und könnten daher die Ligandenspezifität bestimmen<sup>[6,45,46]</sup> (siehe Abbildung S3a, Details sind dem Abschnitt 3b der Hintergrundinformationen zu entnehmen).

Zusätzlich fügten wir vier Kontrollmutationen (A104G, F206V, V239W und S242C) in die hOR2AG1-Sequenz ein, die gemäß den Ergebnissen der MD-Simulationen keinen Einfluss auf die Ligandenbindung aufweisen sollten. In Übereinstimmung mit dem Modell bewirkte in der experimentellen Analyse keine der Kontrollmutationen ein verändertes Ansprechverhalten des Rezeptors im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 1b).

Als Nächstes untersuchten wir, ob wir mithilfe der computergestützten Analyse ein quantitatives Kriterium für die Rezeptoraktivierung definieren können. Ein dynamischer Bindemodus mit fluktuierenden Wasserstoffbrücken zwischen Rezeptor und Ligand könnte erklären, wie hochflexible Duftstoffliganden<sup>[47]</sup> von den jeweiligen Rezeptoren gebunden werden. Wir klassifizierten die Kontaktfrequenzen von Wasserstoffbrücken zwischen Amylbutyrat und Ser263<sup>6,51</sup>, Ser264<sup>6,52</sup> sowie Thr279<sup>7,42</sup> als stabil (wenn sie in 100–50 % der Simulationszeit bestanden), fluktuierend (in 49–25 %), und als temporär (in 24–1 %). Die Ergebnisse der Analyse der Mutanten A104G, A104I, F206V, V260W, S263C, S263V, S264C, S264V und T279V in 10 ns freier MD-Simulation in einer entsprechenden Membran/Solvans-Umgebung (Abbildung S4) wurden mit den Befunden der Aktivierbarkeit der mutierten Rezeptoren durch Amylbutyrat im Experiment verglichen. In den Simulationen aller mutierten Rezeptoren, die in der experimentellen Analyse funktional waren (Abbildung 1b), bildeten Ser263<sup>6,51</sup> und Ser264<sup>6,52</sup> mindestens temporäre Wasserstoffbrücken zum Liganden (in 2–66 % der simulierten Zeit; siehe Tabelle 1), während Thr279<sup>7,42</sup> stabile Wasserstoffbrücken zum Liganden bildete (in 61–98 % der simulierten Zeit; siehe Tabelle 1). Das Modell kann die verbliebene Aktivierbarkeit der S263C-Mutante erklären, da Cys263 immer noch Wasserstoffbrücken zu Amylbutyrat bilden kann. Wir vermuten, dass das Muster dynamischer Wasserstoffbrücken der Esterfunktion des Liganden zu diesen drei polaren Residuen, besonders zu Thr279<sup>7,42</sup>, die Aktivierung des Rezeptors maßgeblich bestimmt. Tatsächlich wurde ein ähnlicher Bindemodus für Esterfunktionen in der Kristallstruktur des Duftstoff bindenden Proteins LUSH aus *Drosophila melanogaster* (PDB-ID: 2GTE; 1.4 Å) gefunden (siehe Abbildung S5 und Abschnitt 4 der Hintergrundinformationen).<sup>[48]</sup>

Um die mutmaßliche Bindenische weiterführend zu validieren, untersuchten wir, ob die Quantifizierung von Wasserstoffbrücken zu Ser263<sup>6,51</sup>, Ser264<sup>6,52</sup> und Thr279<sup>7,42</sup> zur Vorhersage von Bindungs- und Aktivierungseigenschaften neuer Liganden genutzt werden kann. Aus diesem Grund analysierten wir fünf weitere Esterduftstoffe (Abbildung 2a), die strukturverwandt zu Amylbutyrat sind. Nach der Überlagerung der gewählten Liganden auf Amylbutyrat im verti-

