

Die sieben Säulen der molekularen Pharmakologie: GPCR-Forschung mit Chemie-Nobelpreis geehrt

Felix Hausch* und Florian Holsboer

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren · Membranproteine ·
Signaltransduktion · Strukturbioologie

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind die Antennen der zellulären Kommunikation. Sie ermöglichen es menschlichen Zellen, äußere Reize wie z.B. Licht oder Geschmack wahrzunehmen oder sich untereinander mithilfe von Hormonen und Neurotransmittern zu „unterhalten“. Sie sind an den meisten physiologischen Prozessen im menschlichen Körper beteiligt, und sie sind das Angriffsziel von über 30 % der derzeit verschriebenen Medikamente. Vieles, was wir heute über diese Proteinklasse wissen, verdanken wir den bahnbrechenden Entdeckungen der diesjährigen Nobelpreisträger für Chemie, Robert J. Lefkowitz und Brian K. Kobilka.

Um die Verdienste dieser beiden GPCR-Pioniere angemessen würdigen zu können, müssen wir in das Jahr 1986 zurückgehen. Zu jener Zeit wurden Medikamente größtenteils durch Testung an lebenden Tieren oder in isolierten Organen entwickelt. Wie Hormone, Neurotransmitter oder Medikamente auf molekularer Ebene funktionieren, war in den meisten Fällen unbekannt. Einige der wichtigsten nachgelagerten intrazellulären Effektorsysteme, über die viele Hormone, Neurotransmitter und Medikamente ihre Effekte auszuüben schienen, waren aufgeklärt, wie z.B. sekundäre Botenstoffe oder G-Proteine (Abbildung 1). Aber die unmittelbaren Rezeptoren für Hormone, Neurotransmitter und Medikamente blieben im Dunkeln. Diese unbekannten Rezeptoren waren die entscheidenden Bausteine, die zwischen verschiedenen Liganden zu unterscheiden schienen und die offensichtlich die Gewebsspezifität und damit den biologischen Nutzen kleiner Moleküle vermittelten.

Ein typisches Beispiel für den Stand der Technik in den 1980er Jahren ist das adrenerge System, das schon damals der Forschungsschwerpunkt von Lefkowitz und Kobilka war. Vor deren Arbeiten war bekannt, dass Katecholamine wie Adrenalin und Noradrenalin eine Vielzahl physiologischer Effekte vermitteln, z.B. die Regulation des Blutdrucks. Das Katecholamin-System war zweifellos wichtig, und Antagonisten des β -Adrenozeptors (sogenannte β -Blocker wie z.B. Propranolol) waren dabei, zu einer der erfolgreichsten Medikamentenklasse der Arzneimittelgeschichte zu werden. Mechanistisch war klar, dass Katecholamine – wie viele Hor-

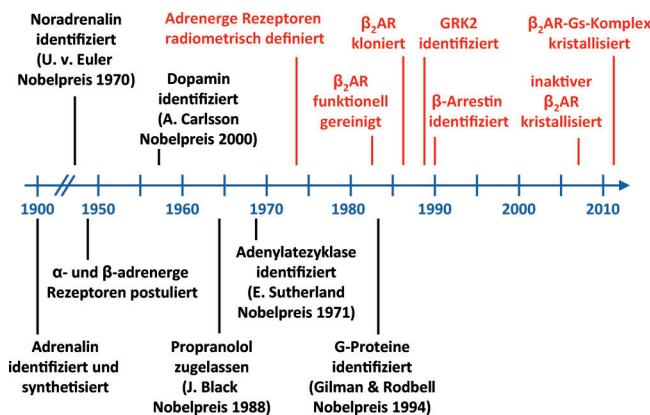


Abbildung 1. Zeithorizont der GPCR-Forschung. Arbeiten von Lefkowitz und Kobilka sind in Rot, Schlüsselbefunde zur monoaminergen Signaltransduktion in Schwarz gezeigt.

mone und Neurotransmitter – über G-Proteine die Produktion von sekundären Botenstoffen bewirken (Abbildung 1).

