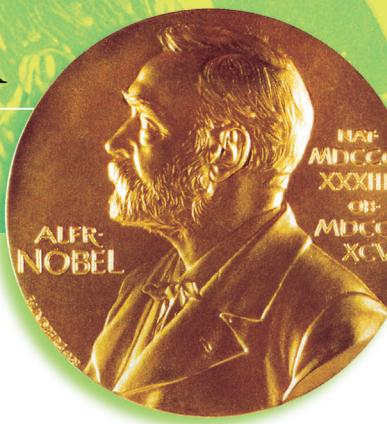
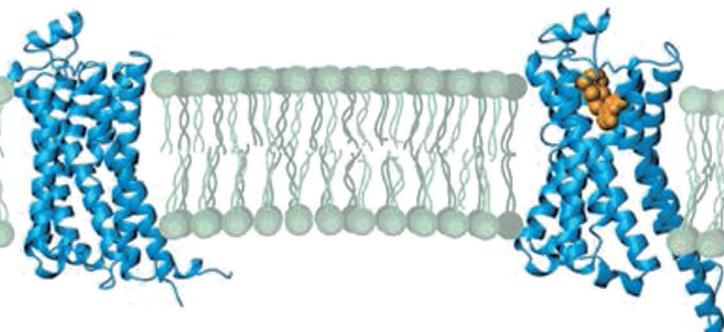


DER NOBELPREIS FÜR CHEMIE 2012



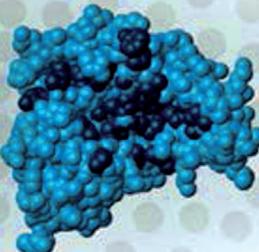
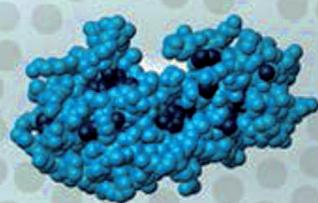
inaktiv

aktiv



90°

90°



Eine kurze Geschichte der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Nobel-Aufsatz)**

*Robert J. Lefkowitz**

β_2 -Adrenozeptor · G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ·
Nobel-Vortrag · Proteinstrukturen · Signaltransduktion

Das Konzept der Rezeptoren fasziniert Wissenschaftler seit mehr als einem Jahrhundert, und es hat Brian und mich während unserer gesamten Forscherlaufbahn begleitet. Heute wissen wir, dass die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), auch als heptahelicale Transmembrandomänenrezeptoren bezeichnet, die bei weitem größte, vielfältigste und ubiquitärste Gruppe unter den verschiedenen Familien von Plasmamembranrezeptoren sind. Sie umfassen fast tausend Gene, die beinahe alle bekannten physiologischen Prozesse im Menschen regulieren, darunter die sensorische Verarbeitung des Seh-, Tast- und Geruchseindrucks. Außerdem sind sie Zielstrukturen für mehr als die Hälfte aller weltweit verschriebenen Medikamente.^[1]

Studien der GPCRs spielen heute eine sehr zentrale Rolle in der biomedizinischen Forschung – ihre Existenz ist indes erst seit rund dreißig Jahren allgemein anerkannt. Davor wurde das Konzept zellulärer Rezeptoren äußerst kontrovers diskutiert und war von viel Skepsis begleitet. Die wohl fröhteste ausdrückliche Postulierung der Existenz dieser Rezeptoren geht auf den britischen Pharmakologen J. N. Langley zurück. Er schrieb 1905: „So können wir annehmen, dass man in allen Zellen mindestens zwei Bestandteile unterscheiden muss. Die Hauptsubstanz, die mit der zentralen Funktion der Zelle, also Kontraktion und Sekretion, befasst ist, und empfängliche Substanzen, auf die chemische Verbindungen und in manchen Fällen Nervenimpulse einwirken. Diese empfänglichen Substanzen beeinflussen den Stoffwechsel der Hauptsubstanz oder sind dazu zumindest in der Lage.“^[2]

Langley postulierte damit explizit die beiden miteinander verbundenen Funktionen dieser hypothetischen Rezeptorstrukturen: 1) Sie reagieren auf Chemikalien und Reize, vermutlich indem sie sie spezifisch binden, und 2) sie wirken auf Effektoren innerhalb der Zelle ein und verändern dadurch ihre Funktion.

Langleys Idee wurde jedoch allgemein ignoriert oder gar verhöhnt. Typisch dafür ist die folgende Einlassung, die etwa vierzig Jahre später geschrieben wurde, ironischerweise von seinem Studenten Henry Dale, der für seine Untersuchungen über die cholinerge Neurotransmission den Nobelpreis erhielt. 1943 äußerte er sich über die Rezeptoridee seines Mentors jedoch noch so: „Es ist die reine Feststellung einer Tatsache zu sagen, dass die Wirkung von Adrenalin bestimmte Effektorzellen betrifft und andere unbeeinflusst lässt; daraus lässt sich einfach ableiten, dass die beeinflusste Zelle irgendeine spezifische Affinität für Adrenalin haben muss; ich bezweifle

jedoch, dass die Zuordnung von ‘Adrenalinrezeptoren’ zu solchen Zellen mehr ist als eine reine Umformulierung dieser Ableitung.“^[3]

Noch ironischer ist das nächste Zitat von Raymond Ahlquist. Er war ein ausgewiesener klassischer Pharmakologe Mitte des 20. Jahrhunderts, der 1948 für seine Veröffentlichung, in der er zwei Rezeptortypen für Adrenalin vorschlug (von ihm als α und β bezeichnet), die er aufgrund der unterschiedlichen Wirkung verschiedener adrenerger Agentien bei der Stimulation physiologischer Prozesse unterschied, den Lasker-Preis erhielt.^[4] Dennoch schrieb er 25 Jahre später noch: „Dies trafe zu, wenn ich so vermessen wäre, anzunehmen, dass die α - und β -Rezeptoren tatsächlich existierten. Es gibt Leute, die dies tatsächlich glauben und sogar vorschlagen, ihre innerste Struktur beschreiben zu können. Für mich sind sie ein abstraktes Konzept, das entworfen wurde, um die beobachteten Reaktionen von Geweben zu erklären, die durch Chemikalien unterschiedlicher Struktur ausgelöst werden.“^[5]

So begannen diejenigen von uns, die diesen geheimnisvollen Rezeptoren Leben einhauchen wollten, ihre Arbeit vor etwa vierzig Jahren gegen viel Skepsis der Fachwelt. Es war uns sofort klar, dass wir, wenn wir erfolgreich sein wollten, ein ganzes Arsenal neuer Techniken entwickeln mussten, die seinerzeit noch nicht existierten. Die ersten mussten Verfahren zur Bindung von Radioliganden sein, um die Rezeptoren direkt zu untersuchen. Und so begann ich mit dem Studenten Rusty Williams und dem Postdoc Marc Caron, solche Methoden zu entwickeln, zunächst für den β -adrenergen Rezeptor,^[6] danach für den α -adrenergen Rezeptor.^[7] Die Radioligandenbindung, die wir in den frühen 70er Jahren entwickelten, ermöglichte uns sofort, die Regulation der Rezeptoren durch zahlreiche Faktoren zu untersuchen,^[8] vorher unerwartete Rezeptorsubtypen zu entdecken^[9] und Theorien über die Mechanismen der Rezeptorwirkung zu entwickeln.

So fanden wir heraus, dass die Bindungskurven für kompetitive Antagonisten wie den β -adrenergen Antagonisten Alprenolol steil und monophasisch sind, während solche für Agonisten wie Isoproterenol oder Epinephrin flach sind^[10]

[*] Prof. R. J. Lefkowitz
Howard Hughes Medical Institute, Duke University Medical Center
Durham, NC 27710 (USA)

[**] Copyright © The Nobel Foundation 2012. Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Abdruck einer deutschen Fassung dieses Aufsatzes.

und zwei verschiedene Bindungszustände beschreiben, einen mit hoher und einen mit niedriger Affinität (Abbildung 1A).^[11] Die beiden Zustände konnten durch Zugabe von Guaninnucleotiden ineinander überführt werden; es entstand eine einheitliche Population von Rezeptoren im