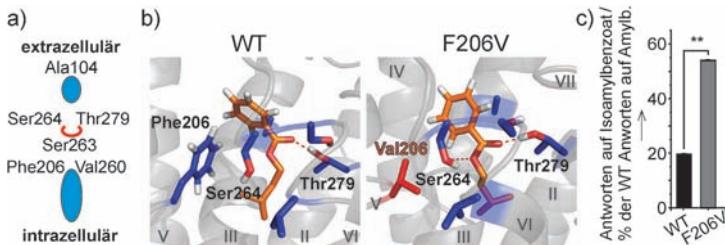


**Abbildung 2.** Ligandenspektrum von hOR2AG1. a) Duftstoffe mit ähnlicher Struktur wie Amylbutyrat wurden rechnerisch hinsichtlich der Erfüllung des Aktivitätskriteriums für hOR2AG1 untersucht. Die berechnete Aktivität wurde anhand der Wasserstoffbrückenkontakte zu Ser263<sup>6,51</sup>, Ser264<sup>6,52</sup> und Thr279<sup>7,42</sup> (kursiv) während der MD-Simulationen bewertet. Die Auftrittshäufigkeiten gebildeter Wasserstoffbrücken sind als Prozentsatz der Simulationsdauer dargestellt. b) Das Balkendiagramm zeigt die Aktivierung von hOR2AG1 durch die verschiedenen Duftstoffe, untersucht durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Messungen an hOR2AG1 exprimierenden Hana3a-Zellen. Die Antwortwahrscheinlichkeit stellt für jeden Duftstoff das Maß für die Rezeptoraktivierung dar. Gezeigt ist der Mittelwert, normiert bezüglich der zellulären Reaktionen auf Amylbutyrat. Unspezifische Zellaktivierung durch die jeweiligen Duftstoffe (gemessen an Leervektor-transfizierten Zellen) wurde abgezogen. Die Daten sind repräsentativ für 12–40 unabhängige Experimente, jedes mit 600–1600 Zellen. Die Fehlerbalken stellen den SEM dar. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  gemäß Students t-Test, alle Probengruppen wurden auf die Aktivierung durch Amylbutyrat bezogen.

kalen Bindemodus (Details sind Abschnitt 5a der Hintergrundinformationen zu entnehmen) wurde die Anbindung an den Gürtel aus hydrophilen Aminosäuren (Ser263<sup>6,51</sup>, Ser264<sup>6,52</sup> und Thr279<sup>7,42</sup>) in hOR2AG1 in 10 ns freien MD-Simulationen untersucht (Tabelle S1). Ein Vergleich der Simulationen des WT-Proteins mit dem vollständigen Liganden-Satz in einer Simulation von 10 und 100 ns (Tabelle S1) zeigte, dass in unserem Modell eine Simulationsdauer von 10 ns für die Quantifizierung von Kontakten zwischen Protein und Ligand ausreichend ist (Details hierzu sind im Abschnitt 5b der Hintergrundinformationen aufgeführt). Als Nächstes analysierten wir rechnerisch, ob die neuen Liganden während der Simulationen in mindestens einer der untersuchten Orientierungen temporäre Wasserstoffbrücken zu Ser263<sup>6,51</sup> und Ser264<sup>6,52</sup> sowie stabile Wasserstoffbrücken zu Thr279<sup>7,42</sup> bilden. Während Phenylethylacetat und Phenirat unser Aktivitätskriterium erfüllten, verfehlten es Prenylacetat, Isoamylbenzoat und Isopentylacetat (Abbildung 2a). Zur experimentellen Validierung der Vorhersagen analysierten wir vergleichend zu Amylbutyrat die relativen Aktivierungspotenzen der rechnerisch getesteten Duftstoffe in  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Messungen. In Übereinstimmung mit den Simulationen waren Phenylethylacetat und Phenirat im Experiment genauso aktivierend wie Amylbutyrat, während Prenylacetat und Isoamylbenzoat den Rezeptor signifikant weniger aktivierten. Isopentylacetat wies experimentell eine reduzierte

Aktivität im Vergleich zu Amylbutyrat auf, obwohl der t-Test für dieses Ergebnis keine Signifikanz aufzeigte (Abbildung 2b). Andere Substanzen, die experimentell hinsichtlich der hOR2AG1-Aktivierung untersucht wurden, sind in Abbildung S6 der Hintergrundinformationen aufgeführt. Es lässt sich zusammenfassen, dass wir mithilfe von MD-Simulationen die Aktivität von fünf neuen Duftstoffen qualitativ korrekt vorhersagen konnten. Frühere Rezeptor-basierte Studien zur Analyse von OR-Ligandenpaaren nutzten Docking-Methoden und konnten lediglich vorhersagen, ob ein Ligand sterisch in die Bindetasche passen könnte. In unserer Studie passten zwar alle sechs untersuchten Liganden in die Kavität, doch nur drei von sechs konnten den Rezeptor voll aktivieren. Dies konnte exakt durch die Methode der dynamischen Homologie-Modellierung vorhergesagt werden, da hier die dynamischen Interaktionen zwischen Ligand und Rezeptor berücksichtigt werden.