Die direkten Angriffspunkte von Katecholaminen oder β -Blockern jedoch, geschweige denn irgendwelche näheren Details bezüglich Anzahl, Zusammensetzung oder Struktur der Katecholamin-Rezeptoren, lagen völlig im Dunkeln. Die besten molekularen Befunde zu Katecholamin-Rezeptoren stammten zu dieser Zeit aus funktionellen Studien, und man ging von mindestens zwei Klassen aus, den α -adrenergen und β -adrenergen Rezeptoren.^[1]

Lefkowitz und Mitarbeiter untersuchten die adrenergen Rezeptoren biochemisch mithilfe von neu verfügbaren Radioliganden.^[2] Diese ermöglichten es ihnen, die biochemische Aufreinigung des mutmaßlichen β -Adrenozeptors aus einer Vielzahl von Geweben zu verfolgen. Dies führte zur Isolierung der ersten reinen und funktionsfähigen β -Adrenozeptor-Präparation.^[3] So konnten sie eindeutig zeigen, dass der Katecholamin-Rezeptor des β -Subtyps ein einzelnes Protein ist, das alle Elemente für die Signaltransduktion ins Zellinnere beinhaltet. Noch wichtiger war jedoch, dass aus dieser β -Adrenozeptor-Präparation ausreichende Mengen an Peptidfragmenten zur Sequenzierung gewonnen werden konnten. Zu dieser Zeit schloss sich Brian Kobilka dem Labor von Lefkowitz an. In Zusammenarbeit mit Forschern von Merck Sharp & Dohme leitete er Oligonukleotidsonden von den Peptidsequenzen des β -adrenergen Rezeptors ab, und mithilfe von damals neuen molekulärbiologischen Techniken

[*] Dr. F. Hausch, Prof. Dr. F. Holsboer
Max-Planck-Institut für Psychiatrie
Kraepelinstraße 2, 80804 München (Deutschland)
E-Mail: hausch@mpipsykl.mpg.de

gelang dem Team die Isolierung und Sequenzierung des Gens für den β_2 -Adrenozeptor (β_2 AR).^[4]

Die Eigenschaften, die durch die vollständige β_2 -Adrenozeptor-Sequenz aufgedeckt wurden, waren spektakulär. Das Protein, das durch das geklonte β_2 AR-Gen kodiert wurde, zeigte viele Merkmale, die bei früheren Untersuchungen des β -Adrenozeptors beobachtet worden waren. Vor allem prognostizierte die Sequenz sieben hydrophobe Regionen, was mit einem integralen Membranprotein übereinstimmte (Abbildung 2a). Völlig unerwartet jedoch war eine auffallende Sequenzhomologie mit einem anderen, kürzlich klonierten, aus sieben Transmembran-Helices bestehenden Protein, das ebenfalls an ein G-Protein gekoppelt war: Rhodopsin aus der Netzhaut des Auges.

Die Wahrnehmung von Photonen (die molekulare Basis für das Sehen) und die hormonelle Adaption nach Stress (die molekulare Grundlage der Fight-or-Flight-Antwort) wurden also durch denselben Rezeptortyp vermittelt. Wie viele dieser Rezeptoren würde es wohl geben? Im Zuge ihrer bahnbrechenden Entdeckung klonierten Kobilka und Lefkowitz die cDNAs weiterer GPCRs und zeigten, dass das adrenerge System aus drei α_1 -adrenergen, drei α_2 -adrenergen und drei β -adrenergen Rezeptoren besteht. Insgesamt verfügt der Mensch über mehr als 800 GPCRs (Abbildung 2b), sie stellen die wichtigste Proteinklasse für die Weiterleitung von extrazellulären Signalen ins Zellinnere dar.

Das Kenntnis genetischer Details der Wirkstoffziele veränderte in der Tat die Art und Weise, wie seitdem Medikamente entdeckt werden, so wie es Lefkowitz und Mitarbeiter im Ausblick ihres bahnbrechenden Artikels korrekt vorher sagten: „Das Modell, das wir für die Struktur von β AR und seine Interaktion mit pharmakologisch bedeutsamen Liganden vorschlagen, bildet, zusammen mit den nun möglich gewordenen biochemischen und genetischen Studien, eine rationale Grundlage für einen neuartigen Ansatz zur Entwicklung selektiverer Medikamente“.^[4] Tatsächlich konnten nun genetisch definierte oder modifizierte GPCRs in definierten zellulären Systemen überexprimiert und so GPCRs mit noch nie dagewesener Präzision untersucht werden. Bald darauf wurden die klassischen In-vivo-Wirkstofftests von rekombinier ten zellulären Systemen abgelöst, die es erlaubten, die Selektivität für Medikamente auf molekularer Ebene zu definieren. Auch war es nun möglich, Hochdurchsatz-Screenings für schwierige GPCRs durchzuführen, für die es keine geeigneten chemischen Leitstrukturen gab. Auf dem Weg von der klassischen zur molekularen Pharmakologie stellen die Arbeiten von Kobilka und Lefkowitz einen Riesenschritt nach vorne dar.