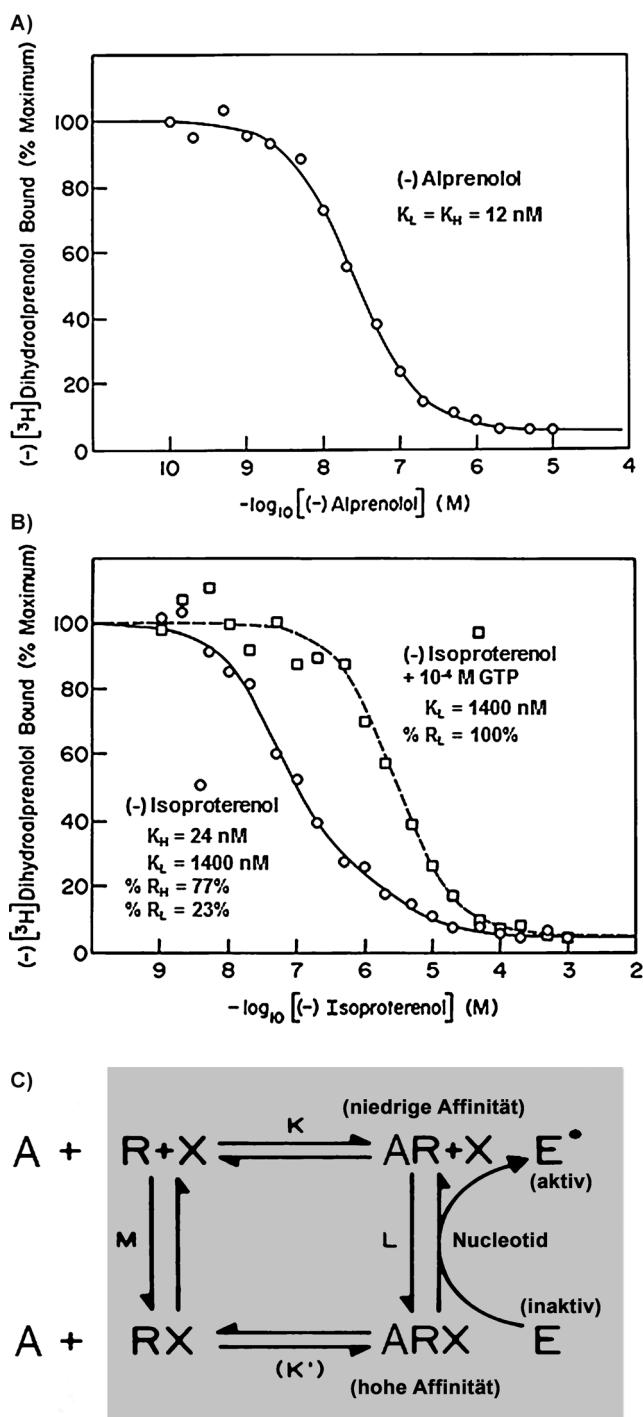


Abbildung 1. Bindung radioaktiv markierter Liganden an den β_2 -Adrenozeptor aus Froscherythrozyten-Membranen. A) Kurvengleich an die Bindungsdaten aus der Verdrängung von $[^3\text{H}]\text{-Dihydroalprenolol}$ durch den Antagonisten $(-)\text{-Alprenolol}$. B) Verdrängung durch den Agonisten $(-)\text{-Isoproterenol}$ mit (□) oder ohne (○) 10^{-4} M GTP . C) Das Modell des ternären Komplexes. Abdruck von (A) und (B) mit Genehmigung nach Lit. [11]; (C) nach Lit. [12].

niedrigaffinen Zustand (Abbildung 1B). Gemeinsam mit Andre DeLean entwickelten wir das Modell des ternären Komplexes, um dieses Verhalten zu erklären (Abbildung 1C).^[12] Darin postulierten wir, dass die niedrigaffine Form des Rezeptors (AR) ein Komplex aus dem Agonisten und dem freien Rezeptor ist, während die hochaffine Form ein ternärer Komplex aus Agonist, Rezeptor und einem anderen Membranbestandteil ist. Die modulierende Funktion von Nucleotiden auf die Affinität des Agonisten für den Rezeptor ließ sofort daran denken, dass die Komponente X in dem Schema das damals gerade entdeckte regulatorische Guaninnucleotidprotein (G-Protein) war. Die Fähigkeit eines Agonisten, die Wechselwirkung des Rezeptors mit dem G-Protein so zu verstärken, dass sich ein ternärer Komplex bildet, ist tatsächlich ein Maß für die Effizienz der Adenylylatcyclasestimulation. Sie kann einfach durch das Verhältnis der Affinitäten des Agonisten für die binäre niedrigaffine und die ternäre hochaffine Form des Rezeptors angenähert werden. Dieses Verhältnis kann leicht aus den Kompetitionskurven abgeleitet werden. Diese Befunde sind vermutlich die frühesten direkten Nachweise der allosterischen Wechselwirkung des Rezeptors mit Agonisten und den G-Proteinen. Dabei verstärkt die Bindung jeder Komponente an den Rezeptor allosterisch die Affinität der anderen. Dieser Ansatz zur Analyse der Ligandenbindung ist auf die große Familie der GPCRs allgemein anwendbar.

Zweifellos war eine der wichtigsten Anwendungen unserer Ligandenbindungs-technik, die potenziellen Rezeptormoleküle während der verschiedenen Reinigungsstufen zu markieren, sodass wir sie isolieren konnten. Die Reinigung der β -adrenergen und anderer adrenerger Rezeptoren war eine wirklich entmutigende Aufgabe: Die Moleküle sind „Verunreinigungen“ der Plasmamembran im Spurenbereich, die etwa 100 000-fach angereichert werden mussten. Außerdem mussten wir zunächst austüfteln, wie wir sie aus den Membranen solubilisieren konnten, bevor wir mit der eigentlichen Reinigung beginnen konnten. Letztendlich war der Schlüssel zum Erfolg unsere Entwicklung von Matrices für die Affinitätschromatographie, an die wir verschiedene β -adrenerge und später α -adrenerge Antagonisten koppeln konnten (Abbildung 2A).^[13–15] Mit der biospezifischen Adsorption und Elution von solchen Säulen mit adrenergen Liganden und anschließender eher konventioneller Chromatographie gelangten wir schließlich zu homogenen Präparationen von jedem der damals bekannten adrenergen Rezeptoren α_1 , α_2 , β_1 und β_2 (Übersichten in Lit. [16]). Auf dem SDS-Acrylamidgel sieht man die Präparationen von drei dieser vier adrenergen Rezeptoren (Abbildung 2B). Diese Abbildung summiert die Arbeit mehrerer Studenten und Postdocs über fast ein Jahrzehnt; vor allem zu nennen sind Marc Caron und Jeff Benovic. Jedes der isolierten potenziellen Rezeptormoleküle ist ein Glycoprotein von etwa 60 000–65 000 Dalton Molekulargewicht, das spezifische α - und β -adrenerge Liganden mit der Spezifität und Stereospezifität bindet, die man aufgrund der klassischen pharmakologischen Experimente erwarten konnte.^[16]

Die Skepsis blieb jedoch, ob diese isolierten Moleküle auch die mit einem Rezeptor verbundene Funktion ausüben könnten, nämlich spezifische biologische Prozesse zu akti-

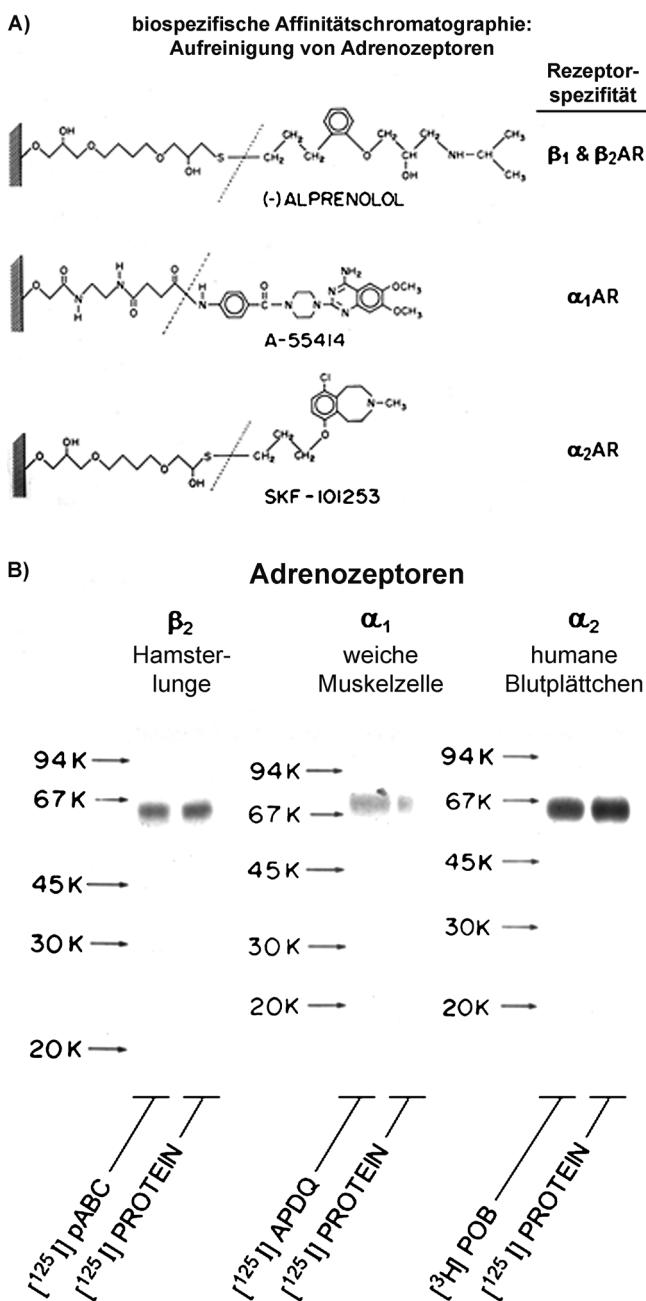


Abbildung 2. Isolierung des Adrenozeptors durch Affinitätschromatographie.