In Anbetracht der Analyse unserer Ergebnisse konnten wir in hOR2AG1 einen Liganden-Selektivitätsfilter für die Erkennung eines minimalen molekularen Profils, eines so genannten Odotops,<sup>[10]</sup> identifizieren. Die Bindenische enthält zwei hydrophobe Kavitäten, die durch einen Gürtel aus hydrophilen Residuen verbunden sind (Ser263<sup>6,51</sup>, Ser264<sup>6,52</sup>, Thr279<sup>7,42</sup>; Abbildung 1a und Abbildung 3a). Ala104<sup>3,32</sup> befindet sich in Van-der-Waals-Kontakt mit der zyttoplasmatischen Kavität, die groß genug ist, um eine Methyl- bis Propylgruppe aufnehmen zu können. Der hydrophile Gürtel selbst erkennt die Esterfunktion. Phe206<sup>5,47</sup> und Val260<sup>6,48</sup> bilden einen größenselektiven Filter nahe dem hydrophilen Gürtel. Somit werden nur unverzweigte Methylengruppen neben der Esterfunktion des Liganden toleriert. Größere Seitenketten, wie eine Phenylgruppe, erzeugen abstoßende Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit Phe206<sup>5,47</sup>, sodass keine Wasserstoffbrücken zum hydrophilen Gürtel mehr gebildet werden können. Die zytosolische Kavität kann große hydrophobe Residuen aufnehmen (Abbildung S7a), wie es z.B. bei Phenylethylacetat der Fall ist. Der Filter ermöglicht, dass der Rezeptor durch multiple Substanzen aktiviert



**Abbildung 3.** Reprogrammierung des hOR2AG1-Selektivitätsfilters. a) Schema des Selektivitätsfilters in hOR2AG1. Phe206<sup>5,47</sup> und Val260<sup>6,48</sup> bilden einen die Größe begrenzenden Filter nahe dem hydrophilen Gürtel aus Ser263<sup>6,51</sup>, Ser264<sup>6,52</sup>, und Thr279<sup>7,42</sup>. b) Gezielte Veränderung des vorgeschlagenen Selektivitätsfilters von hOR2AG1 in der Simulation. TMs sind in Hellgrau dargestellt, Liganden-Kontaktresiduen in Blau, Val206 in Rot. Anders als im Fall des WT-Proteins kann Isoamylbenzoat in der F206V-Mutante die für die Aktivierung notwendigen Wasserstoffbrücken zum hydrophilen Gürtel bilden. c) Antwortverhalten des rekombinanten hOR2AG1 auf Isoamylbenzoat im Vergleich zum WT-Rezeptor, analysiert durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging. Die Antwortwahrscheinlichkeiten bei Applikation von Isoamylbenzoat wurden auf die Antwortwahrscheinlichkeit von WT-hOR2AG1 auf Amylbutyrat (Amylb.) normiert. Die Fehlerbalken bilden den SEM ab, \*\*P < 0,01 gemäß Students t-Test.

werden kann, sofern diese das R-CH<sub>2</sub>-COO-CH<sub>2</sub>-R'-Odopon aufweisen. Die maximale Seitenkettenlänge scheint dabei beschränkt zu sein, weil Duftstoffe wie Alusat, Hexylacetat und Allylheptanoat das Odopon enthalten, ohne den Rezeptor aktivieren zu können (vgl. Abbildung S6). Phenirat bildet eine Ausnahme, da sich der Bindemodus von demjenigen von Amylbutyrat unterscheidet: In Phenirat bilden die Ester- und Etherfunktion parallel Wasserstoffbrücken zum hydrophilen Gürtel in hOR2AG1 (Abbildung S7b). Dieser Bindemodus vermag zu erklären, weshalb in diesem Liganden eine Isopropylgruppe neben der Esterfunktion toleriert wird.