Da GPCRs viele lebenswichtige Prozesse kontrollieren, überrascht es nicht, dass ihre Aktivität streng geregelt ist. Der zweite wichtige Beitrag des Lefkowitz-Labors war die biochemische Aufklärung von Desensitisierungsmechanismen für die adrenergen Rezeptoren, die sich wiederum als Beispielhaft für die meisten Liganden-aktivierten GPCRs erwiesen. GPCRs werden für gewöhnlich nach einem anfänglich aktivierenden Stimulus durch einen Prozess deaktiviert, der homologe Desensitierung genannt wird. Lefkowitz und Mitarbeiter zeigten, dass dabei die adrenergen Rezeptoren phosphoryliert werden, und gegen Ende der 1980er Jahre

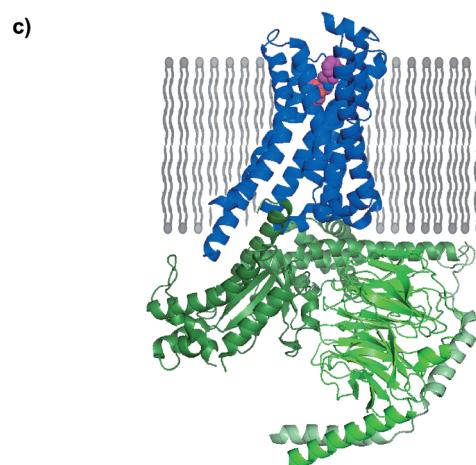
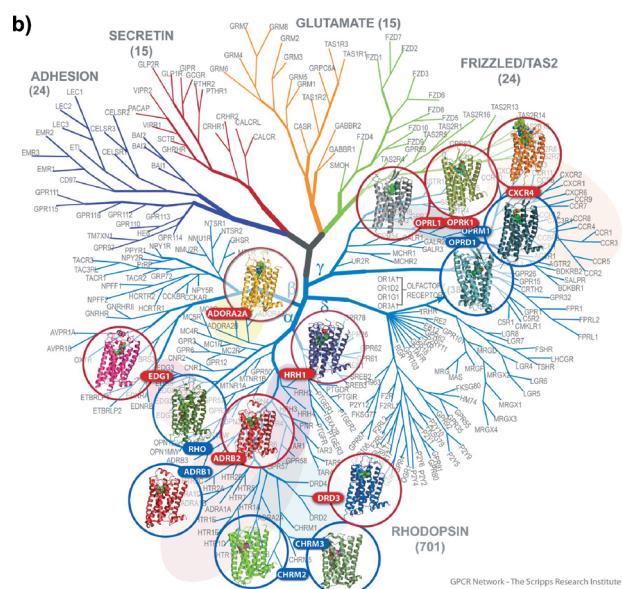
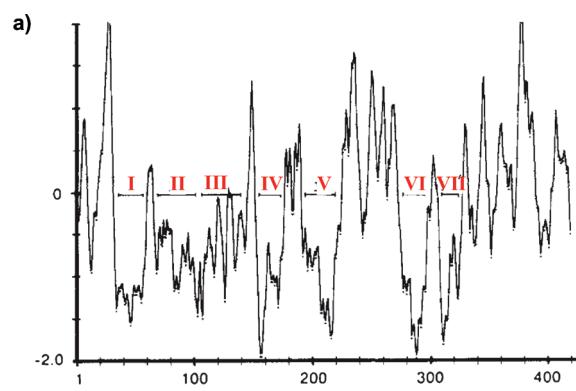


Abbildung 2. Nobelpreis-würdige Meilensteine in der GPCR-Forschung.