vieren. Dass dies tatsächlich der Fall war, wurde von Rick Cerione gezeigt. Zunächst rekonstituierte er unseren gereinigten β -Rezeptor in Phospholipidvesikeln und fusionierte diese mit Erythrocyten des afrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis*.^[17] Diese Zellen besitzen zwar das Adenylatcyclase-Enzymsystem und andere GPCRs wie den Prostaglandinrezeptor, aber keine β -Rezeptoren. β -Adrenerge Agonisten können daher die Adenylatcyclase nicht aktivieren. Waren die Zellen aber einmal mit den rezeptorhaltigen Vesikeln fusioniert, die damit die Rezeptoren in die Zellmembran einbrachten, reagierte die Adenylatcyclase auf β -adrenerge Wirkstoffe. Innerhalb eines Jahres konnten wir in

Zusammenarbeit mit Lutz Birnbaumer und Eva Neer eine Catecholamin-sensitive Adenylatcyclase aus drei Proteinen vollständig rekonstituieren, nämlich dem gereinigten β -adrenergen Rezeptor, dem regulatorischen Guaninnucleotidprotein (G_s) und der katalytischen Einheit der Adenylatcyclase.^[18] Mit diesen Ergebnissen war endgültig bewiesen, dass die isolierten Proteine tatsächlich β -adrenerge Rezeptoren waren, die beide Funktionen eines echten Rezeptors ausfüllen konnten.

Mit den gereinigten, getesteten Rezeptorproteinen in Händen konnten wir kurze Aminosäure-Teilsequenzen aus Bromcyan-Fragmenten des β_2 -adrenergen Rezeptors bestimmen und damit Oligonucleotidsonden entwerfen, um die cDNA und das Gen des β_2 -adrenergen Rezeptors zu klonieren.^[19] Dieser erfolgreiche Versuch wurde gemeinsam von einer Gruppe von Merck und aus meinem Labor durchgeführt und war das erste erfolgreiche Forschungsprojekt eines jungen Kardiologen, der schon seit einigen Jahren in meinem Labor arbeitete. Sein Name war Brian Kobilka. In dieser ersten klonierten Sequenz eines ligandenbindenden GPCR konnten wir alle die Eigenschaften beobachten, die inzwischen als kanonisch für die Proteinfamilie angesehen werden (Abbildung 3): sieben membranüberspannende hydrophobe Domänen, Positionen für eine regulatorische Phosphorylierung in den zytoplasmatischen Domänen und Konsensussequenzen für die Glycosylierung am Aminoterminus. Eine Überraschung damals war, dass wir Sequenzhomologien (blau dargestellt, Abbildung 3) mit Rhodopsin, dem Sensor für sichtbares Licht, fanden. Heute nach 25 Jahren erscheint es schwer verständlich, dass diese Homologie damals eine Überraschung war. Grund dafür war, dass Rhodopsin, dessen Sequenz einige Jahre zuvor mit konventioneller Proteinsequenzierung aufgeklärt worden war,^[20,21] und Bacteriorhodopsin,^[22] eine lichtempfindliche Protonenpumpe aus Archaeabakterien, die einzigen bekannten Proteine mit sieben Transmembrandomänen waren. Weil beide lichtempfindliche Proteine sind, hatte man vermutet, dass die sieben Membran Durchgänge eine charakteristische Eigenschaft lichtempfindlicher Moleküle seien.^[20,21] Mit der Klonierung des β_2 -adrenergen Rezeptors wurde langsam klar, dass dieses Merkmal stattdessen charakteristisch für GPCRs ist. Innerhalb eines Jahres hatten wir den stark homologen α_2 -adrenergen Rezeptor kloniert^[23] und innerhalb einiger Jahre insgesamt acht adrenerge Rezeptoren,^[24] von denen drei auf einer Proteinsequenzierung isolierter Moleküle^[19,23,25] und einem Serotonin-Rezeptor^[26] basierten. Alle zeigten die konservierte 7TM-Organisation.

So waren wir im Jahr 1987 ziemlich sicher, dass alle damals bekannten GPCRs wahrscheinlich zur Superfamilie der 7TM-Rezeptoren gehören würden.^[27] Während der nächsten Jahre wuchs die Familie schnell, weil viele Labors GPCRs klonierten und dabei fast alle auf Homologietechniken setzten, z.B. Screening mit niedriger Waschstringenz mit anschließender Polymerasekettenreaktion (PCR). Danach wurde fast kein anderes GPCR-Protein je vor seiner Klonierung gereinigt. Daher waren wir immer stolz auf die mehr als ein Jahrzehnt dauernde schwierige Arbeit, die wir auf die Reinigung der vier adrenergen Rezeptoren aufgewendet hatten und die uns die ersten Sequenzen geliefert hatte, den

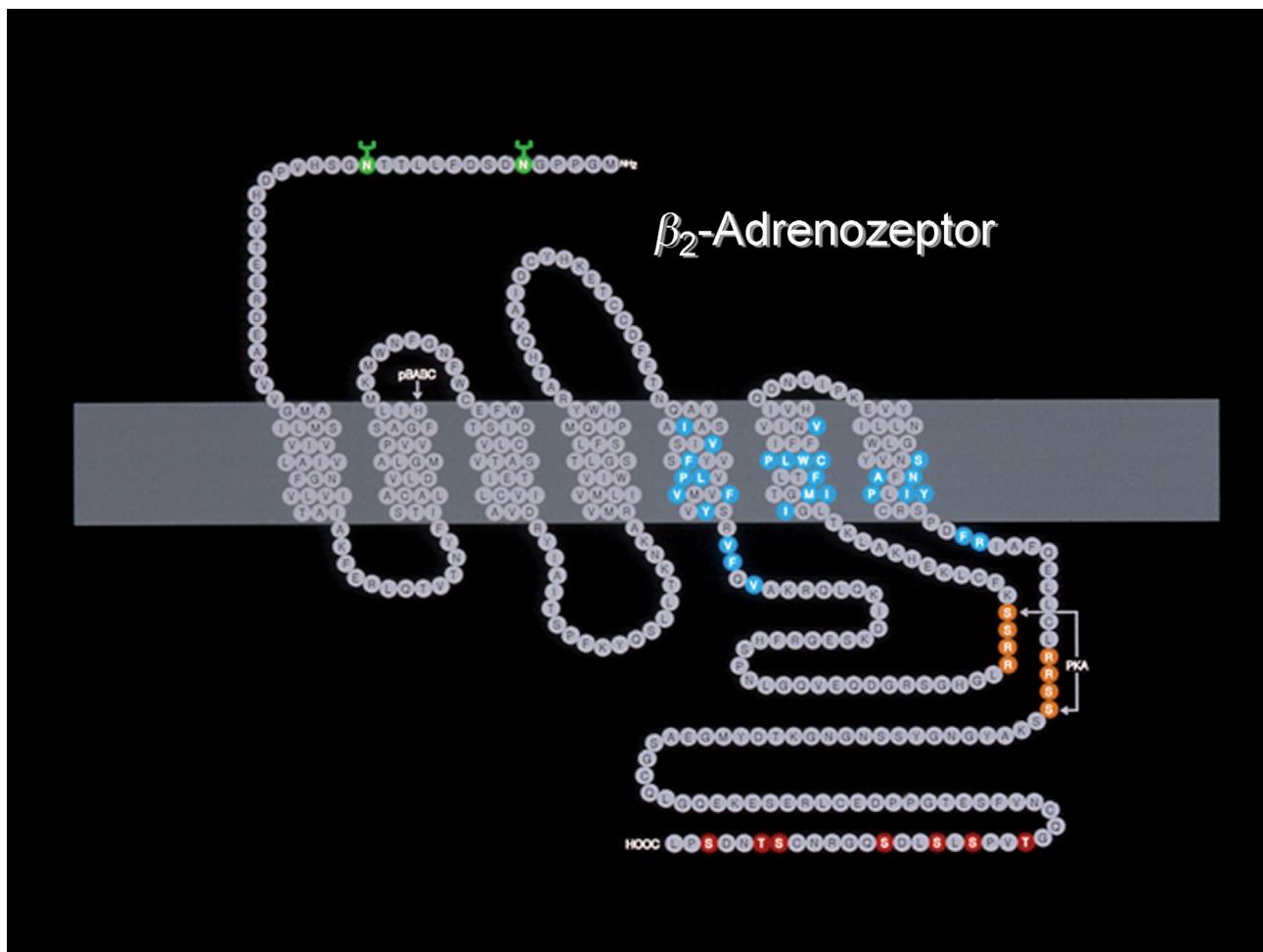


Abbildung 3. Klonierung des β_2 -Adrenozeptors. Blau: mit Rhodopsin homologe Reste; orange: Konsensussequenzen mit PKA-Phosphorylierungsstellen; rot: Reste für GRK-Phosphorylierung; grün: Konsensuspositionen für N-Glycosylierungen. Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [65].