Liganden-basierte Methoden eignen sich gut, um zwischen aktivierenden und inaktiven Liganden für andere olfaktorische Rezeptoren zu unterscheiden und ermöglichen sogar die Untersuchung der Struktur neuer Liganden.<sup>[8–10,22]</sup> In einer Gegenprobe, ob ein solcher Ansatz auch die Aktivierungspotenzen der sechs Duftstoffe aus dieser Studie korrekt vorhersagen kann, erstellten wir mithilfe des PharmaGist-Webservers<sup>[49]</sup> Pharmakophormodelle der Liganden. Mithilfe des generierten Pharmakophormodells konnten wir zwar alle sechs untersuchten Liganden als putativ bindend in hOR2AG1 identifizieren, allerdings konnten wir nicht zwischen aktivierenden und inaktiven Substanzen unterscheiden (für Details siehe Abschnitt 5c der Hintergrundinformationen; Abbildung S12 und Tabelle S3). Dafür war möglicherweise der analysierte Ligandenpool zu klein, oder hOR2AG1 kann sehr kleine molekulare Unterschiede im Ligandengerüst erkennen. Aus diesem Grund führten wir unsere Studie anhand unseres Rezeptor-basierten Modells des Selektivitätsfilters fort.

Ein sehr empfindlicher Test für den Selektivitätsfilter ist das Einbringen einer Mutation, welche die Selektivität des Filter in vorhersagbarer Weise umzuprogrammieren vermag.<sup>[19]</sup> Isoamylbenzoat passt zwar in die Bindenische von WT-hOR2AG1, kann aber wegen sterischer Hinderung durch Phe206<sup>5,47</sup> nicht an den hydrophilen Gürtel binden. Dieses theoretische Ergebnis könnte erklären, weshalb Isoamylbenzoat den Rezeptor in der experimentellen Analyse nicht aktiviert (Abbildung 2b). Durch das Ersetzen von Phe206<sup>5,47</sup> durch ein Valin konnte Isoamylbenzoat während der Simulationen der F206V-Mutante die für die Rezeptoraktivierung notwendigen Wasserstoffbrücken zu allen drei hydrophilen Residuen bilden (Tabelle S1, Abbildung 3b). In Übereinstimmung mit dieser Vorhersage konnte Isoamylbenzoat die F206V-Mutante auch im Experiment aktivieren, während das WT-Protein nicht aktiviert wurde (Abbildung 3c). Die Mutation hatte dabei keinen Einfluss auf die Menge an exprimiertem Protein (Abbildung S8c). Zusammenfassend konnten wir die Rezeptorfunktion auf der Grundlage der errechneten Informationen über die Bindenische durch das Einbringen einer Punktmutation beeinflussen.

Als Letztes versuchten wir unsere Ergebnisse auszuweiten, um Liganden für Rezeptoren mit bislang unbekanntem Ligandenspektrum vorherzusagen. Sollte der identifizierte Ligandenbindemodus eine generelle Rolle bei der Estererkennung in Proteinen spielen, dann sollten ORs mit derselben Konstellation von Aminosäuren an den entsprechenden Positionen auch durch Amylbutyrat

aktiviert werden können. Wir testeten diese Hypothese durch die Modellierung und funktionale Charakterisierung von hOR2AG2 und mOR283-2 und konnten auf diese Weise Amylbutyrat als Liganden für beide ORs identifizieren (Abbildung S9; Details sind dem Abschnitt 5d der Hintergrundinformationen zu entnehmen).