a) Erster Anhaltspunkt, dass Liganden-aktivierte GPCRs eine Sieben-Transmembran-Topologie haben.^[4] b) Phylogenetischer Stammbaum der GPCR-Familie. GPCRs, für die Kristallstrukturen gelöst wurden, sind mit einem Kreis hervorgehoben.^[5] c) Struktur des β_2 AR (blau) im Komplex mit dem hochaffinen Agonist BI-167107 (raumfüllend in pink gezeigt), $G_{\alpha s}$ (dunkelgrün), G_{β} (hellgrün) und G_{γ} (blassgrün).^[6] Zur besseren Übersicht wurden das fusionierte T4-Lysozym und der komplexierende Nanokörper entfernt sowie die Lipid-Doppelschicht hinzugefügt.^[7]

identifizierten und klonierten sie eine Kinase, die aktivierte adrenerge Rezeptoren phosphoryliert und heute G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinase 2 genannt wird.^[8] Die Phosphorylierung des Rezeptors reicht jedoch oft nicht aus, um die Signaltransduktion eines aktiven GPCR vollständig zu verhindern. 1990 identifizierten, klonierten und charakterisierten Lohse et al. das Protein β-Arrestin, das an aktivierte und phosphorylierte GPCRs bindet und deren Kopplung an G-Proteine blockiert.^[9] Zusätzlich leiten Arrestine die Endozytose und gegebenenfalls den späteren intrazellulären Abbau von GPCRs ein. Später erweiterte die Gruppe von Lefkowitz diese Auffassung, indem sie zeigte, dass GPCR-Arrestin-Komplexe zusätzliche Funktionen haben können, bei denen sie nichtkanonische Signaltransduktionswege stimulieren.^[10] Überraschenderweise erfolgt die Aktivierung von G-Proteinen oder die Rekrutierung von β-Arrestin nicht zwangsläufig gleich stark. Sogenannte funktionell selektive Agonisten aktivieren vorzugsweise einen bestimmten Signalweg gegenüber anderen und dies kann physiologisch relevant sein.^[11]

Die Entwicklung von Wirkstoffen ist deutlich leichter, wenn der molekulare Bindungsmodus bekannt ist (für ein aktuelles Beispiel siehe Lit. [12–15]). Leider weigerten sich Liganden-aktivierte GPCRs, die bedeutendste Klasse von Wirkstoffzielen, hartnäckig über mehr als zwei Jahrzehnte, die Geheimnisse ihrer dreidimensionalen Struktur und ihrer Ligandenbindung preiszugeben. Bis vor kurzem mussten Medizinalchemiker Wirkstoffkandidaten für GPCRs größtenteils „blind“ optimieren, wobei sie sich bestenfalls auf sehr grobe Homologiemodelle stützen konnten.

Die außerordentlichen Schwierigkeiten, GPCRs strukturell zu fassen, sind in ihrer hydrophoben Natur begründet (sieben membran durchspannende Helices), wodurch sie in wässriger Lösung instabil werden. Ein noch größeres Hindernis für die Strukturbioologie von GPCRs stellte deren Flexibilität und inhärente dynamische Natur dar. GPCRs wechseln zwischen zwei Hauptkonformationen (dem aktivierte und dem inaktivierten Zustand) und wahrscheinlich mehreren Nebenkonformationen. Brian Kobilka machte es sich zur Lebensaufgabe, diese Probleme für sein Modellsystem, den β₂-Adrenozeptor, in den Griff zu bekommen.

Dazu war es nötig, eine Reihe technischer Verbesserungen einzuführen, häufig in Zusammenarbeit mit den jeweiligen Experten dieser Methoden. Dazu gehörten bessere rekombinante Expressionssysteme für GPCRs, bessere Detergentien, extrem hochaffine Liganden, neue Röntgenstrahltechniken und Kristallisationsbedingungen, die speziell für Membranproteine entwickelt worden waren (cubic lipid phase crystallography). Vor allem jedoch gelang es dem Labor von Kobilka, die Flexibilität des β₂-Adrenozeptors zu reduzieren und gleichzeitig dessen Hydrophilie zu erhöhen. Dies erreichten sie entweder durch konformationspezifische Antikörper-ähnliche Bindungsproteine oder durch konstruierte β₂AR-Fusionsproteine, bei denen die flexibelsten Teile des β₂AR ersetzt worden waren.