Grundstein sozusagen, auf dem die viel größere Superfamilie dann ruhte.

Danach benutzten wir verschiedene Methoden, um zu verstehen, wie die einzigartige und hochkonservierte 7TM-Rezeptorstruktur die zwei Kernfunktionen der Ligandenbindung und der G-Protein-Aktivierung ausführt. Wir stützten uns dabei hauptsächlich auf ortsspezifische Mutagenese^[28] und die Erzeugung der ersten chimären Rezeptoren, in diesem Falle Chimären aus dem α_2 - und dem β_2 -adrenergen Rezeptor.^[28] Wieder übernahm Brian die Führung bei dieser Arbeit. Obwohl die beiden Rezeptoren strukturell eng verwandt sind (ihre Sequenz ist zu etwa 50 % identisch), üben sie diametral entgegengesetzte biochemische und physiologische Funktionen aus: der α_2 -Rezeptor hemmt die Adenylylatcyclase durch G_i , während der β_2 -adrenerge Rezeptor sie durch G_s stimuliert (Abbildung 4A). Durch die Erzeugung der Chimären konnten wir zeigen, dass die Spezifität für die andockenden G-Proteine und damit die Funktion des α_2 -Rezeptors von der Hemmung durch G_i zur Stimulierung durch G_s umgewandelt werden konnte, indem man einfach die dritte zytoplasmatische Schleife durch die des β_2 -adrenergen Rezeptors ersetzte (Abbildung 4B). Diese und viele andere Untersuchungen bestätigten, dass die Membrandurchgänge

und die extrazellulären Schleifen verantwortlich für die Ligandenbindungsspezifität der Rezeptoren sind, während die blau dargestellten Regionen auf der zytosolischen Seite verantwortlich für die Spezifität der G-Protein-Kopplung sind (Abbildung 4C).

Bei weiteren Mutagenesen fand Susanne Cotecchia, eine Stipendiatin in unserer Gruppe, per Zufall und zu unserer großen Überraschung heraus, dass einige Mutationen im distalen Teil der dritten zytoplasmatischen Schleife bei einigen adrenergen Rezeptoren konstitutive Aktivität verursachen. Die entsprechenden Rezeptoren sind dann auch ohne Ligand aktiv (Abbildung 5 A).^[32-34] Damals erklärten wir uns dies als Folge des Fehlens gewisser entscheidender intramolekulärer Wechselwirkungen, die den Rezeptor normalerweise in seiner inaktiven Konformation halten sollten (R in der Abbildung); dadurch sollten Konformationsänderungen vorgespiegelt werden, die sonst durch Agonisten verursacht werden und zur aktiven Form des Rezeptors führen (R^*), der so G ankoppeln kann (Abbildung 5 A). Nachher wird Brian Kobilka erklären, wie mithilfe der Röntgenstrukturanalyse der Rezeptoren die Natur dieser intramolekularen Einschränkungen aufgeklärt werden konnte, die durch die agonistinduzierte Aktivierung des Rezeptors aufgebrochen wird.

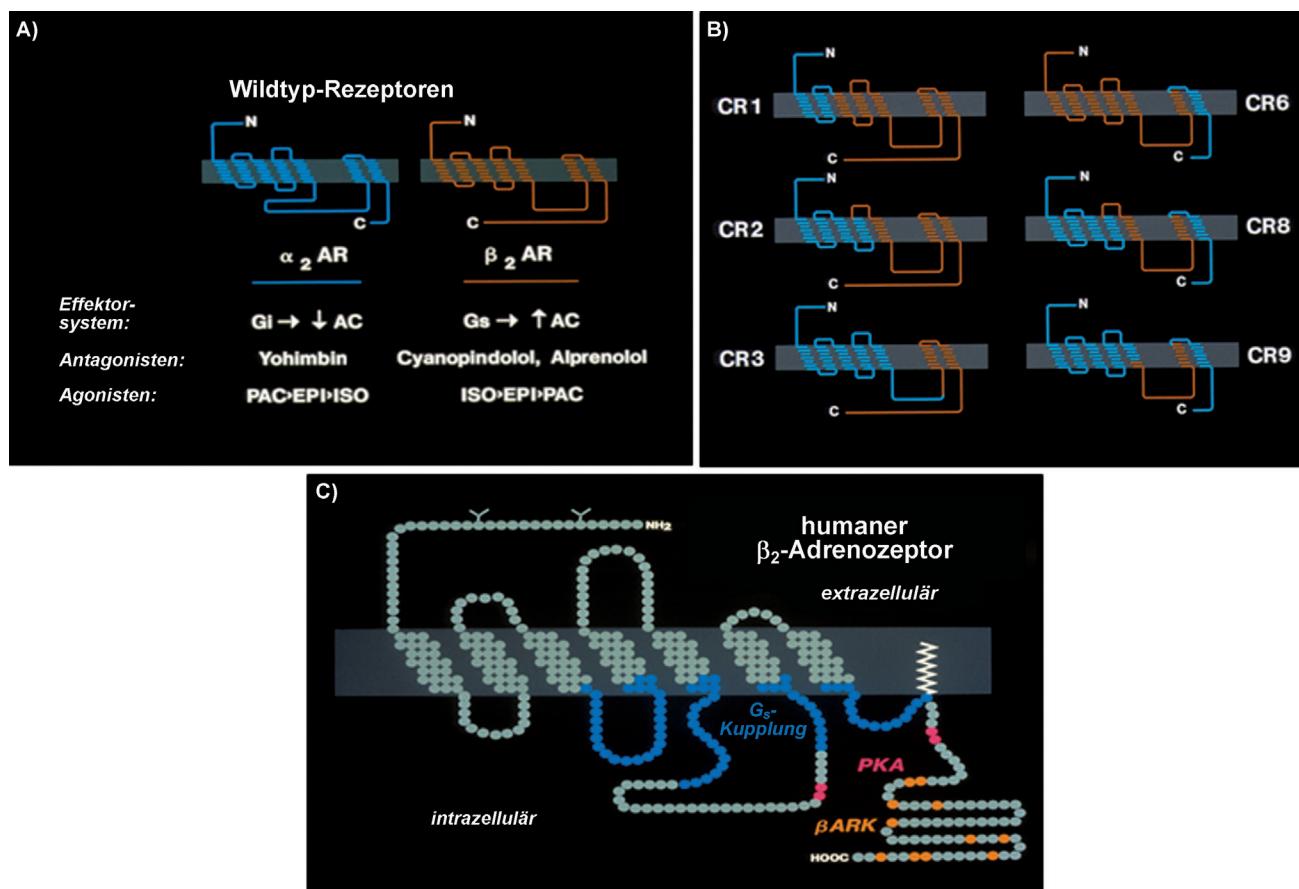


Abbildung 4. Chimäre α_2 - β_2 -Adrenozeptoren. Veränderter Abdruck nach Lit. [29] und [65].