Durch die Kombination von dynamischer Homologie-Modellierung mit ortsgerichteter Mutagenese und funktionaler Analyse gelang es uns, ein molekulares Modell der Liganden-Bindenische von hOR2AG1 zu erstellen. Auf der Grundlage berechneter Wasserstoffbrücken zu Liganden-Kontaktresiduen konnten wir ein quantitatives Kriterium für die Rezeptoraktivierung durch verschiedene Liganden ableiten. Die Analyse des Ligandenselektivitätsfilters in hOR2AG1 ermöglichte es uns, Einblicke in die Detektion und Diskriminierung von flüchtigen, hydrophoben und hochflexiblen Liganden durch Riechrezeptoren zu erhalten. Auf diese Weise konnten wir die Aktivierungspotenzen neuer Duftstoffliganden vorhersagen. Das dynamische Modell ermöglichte zudem die korrekte Vorhersage von Änderungen der Rezeptorfunktion durch das Einbringen einer Mutation, sodass ein für das WT-Protein inaktiver Ligand den mutierten Rezeptor aktivieren konnte. Dynamische Homologie-Modellierung könnte zukünftig zur Deorphanisierung von ORs beitragen und damit zu einem besseren Verständnis einer bislang pharmakologisch unterschätzten Rezeptorfamilie führen, die hohes therapeutisches Potenzial aufweist.<sup>[42,43,50]</sup>

Eingegangen am 10. Juni 2011,  
veränderte Fassung am 10. Oktober 2011  
Online veröffentlicht am 5. Dezember 2011