20 Jahre nach der Klonierung des ersten Liganden-aktivierte GPCR lösten die Teams um Kobilka und Stephenson die erste hochauflösende Kristallstruktur für einen Liganden gebundenen GPCR^[16–18] (als Highlight besprochen in der

Angewandten Chemie^[19]). Dieser Meilenstein in der GPCR-Biochemie lieferte die erste detaillierte Momentaufnahme einer Ligandenbindungs tasche eines GPCR und stimuliert unmittelbar eine Reihe von strukturgetriebenen funktionellen Studien. Noch wichtiger war die Tatsache, dass die oben beschriebenen Techniken allgemein auf andere GPCRs übertragbar waren, was zu einer Revolution in der GPCR-Strukturbioologie führte. Heute sind hochauflösende Strukturen für 15 GPCRs bekannt (Abbildung 2b), wobei die jüngste bezeichnenderweise an jenem Tag online publiziert wurde, an dem der Nobelpreis für Lefkowitz und Kobilka bekanntgegeben wurde.^[20,21] Während sich vor fünf Jahren kaum jemand ernsthafte Hoffnungen auf die GPCR-Kristallstruktur seines Interesses machen konnte, ist die Kristallisation eines Liganden-aktivierte GPCRs heute ein überschaubares und für einige GPCRs sogar ein geradliniges Unterfangen. Die ersten Erfolge des strukturbasierten GPCR-Ligandendesigns zeichnen sich bereits ab, da die ersten Kandidaten in der klinischen Entwicklung sind.^[22] Auch zahlreiche enttäuschende Erfahrungen, die mit Liganden gemacht wurden, die an (neuro)peptiderge GPCRs binden, können wahrscheinlich in der Zukunft vermieden werden, wenn die Medikamentenentdeckung den von Lefkowitz und Kobilka herbeigeführten Paradigmenwechsel nutzt.^[23]

Kobilka selbst legte seinen weiteren Forschungsschwerpunkt auf das strukturelle Verständnis der GPCR-Signalübertragung. Gemeinsam mit zwei engen Mitarbeitern, Søren Rasmussen und Daniel Rosenbaum, und in Zusammenarbeit mit Roger Sunahara schaffte es dieses Team, die erste Kristallstruktur eines GPCR im Liganden-aktivierte Zustand zu erhalten (die GPCRs in früheren Strukturen hatten sich im Gegensatz dazu alle im inaktiven Zustand befunden).^[24,25]

Kurz darauf gelang dem Team um Kobilka die Kristallisation des β₂-Adrenozeptors im Komplex mit G-Proteinen (Abbildung 2c). Mit diesem Meilenstein der GPCR-Geschichte konnten sie zeigen, wie GPCRs die Signale, die sie durch Bindung von Liganden erhalten, an interzelluläre G-Proteine weiterleiten.

Bei einem Nobelpreis überrascht es nicht, dass die Preisträger ein Vorbild für wissenschaftliche Brillanz, aber auch für Beharrlichkeit und Durchhaltevermögen sind. Bemerkenswerterweise geht der Nobelpreis für Chemie in diesem Jahr an zwei Mediziner. Dies zeigt einmal mehr, dass interdisziplinäre Lebensläufe eine inspirierende Quelle für etwas grundsätzlich Neues sein können. Bei Lefkowitz und Kobilka wird ihr medizinischer Hintergrund dazu beigetragen haben, dass sie ihre gesamten Anstrengungen auf klinisch relevante Probleme konzentrierten, anstatt technisch einfacher Wege zu gehen. Dies unterscheidet sie von der Forschung über Rhodopsin, die an dieser Stelle nachdrücklich für ihre wesentlichen Beiträge zum Verständnis der GPCRs gewürdigt werden muss. Tatsächlich war (Rhod)Opsin dem Rest des GPCR-Feldes oft um Jahre voraus (erste Klonierung, erste Struktur usw.). Aber gerade die Gründe, die die „relativ“ leichte Untersuchung des Rhodopsins ermöglichen, verhindern den Transfer der verwendeten Methoden auf andere Liganden-aktivierte GPCRs, die die Mehrzahl der Wirkstoffziele darstellen.