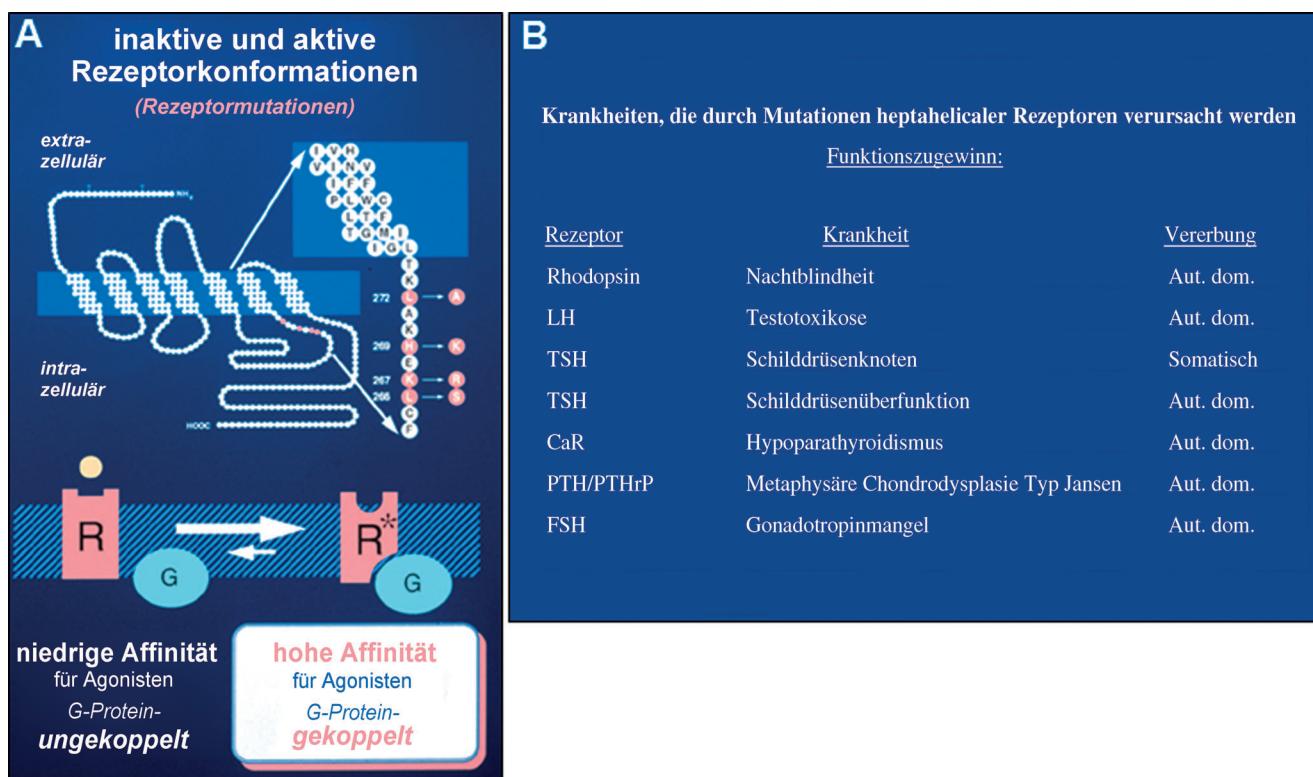


Abbildung 5. Konstitutiv aktive mutierte adrenerge Rezeptoren.

Interessanterweise gibt es eine immer länger werdende Liste menschlicher Erkrankungen, die auf solche aktivierenden Mutationen verschiedener GPCRs zurückgehen (Abbildung 5B).^[35]

Neben der Arbeit über die Struktur der Rezeptoren konzentrierten wir uns auf das scheinbar universelle Phänomen der Rezeptordesensibilisierung. Dieses Phänomen ist in Abbildung 6 für den β_2 -adrenergen Rezeptor gezeigt, der in

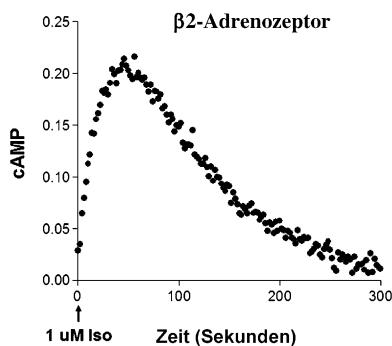


Abbildung 6. Desensibilisierung der cAMP-Bildung nach Stimulation des β_2 -Adrenozeptors. Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [36].

einem Zellkultursystem exprimiert wurde. Wenn ein Agonist wie Isoproterenol, das eine synthetische Variante von Epinephrin ist, zu den Zellen gegeben wird, stimuliert er die Rezeptoren, und die cAMP-Konzentration steigt an. Innerhalb weniger Minuten fällt die cAMP-Konzentration aber wieder auf den nichtstimulierten Zustand zurück, obwohl der Wirkstoff noch immer vorhanden ist.^[36] Schon seit Beginn meiner Laufbahn war ich von diesem Phänomen fasziniert, weil es ein so klares Beispiel für eines der beherrschendsten Prinzipien der Physiologie ist, der Homöostase. Zellen und Gewebe haben nach fast beliebiger Stimulation unzählige Mechanismen, mit deren Hilfe sie versuchen, in den ursprünglichen unstimulierten Zustand zurückzukehren.

Lassen Sie mich jetzt berichten, wie wir den wichtigsten biochemischen Mechanismus entdeckten, der für diese Desensibilisierung verantwortlich ist. Etwa 1980, wir hatten gerade Photoaffinitätssonden für den β_2 -adrenergen Rezeptor entwickelt,^[37] setzte Jeff Stadel, einer meiner Mitarbeiter, diese Sonde ein, um β_2 -adrenerge Rezeptoren in Zellen zu markieren, die er zuvor mit dem Agonisten Isoproterenol desensibilisiert hatte.^[38] Als wir diese markierten und desensibilisierten Rezeptoren mit SDS-PAGE analysierten, fanden wir, dass ihre Mobilität im Gel verringert war (Abbildung 7). Kurz zuvor war veröffentlicht worden, dass die Phosphorylierung von Membranproteinen oft zu solchen Veränderungen der elektrophoretischen Mobilität führt. Daher markierten wir die Zellen mit anorganischem Phosphat und konnten zeigen, dass die Catecholamin-induzierte Desensibilisierung mit der Phosphorylierung des β_2 -adrenergen Rezeptors einhergeht.^[38]

Während der nächsten Jahre gelang es meinem Doktoranden Jeff Benovic, die neue Kinase, die für die Phosphorylierung verantwortlich war, zu identifizieren,^[39] sie aus

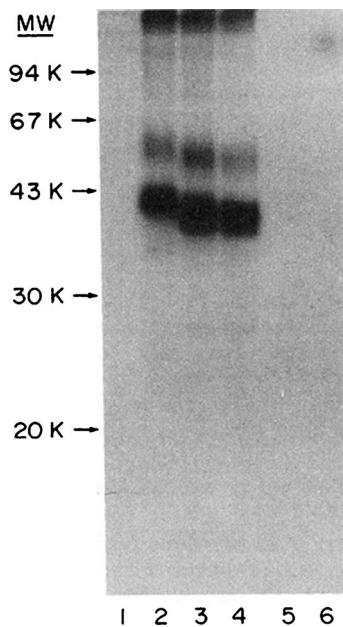


Abbildung 7. Desensibilisierung geht mit der Phosphorylierung des Rezeptors einher. SDS-PAGE des β_2 -Adrenozeptors aus Truthahn-Erythrozytenmembranen, die kovalent mit der Photoaffinitätssonde [¹²⁵I]-p-Azidobenzylcarazolol verknüpft sind. Spur 2: Zellen mit 1 μ M Isoproterenol inkubiert; Spur 3: 1 μ M Isoproterenol in Gegenwart des Antagonisten 10 μ M Propranolol; Spur 4: Kontrollzellen, nur mit Puffer inkubiert. Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [38].

Rinderhirn bis zur Homogenität zu reinigen^[40] und ihre cDNA zu klonieren.^[41] Es war eine neue cAMP-unabhängige Kinase, die wir β ARK nannten (für β -adrenerge Rezeptorkinase). Inzwischen ist sie als G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2 (GRK2) bekannt. Gleichzeitig war bekannt geworden, dass Rhodopsin durch eine neue Kinase, die Rhodopsinkinase, phosphoryliert wurde, wenn es durch Licht ausgebleicht wurde.^[42] Dies schien in ähnlicher Weise mit einer Unterdrückung der Funktion einherzugehen. Wir konnten die cDNA der Rhodopsinkinase klonieren^[42] und zeigen, dass sie und β ARK die ersten beiden Vertreter einer neuen Unterfamilie von Kinasen waren, die inzwischen als G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen bezeichnet werden. Heute wissen wir, dass diese Familie sieben Enzyme umfasst, von denen zwei, GRK1 und GRK7, nur in der Retina vorkommen. Die GRKs 2, 3, 5 und 6 werden ubiquitär exprimiert (Abbildung 8).^[43] Der Arbeit von John Tesmer und seiner

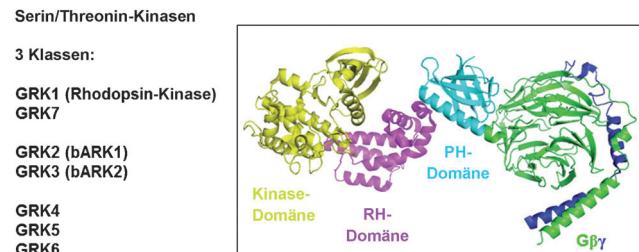


Abbildung 8. G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen. Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [44].

Gruppe verdanken wir mehrere Kristallstrukturen dieser Proteine. Die erste war die Struktur von GRK2, die er in Zusammenarbeit mit uns vor etwa 10 Jahren löste. Er analysierte dabei einen Komplex aus GRK2 und den $\beta\gamma$ -Untereinheiten des G-Proteins; diese Wechselwirkung im Zytosol erleichtert die Translokation zu den plasmamembrangebundenen Rezeptoren (Abbildung 8).^[44] Allen Vertretern dieser Familie gemeinsam ist eine konservierte dreiteilige Domänenstruktur mit einer zentralen konservierten katalytischen Kinasedomäne, die von zwei stärker divergierten regulatorischen Domänen flankiert wird.