**Stichwörter:** Duftstoffe · Funktionale Charakterisierung · Molecular Modeling · Moleküldynamik · Rezeptoren

- [1] S. Zozulya, F. Echeverri, T. Nguyen, *Genome Biol.* **2001**, 2, research0018.1–00118.12.
- [2] J. Bockaert, J. P. Pin, *EMBO J.* **1999**, 18, 1723–1729.
- [3] T. S. McClintock, T. M. Landers, A. A. Gimelbrant, L. Z. Fuller, B. A. Jackson, C. K. Jayawickreme, M. R. Lerner, *Mol. Brain Res.* **1997**, 48, 270–278.
- [4] K. Touhara, *Neurochem. Int.* **2007**, 51, 132–139.
- [5] B. Malnic, J. Hirono, T. Sato, L. Buck, *Cell* **1999**, 96, 713–723.
- [6] L. Buck, R. Axel, *Cell* **1991**, 65, 175–187.
- [7] G. Schneider, U. Fencher, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, 4, 649–663.
- [8] M. Schmuker, G. Schneider, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 20285–20289.
- [9] M. Schmuker, M. de Bruyne, M. Hähnel, G. Schneider, *Chem. Cent. J.* **2007**, 1, 11.
- [10] G. Sanz, T. Thomas-Danguin, H. el Hamandi, C. Le Poupon, J. C. Pernollet, E. Guichard, A. Tromelin, *Chem. Senses* **2008**, 33, 639–653.
- [11] A. S. Nichols, S. Chen, C. W. Luetje, *Chem. Senses* **2011**, 36, 781–790.
- [12] M. S. Singer, *Chem. Senses* **2000**, 25, 155–165.
- [13] W. B. Floriano, N. Vaidehi, W. A. Goddard, M. S. Singer, G. M. Shepherd, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 10712–10716.
- [14] N. Vaidehi, W. B. Floriano, R. Trabanino, S. E. Hall, P. Freddolino, E. J. Choi, G. Zamanakos, W. A. Goddard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 12622–12627.
- [15] W. B. Floriano, N. Vaidehi, W. A. Goddard, *Chem. Senses* **2004**, 29, 269–290.
- [16] S. E. Hall, W. B. Floriano, N. Vaidehi, W. A. Goddard, *Chem. Senses* **2004**, 29, 595–616.
- [17] T. Abaffy, A. Malhotra, C. W. Luetje, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 1216–1224.
- [18] K. Khafizov, C. Anselmi, A. Menini, P. Carloni, *J. Mol. Model.* **2007**, 13, 401–409.
- [19] S. Katada, T. Hirokawa, Y. Oka, M. Suwa, K. Touhara, *J. Neurosci.* **2005**, 25, 1806–1815.
- [20] L. Doszczak, P. Kraft, H. P. Weber, R. Bertermann, A. Triller, H. Hatt, R. Tacke, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 3431–3436; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 3367–3371.
- [21] K. Schmiedeberg, E. Shirokova, H. P. Weber, B. Schilling, W. Meyerhof, D. Krautwurst, *J. Struct. Biol.* **2007**, 159, 400–412.
- [22] N. Triballeau, E. Van Name, G. Laslier, D. Cai, G. Paillard, P. W. Sorensen, R. Hoffmann, H. O. Bertrand, J. Ngai, F. C. Acher, *Neuron* **2008**, 60, 767–774.
- [23] K. Palczewski et al., *Science* **2000**, 289, 739–745.
- [24] T. Okada, M. Sugihara, A. N. Bondar, M. Elstner, P. Entel, V. Buss, *J. Mol. Biol.* **2004**, 342, 571–583.
- [25] V. Cherezov et al., *Science* **2007**, 318, 1258–1265.
- [26] S. G. Rasmussen et al., *Nature* **2007**, 450, 383–387.
- [27] M. Murakami, T. Kouyama, *Nature* **2008**, 453, 363–367.
- [28] V. P. Jaakola, M. T. Griffith, M. A. Hanson, V. Cherezov, E. Y. Chien, J. R. Lane, A. P. Ijzerman, R. C. Stevens, *Science* **2008**, 322, 1211–1217.
- [29] J. H. Park, P. Scheerer, K. P. Hofmann, H. W. Choe, O. P. Ernst, *Nature* **2008**, 454, 183–187.
- [30] T. Warne, M. J. Serrano-Vega, J. G. Baker, R. Moukhametzianov, P. C. Edwards, R. Henderson, A. G. Leslie, C. G. Tate, G. F. Schertler, *Nature* **2008**, 454, 486–491.
- [31] B. Wu et al., *Science* **2010**, 330, 1066–1071.
- [32] E. Y. Chien et al., *Science* **2010**, 330, 1091–1095.
- [33] O. Baud, S. Eter, M. Spreafico, L. Bordoli, T. Schwede, H. Vogel, H. Pick, *Biochemistry* **2011**, 50, 843–853.
- [34] V. Katritch, M. Rueda, P. C. Lam, M. Yeager, R. Abagyan, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2010**, 78, 197–211.
- [35] C. N. Cavasotto et al., *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 581–588.
- [36] I. W. Davis, D. Baker, *J. Mol. Biol.* **2009**, 385, 381–392.
- [37] L. M. Simpson, I. D. Wall, F. E. Blaney, C. A. Reynolds, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2011**, 79, 1441–14457.
- [38] C. Hallmen, M. Wiese, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2006**, 20, 673–684.
- [39] W. Fu, J. Shen, X. Luo, W. Zhu, J. Cheng, K. Yu, J. M. Briggs, G. Jin, K. Chen, H. Jiang, *Biophys. J.* **2007**, 93, 1431–1441.
- [40] S. Wolf, M. Bockmann, U. Howeler, J. Schlitter, K. Gerwert, *FEBS Lett.* **2008**, 582, 3335–3342.
- [41] E. M. Neuhaus, A. Mashukova, W. Y. Zhang, J. Barbour, H. Hatt, *Chem. Senses* **2006**, 31, 445–452.
- [42] M. Spehr, G. Gisselmann, A. Poplawski, J. A. Riffell, C. H. Wetzel, R. K. Zimmer, H. Hatt, *Science* **2003**, 299, 2054–2058.
- [43] E. M. Neuhaus, W. Zhang, L. Gelis, Y. Deng, J. Noldus, H. Hatt, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 16218–16225.
- [44] J. A. Ballesteros, H. Weinstein, *Methods Neurosci.* **1995**, 25, 366–428.
- [45] O. Man, Y. Gilad, D. Lancet, *Protein Sci.* **2004**, 13, 240–254.
- [46] Y. Pilpel, D. Lancet, *Protein Sci.* **1999**, 8, 969–977.
- [47] Z. Peterlin, Y. Li, G. Sun, R. Shah, S. Firestein, K. Ryan, *Chem. Biol.* **2008**, 15, 1317–1327.
- [48] J. D. Laughlin, T. S. Ha, D. N. Jones, D. P. Smith, *Cell* **2008**, 133, 1255–1265.
- [49] D. Schneidman-Duhovny, O. Drod, Y. Inbar, R. Nussinov, H. J. Wolfson, *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36 (Web-Server Ausgabe), W223–228.
- [50] M. Spehr, H. Hatt, *Drug News Perspect.* **2004**, 17, 165–171.