Warum also werden die Arbeiten von Lefkowitz und Kobilka mit dem Nobelpreis für Chemie anstatt mit dem für Physiologie oder Medizin geehrt? Die Hauptarbeiten der beiden Nobelpreisträger offenbarten keine wesentlichen neuen physiologischen Aspekte der GPCRs. Die klinische Relevanz von GPCR war bereits zuvor allgemein anerkannt. Aber ihr therapeutisches Potential konnte nicht voll ausgeschöpft werden. Lefkowitz und Kobilka änderten dies mehr als alle anderen. Sie lieferten den Medizinalchemikern die biochemische Grundlage, um bessere Medikamente herzustellen. Wir gratulieren Lefkowitz und Kobilka zum Nobelpreis in Chemie 2012 und sehen gespannt den vielen Arzneimitteln entgegen, die nach unserer Überzeugung auch weiterhin auf Grundlage ihrer Entdeckungen entwickelt werden können.

Eingegangen am 24. Oktober 2012
Online veröffentlicht am 5. November 2012

- [1] R. P. Ahlquist, *Am. J. Physiol.* **1948**, 153, 586.
- [2] R. J. Lefkowitz, C. Mukherjee, M. Coverstone, M. G. Caron, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, 60, 703.
- [3] R. A. Cerione, B. Strulovici, J. L. Benovic, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron, *Nature* **1983**, 306, 562.
- [4] R. A. Dixon, B. K. Kobilka, D. J. Strader, J. L. Benovic, H. G. Dohlman, T. Frielle, M. A. Bolanowski, C. D. Bennett, E. Rands, R. E. Diehl, R. A. Mumford, E. E. Slater, I. S. Sigal, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, C. D. Strader, *Nature* **1986**, 321, 75.
- [5] <http://gpcr.scripps.edu/outreach.htm>.
- [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. Callinski, 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**, 477, 549.
- [7] <http://www.pymol.org>.
- [8] J. L. Benovic, A. DeBlasi, W. C. Stone, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Science* **1989**, 246, 235.
- [9] M. J. Lohse, J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Science* **1990**, 248, 1547.
- [10] L. M. Luttrell, S. S. Ferguson, Y. Daaka, W. E. Miller, S. Maudsley, G. J. Della Rocca, F. Lin, H. Kawakatsu, K. Owada, D. K. Luttrell, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Science* **1999**, 283, 655.
- [11] D. Gesty-Palmer, P. Flannery, L. Yuan, L. Corsino, R. Spurney, R. J. Lefkowitz, L. M. Luttrell, *Sci. Transl. Med.* **2009**, 1, 1ra1.
- [12] A. Bracher, C. Kozany, A. K. Thost, F. Hausch, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2011**, 67, 549.
- [13] R. Gopalakrishnan, C. Kozany, S. Gaali, C. Kress, B. Hoogeland, A. Bracher, F. Hausch, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4114.
- [14] R. Gopalakrishnan, C. Kozany, Y. Wang, S. Schneider, B. Hoogeland, A. Bracher, F. Hausch, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4123.
- [15] M. V. Schmidt, M. Paez-Pereda, F. Holsboer, F. Hausch, *Chem-MedChem* **2012**, 7, 1351.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] V. Cherezov, D. M. Rosenbaum, M. A. Hanson, S. G. 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.
- [19] F. Hausch, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 3360; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 3314.
- [20] J. F. White, N. Noinaj, Y. Shibata, J. Love, B. Kloss, F. Xu, J. Gvozdenovic-Jeremic, P. Shah, J. Shiloach, C. G. Tate, R. Grisshammer, *Nature* **2012**, 490, 508.
- [21] F. Hausch, F. Holsboer, *Nature* **2012**, 490, 492.
- [22] M. A. Hanson, C. B. Roth, E. Jo, M. T. Griffith, F. L. Scott, G. Reinhart, H. Desale, B. Clemons, S. M. Cahalan, S. C. Schuerer, M. G. Sanna, G. W. Han, P. Kuhn, H. Rosen, R. C. Stevens, *Science* **2012**, 335, 851.
- [23] G. Griebel, F. Holsboer, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2012**, 11, 462.
- [24] S. G. F. Rasmussen, H.-J. Choi, J. J. Fung, E. Pardon, P. Casarosa, P. S. Chae, B. T. DeVree, D. M. Rosenbaum, F. S. Thian, T. S. Kobilka, A. Schnapp, I. Konetzki, R. K. Sunahara, S. H. Gellman, A. Pautsch, J. Steyaert, W. I. Weis, B. K. Kobilka, *Nature* **2011**, 469, 175.
- [25] D. M. Rosenbaum, C. Zhang, J. A. Lyons, R. Holl, D. Aragao, D. H. Arlow, S. G. F. 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.