In der Folge stellte sich heraus, dass es auf diesem Gebiet mehr zu entdecken gab als nur diese GRKs, die den Rezeptor phosphorylierten. Während der Reinigung von GRK2 nahm zwar die spezifische Aktivität für die Phosphorylierung der Rezeptorpräparation zu; gleichzeitig verringerte sich aber die Fähigkeit, den isolierten Rezeptor in einem rekonstituierten Testsystem zu desensibilisieren. Daher vermuteten wir, dass wir bei der Reinigung eine weitere notwendige Komponente oder einen Cofaktor verloren hatten.^[45]

Etwa zu dieser Zeit beschrieb Hermann Kuhn seine Beobachtung, dass ein häufiges retinale Protein, damals als 48K-Protein oder S-Antigen bezeichnet, irgendwie mit der Rhodopsinkinase zusammenwirkt, um Rhodopsin zu deaktivieren.^[46] Folgerichtig wurde das Protein „Arrestin“ getauft, weil es die Rhodopsinfunktion blockierte (engl. „arrested“). Wir spekulierten sofort, dass dieses Protein eine ähnliche Substanz wie diejenige sein könnte, die wir während der GRK2-Reinigung verloren. Natürlich konnte es nicht genau das Protein sein, das wir suchten, denn es wurde nur in der Retina exprimiert. Ich rief Kuhn an, und er schickte uns eine Probe des 48K-Proteins, mit dem Benovic in kurzer Zeit zeigen konnte, dass es die Fähigkeit von β ARK oder GRK2 zur Desensibilisierung des β -Rezeptors *in vitro* rekonstituierte, allerdings in hohen Konzentrationen.^[45]

Unmittelbar danach klonierte Shinohara am NIH die cDNA für dieses retinale Protein.^[47] Wir ließen uns von dem Gedanken leiten, dass die Substanz, die wir während unserer Enzympräparation verloren, vielleicht nicht nur funktional analog zum retinalen Arrestin oder 48K-Protein war, sondern auch strukturell homolog. Wir bekamen Shinoharas Klon und Martin Lohse, damals Postdoc in meiner Gruppe, konnte mit Screeningmethoden niedriger Stringenz eine cDNA eines Moleküls mit 70 % identischer Sequenz klonieren, das wir β -Arrestin nannten.^[48] Ein oder zwei Jahre später klonierte ein anderer Postdoc, Håvard Attramadal, ein weiteres ähnliches Molekül, das wir β -Arrestin-2 nannten.^[49] Mit diesen drei authentischen rekombinanten Arrestinmolekülen, dem retinalen Arrestin und den beiden β -Arrestinen 1 und 2, konnten wir ihre Aktivität in der Desensibilisierung von Rhodopsin und des β -Rezeptors *in vitro* vergleichen (Abbildung 9). Wenn wir mit der Rhodopsinkinase phosphoryliertes Rhodopsin einsetzen, war retinale Arrestin aktiv, um die Signalfunktion zu inaktivieren, während die beiden β -Arrestine ziemlich schwach wirkten (Abbildung 9A). Umgekehrt waren die beiden β -Arrestine sehr wirksam und Arrestin sehr schwach gegenüber dem GRK2-phosphorylierten β -Rezeptor (Abbildung 9B). Diese Befunde bestätigten den gemeinsamen Desensibilisierungsmechanismus für Rhodopsin und den

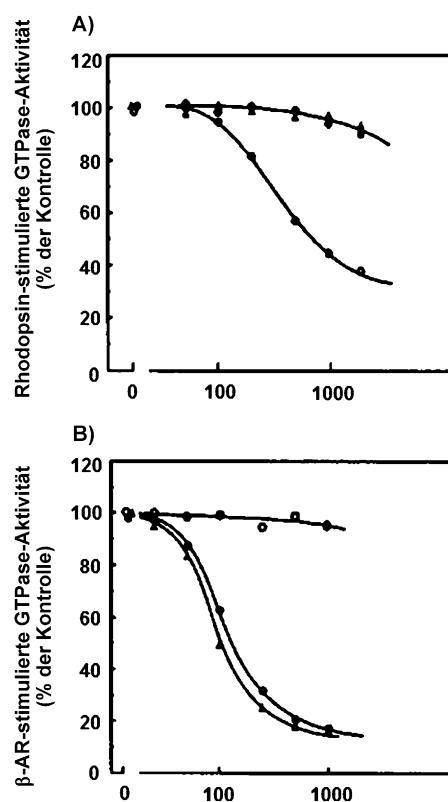


Abbildung 9. Hemmung des β_2 -Adrenozeptors und der Rhodopsinfunktion durch β -Arrestin-1, β -Arrestin-2 und Arrestin in rekonstituierten Systemen. A) Rhodopsin wurde mit Rhodopsinkinase phosphoryliert. B) β_2 -Adrenozeptoren wurden mit GRK2 phosphoryliert. Die Rhodopsin-stimulierte Transducin-GTPase wurde am effizientesten durch retinale Arrestin gehemmt (○). Demgegenüber wurde die durch den β_2 -Adrenozeptor stimulierte G_s -GTPase viel effizienter durch β -Arrestin-1 (●) oder β -Arrestin-2 (▲) gehemmt. Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [49].

β -Rezeptor, allerdings mit großer Spezifität für das jeweilige Arrestinmolekül.^[49]

Heute wissen wir, dass es vier Arrestine gibt. Zwei davon, Arrestin-1 und X-Arrestin, sind auf die Retina beschränkt. Die β -Arrestine 1 und 2, auch als Arrestin-2 und -3 bezeichnet, werden überall exprimiert. Von allen wurden Kristallstrukturen gelöst; sie weisen in allen Fällen ein Protein mit zwei Domänen auf, die fast vollständig aus antiparallelen β -Faltblättern bestehen, die durch eine Gelenkregion verbunden und durch einen polaren Kern stabilisiert sind (Abbildung 10).^[50]

Der Wissensstand, den wir Mitte der 90er Jahre erreicht hatten, ist in Abbildung 11 zusammengefasst. Man sieht die beiden universalen Mechanismen, die der Funktion der GPCRs zugrundeliegen. Basis ist die Vorstellung, dass drei Proteinfamilien die bemerkenswerte Eigenschaft gemeinsam haben, dass sie fast durchgängig mit den Rezeptoren in einer nur vom Agonisten oder vom stimulierenden Reiz abhängigen Form wechselwirken. Diese Proteine sind die heterotrimeren G-Proteine, die G-Protein-gekoppelten Rezeptor-kinasen und die β -Arrestine. Nach Stimulation wechselwirken die aktivierte Rezeptoren mit den G-Proteinen und lösen die zelluläre Signalkaskade über eine Reihe von Phos-

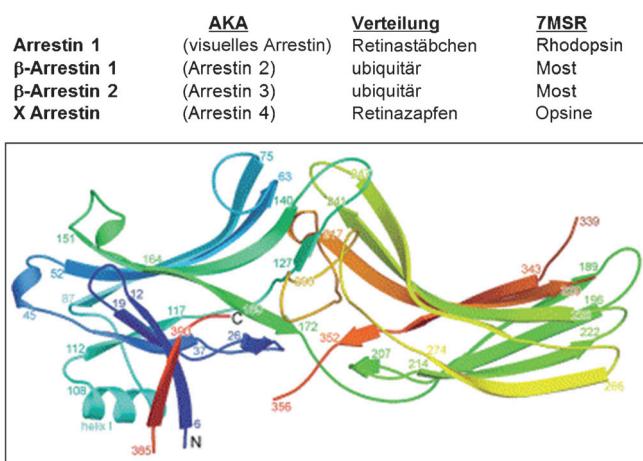


Abbildung 10. Die Arrestine. Veränderter Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [50].

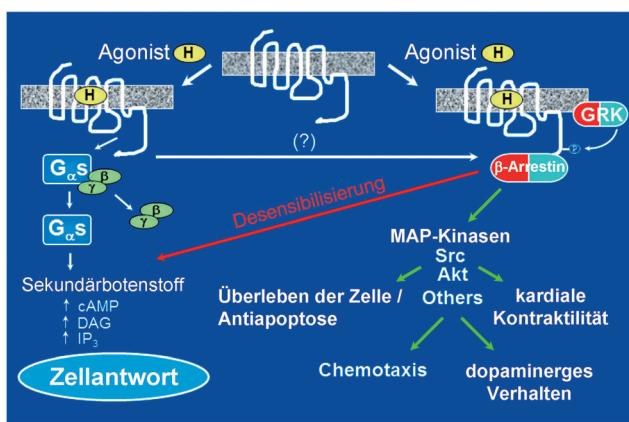


Abbildung 12. Neue Mechanismen für vielfältige β -Arrestin-vermittelte Funktionen. Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [65].

