

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

Felix Hausch* und Florian Holsboer

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

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-

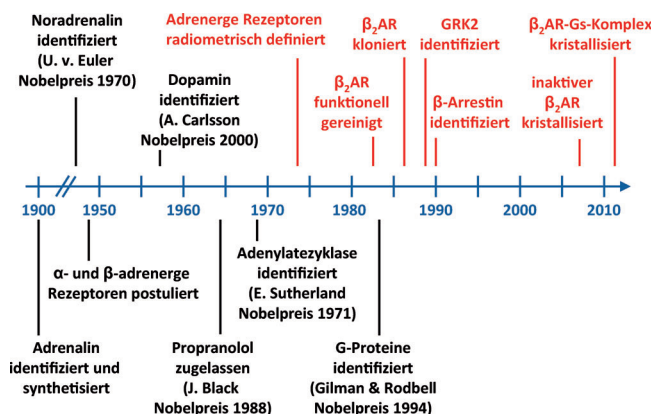


Abbildung 1. Zeithorizont der GPCR-Forschung. Arbeiten von Lefkowitz und Kobilka sind in Rot, Schlüsselbefunde zur monoaminergen Signaltransduktion in Schwarz gezeigt.

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 molekularbiologischen Techniken

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

identifizierten und klonierten sie eine Kinase, die aktivierte adrenerge Rezeptoren phosphoryliert und heute G-Proteingekoppelte Rezeptor-Kinase 2 genannt wird.^[8] Die Phosphorylierung des Rezeptors reicht jedoch oft nicht aus, um die Signaltransduktion eines aktivierten 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 membrandurchspannende Helices), wodurch sie in wässriger Lösung instabil werden. Ein noch größeres Hindernis für die Strukturbiochemie von GPCRs stellte deren Flexibilität und inhärent dynamische Natur dar. GPCRs wechseln zwischen zwei Hauptkonformationen (dem aktivierten und dem inaktivierten Zustand) und wahrscheinlich mehreren Nebenkongformationen. Brian Kobilka machte es sich zur Lebensaufgabe, diese Probleme für sein Modellsystem, den β_2 -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 Röntgenstrahl-Techniken 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 β_2 -Adrenozeptors zu reduzieren und gleichzeitig dessen Hydrophilie zu erhöhen. Dies erreichten sie entweder durch konformationsspezifische Antikörper-ähnliche Bindungsproteine oder durch konstruierte β_2 AR-Fusionsproteine, bei denen die flexibelsten Teile des β_2 AR ersetzt worden waren.

20 Jahre nach der Klonierung des ersten Liganden-aktivierten 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 Ligandenbindungstasche eines GPCR und stimulierte 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-Strukturbiochemie 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-aktivierten 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 Medikamentenentwicklung 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-aktivierten 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 β_2 -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 einfachere 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. 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**, 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, *ChemMedChem* **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. Grishammer, *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.