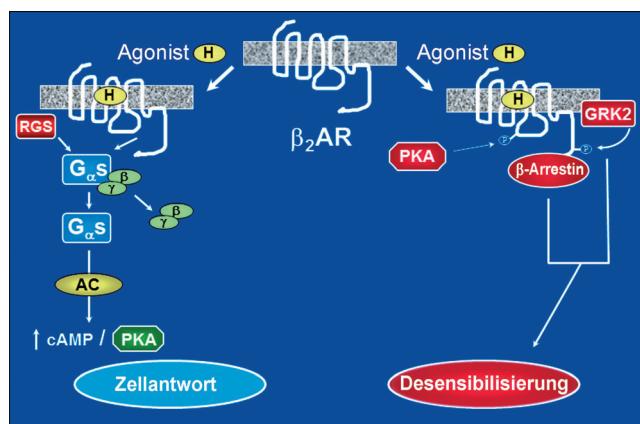


Abbildung 11. Aktivierung und Desensibilisierung der GPCRs.

phorylierungen aus. Die aktivierte Rezeptoren werden aber auch von den GRKs erkannt und phosphoryliert, wodurch ein zweites Protein, das β -Arrestin, bindet und die Stimulierung des G-Proteins durch den Rezeptor sterisch verhindert. Dadurch kommt es zu Desensibilisierung und Abnahme der physiologischen Antworten.^[51] Wir entdeckten auch andere Rückkopplungsmechanismen, die die Signalaktivität des Rezeptors verringern, so die Phosphorylierung der Rezeptoren durch Second-Messenger-Kinasen wie PKA und PKC. Diese sind im Allgemeinen aber nicht rezeptorspezifisch.^[52]

Während der letzten zehn Jahre jedoch tauchte ein völlig neuer Mechanismus auf, als wir erkannten, dass das β -Arrestin-GRK-System tatsächlich multifunktional ist (Abbildung 12). Es desensibilisiert nämlich nicht nur die G-Protein-vermittelte Signalgebung, sondern fungiert gleichzeitig als eigenständiges Signalübertragungssystem. β -Arrestine wirken als Adaptoren oder Gerüste, die die Rezeptoren mit einer ständig wachsenden Zahl intrazellulärer Moleküle verbinden.^[53,54] Einige dieser Signalwege, die während der letzten Jahre aufgeklärt wurden, sind hier zusammen mit den zellulären physiologischen Reaktionen gezeigt (Abbildung 12). Am intensivsten wurden die MAP-Kinasen untersucht. β -Arrestine vermitteln auch die Endozytose von Clathrin-be-

schichteten Grübchen durch Wechselwirkung mit Komponenten des Endozytoseapparats.^[55] Zusammengefasst vermitteln die β -Arrestine also drei Funktionen: die Desensibilisierung, die Rezeptorinternalisierung und die Signalgebung.

Im Verlauf unserer Arbeiten an der β -Arrestin-Signalgebung machten wir eine interessante Entdeckung, die diese Arbeit sehr erleichtert hat und die vielleicht auch wichtige therapeutische Auswirkungen hat. Ich spreche von den sogenannten gerichteten Agonisten (beschrieben in Lit. [56]). Ein gerichteter Agonist ist ein Ligand, der eine besondere aktive Konformation eines Rezeptors stabilisiert und so einige Reaktionen stimuliert, andere aber nicht. 7TM-Rezeptorliganden können beispielsweise auf ein bestimmtes G-Protein oder β -Arrestin gerichtet werden. Gleicher gilt für mutierte Rezeptoren.

Im klassischen Zweizustandsmodell der Rezeptoraktivierung können Rezeptoren entweder als inaktive Rezeptoren R oder als aktive Rezeptoren R* existieren, wobei die Agonisten die aktive Konformation stabilisieren, die die zellulären Effekte auslöst. In diesem Modell sind alle Effekte des Rezeptors die Konsequenz der einen aktiven R*-Form des Rezeptors. Die Existenz gerichteter Agonisten allerdings, die ausschließlich die Stimulation des β -Arrestin- oder des G-Protein-vermittelten Signals auslöst, impliziert, dass es mehrere aktive Konformationen des Rezeptors gibt.^[57]

Zur Illustration sind in Abbildung 13 einige Daten zusammengestellt, die die Fähigkeit von drei Liganden vergleichen, die die Wechselwirkung des Angiotensinrezeptors AT_{1A} mit G-Proteinen (G_q) oder β -Arrestin in einer Zelllinie, die den Rezeptor exprimiert, zu verstärken.^[58] Die G-Protein-Aktivierung wird in einem typischen Second-Messenger-Test gemessen und ist in Rot dargestellt; die Bindung von β -Arrestin ist in Schwarz aufgezeichnet. Das erste Diagramm zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurve eines typischen ungerichteten vollständigen Agonisten, Angiotensin selbst. Man sieht, dass die Kurven für G-Protein- und β -Arrestin-Wechselwirkung sehr ähnlich sind. Das mittlere Diagramm stellt die Situation für einen klassischen kompetitiven Antagonisten dar, der in keinem der Tests Aktivität zeigt. Die dritte Darstellung zeigt die Daten für einen vollständig auf β -Arrestin gerichteten

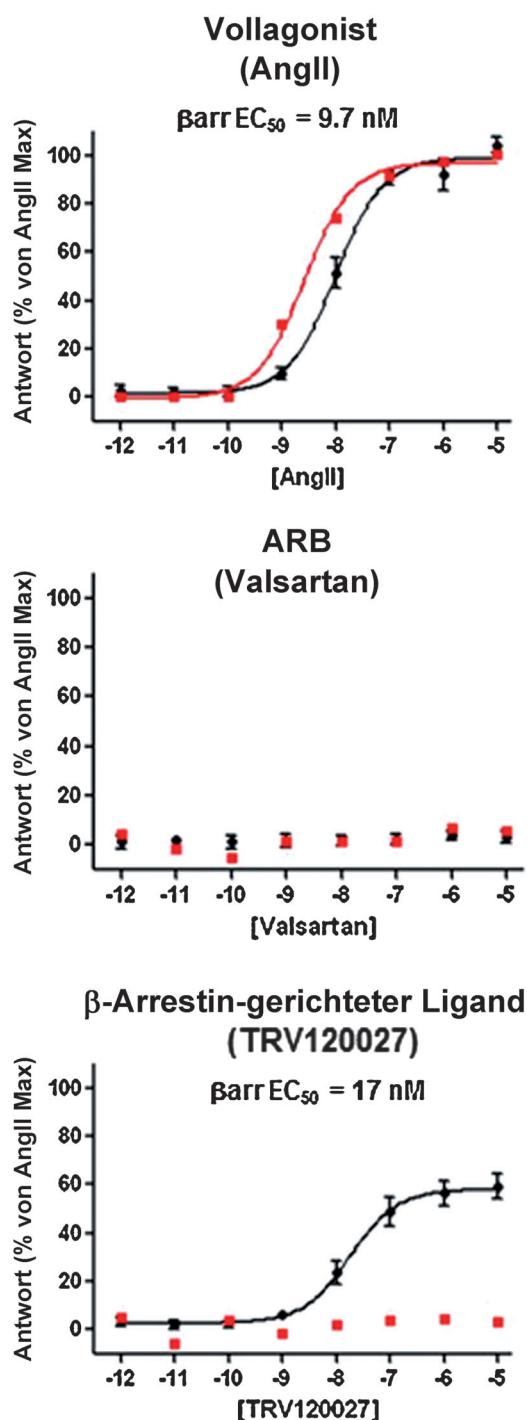


Abbildung 13. Aktivierung von G_q - und β -Arrestin durch den Angiotensin-AT_{1A}-Rezeptor nach Stimulation durch verschiedene Liganden. Rote Kreise: G-Protein-Signal (IP1); schwarze Kreise: Rekrutierung von β -Arrestin (PathHunter). Einzelheiten siehe Text. Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [58].

Liganden, in diesem Fall für TRV120027, das ein Octapeptid-Analogon von Angiotensin ist. Man sieht, dass dieser Ligand absolut keine aktivierende Wirkung auf das G-Protein-Signal hat, insofern also ein klassischer kompetitiver Antagonist für die G-Proteinaktivierung ist; andererseits hat er eine substantielle Aktivität für die β -Arrestinbindung.

Wie bereits erwähnt, ist eine Konsequenz dieser β -Arrestin-Bindung die Stimulation von Signalkaskaden wie der ERK-MAP-Kinase auf eine Weise, die parallel zu den G-Proteinen und in einigen Fällen völlig unabhängig von ihnen verläuft. Um einen umfassenderen Überblick über die Reichweite der β -Arrestin-vermittelten Signalwege zu erhalten, haben wir mit Massenspektrometrie alle Phosphorylierungsstellen in Zellen vor und nach der Stimulation des Angiotensinrezeptors mit einem β -Arrestin-gerichteten Agonisten, der die G-Proteine nicht aktiviert, quantifiziert.^[59]

In Abbildung 14 sieht man eine Reihe von Signalnetzwerken, die anhand der Phosphorylierung sichtbar werden, wenn man die Signale von β -Arrestin, nicht aber die der G-Proteine, auf diese Art aktiviert. Dazu gehören verschiedene Elemente der MAP-Kinase-Kaskade, des PI3-Kinase-AKT-Signalweges, der DNA-Reparaturmechanismen, des Zellzyklus und der Entwicklungswege und ein ausgedehntes Netzwerk von Molekülen, die an der Reorganisation des Zytoskeletts und der Aktindynamik beteiligt sind. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die β -Arrestin-vermittelten Signale extrem vielfältig sind und auch die Aktivierung vieler der Wege umfassen, die durch G-Proteine ebenfalls aktiviert werden können. Dies hat allerdings oft sehr unterschiedliche zelluläre Folgen.

Ergebnisse wie diese haben sehr wahrscheinlich Auswirkungen auf die Entwicklung neuer therapeutischer Wirkstoffe. Ich möchte dazu einige Beispiele anführen. Angiotensin ist, wenn es über die G-Protein-vermittelten Effekte wirkt, eine der wirksamsten gefäßverengenden Substanzen, die man kennt, und kann dadurch den Blutdruck erhöhen. Demgegenüber gehören zu den β -Arrestin-vermittelten Wirkungen einige, die potentiell günstig sind, wie Zytoschutz und Apoptosehemmung.^[60] Angiotensin-Rezeptorblocker (ARBs) gehören zu den wichtigsten Medikamenten zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen, weil sie die möglicherweise schädlichen G-Protein-vermittelten blutdrucksteigernden Wirkungen von Angiotensin blockieren. Sie blockieren aber auch mögliche erwünschte Effekte, die von β -Arrestin vermittelt werden. Wir stellten die Hypothese auf, dass ein β -Arrestin-gerichteter Ligand, der die G-Protein-vermittelte Signalkaskade blockiert und gleichzeitig die potentiell nützlichen β -Arrestin-vermittelten Effekte verstärkt, ein neuer und einmalig wirksamer Typ eines Therapeutikums sein könnte. Und tatsächlich verringert eine Verbindung mit genau diesen Eigenschaften, Trevena 120027, das Fortschreiten des Herzversagens in Tieren, erniedrigt den Blutdruck^[61] und wirkt apoptosehemmend.^[62]

Liganden können auch auf G-Proteine gerichtet sein, und auch solche Verbindungen können ein therapeutisches Potenzial haben. Beispielsweise wird der therapeutische Nutzen von Opiaten, den am stärksten schmerzlindernden Medikamenten, durch die Stimulation von G_i -Proteinen über den μ -Opioidrezeptor vermittelt,^[63,64] während die unerwünschten Nebenwirkungen wie Verstopfung, Atemdepression und Toleranz, die immer höhere Dosen erfordert, alle aufgrund der β -Arrestin-2-vermittelten Signale entstehen und in β -Arrestin-2-Knock-out-Mäusen nicht auftreten.^[63,64] Daher sollten G-Protein-gerichtete Liganden für den μ -Opioidrezeptor

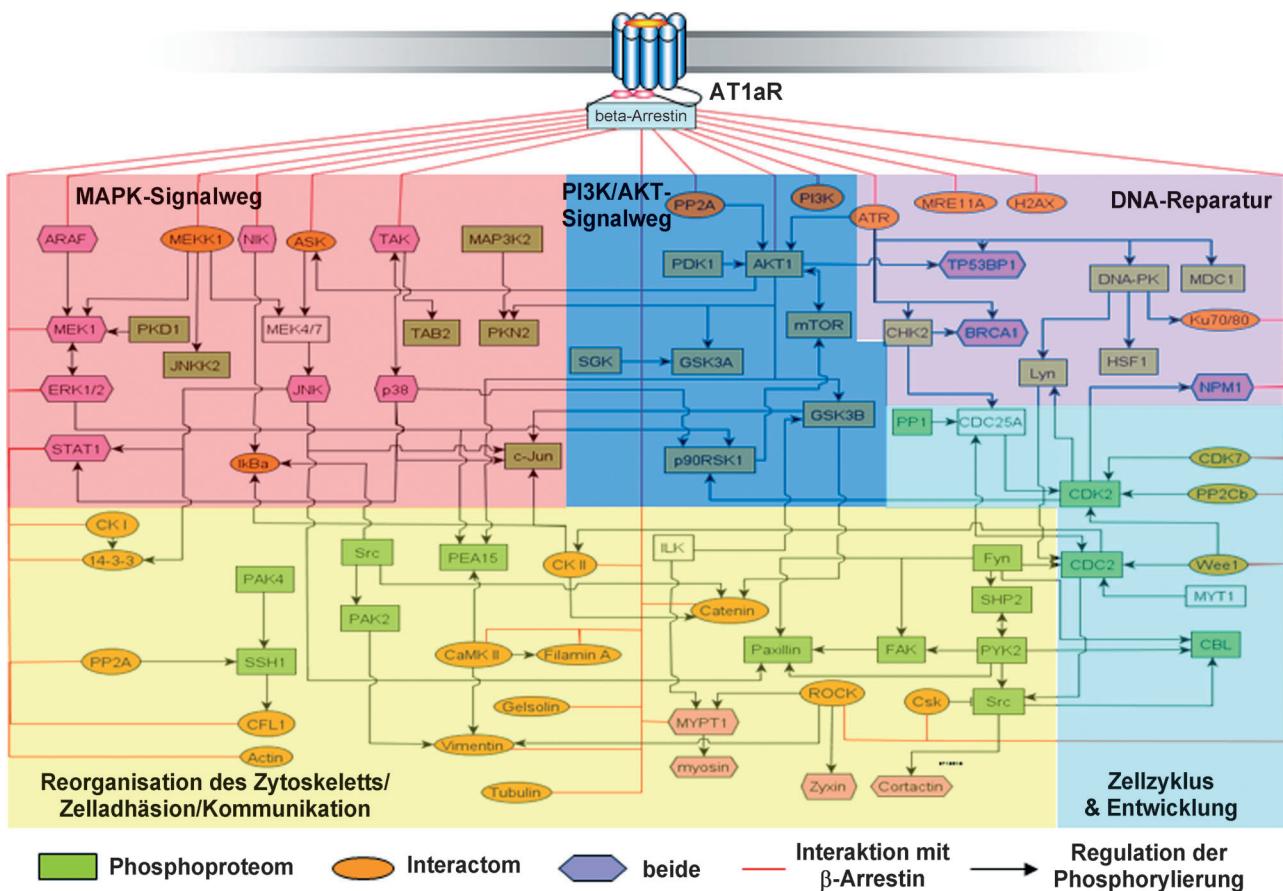


Abbildung 14. Ein β -Arrestin-abhängiges Kinasenetzwerk unterhalb des Angiotensin-AT_{1A}-Rezeptors. Abdruck mit Genehmigung nach Lit. [59].



Abbildung 15. Ehemalige und aktuelle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe des Autors anlässlich der Feier seines 60. Geburtstages im Jahr 2003. Vergrößert: Dr. Brian Kobilka, Mitpreisträger des Chemie-Nobelpreises 2012.

schmerzlindernd wirken, bei gleichzeitig deutlich reduzierten Nebenwirkungen.

Diese Beispiele für β -Arrestin- und G-Protein-gerichtete Liganden zeigen, wie unser neues Verständnis dieser beiden Typen von Signalwegen, die ursprünglich mit biochemischen Verfahren gewonnen wurden, möglicherweise für eine therapeutische Anwendung genutzt werden kann.

Ich hatte das außergewöhnliche Glück, in meiner Laufbahn mehr als 200 Studenten und Postdocs ausbilden zu können. Statt einfach eine Liste ihrer Namen zu zeigen, habe ich versucht, auf einige der wichtigsten Mitarbeiter während meines Vortrages hinzuweisen. Stellvertretend für die ganze Gruppe möchte ich Ihnen ein Photo zeigen (Abbildung 15), das vor etwa zehn Jahren bei meinem 60. Geburtstag aufgenommen wurde, als viele ehemalige Mitarbeiter für eine Feier zur Duke University zurückkamen; dabei möchte ich auf einen ehemaligen Postdoc hinweisen, der ganz in der letzten Reihe versteckt ist ... er ist der nächste Vortragende, Dr. Brian Kobilka.

Danksagung

Ich danke den National Institutes of Health, die meine Arbeit seit 1973 kontinuierlich unterstützt haben, und dem Howard Hughes Medical Institute, bei dem ich seit 1976 als Forscher arbeite. Ich danke Donna Addison und Quivetta Lennon für die ausgezeichnete Schreibarbeit beim Abfassen dieses Manuskripts und Seungkirl Ahn und Ryan Strachan für ihre Hilfe beim Erstellen der Abbildungen und für das Lesen des Manuskripts.

Eingegangen am 7. März 2013
Online veröffentlicht am 6. Mai 2013

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

-
- [1] „Seven Transmembrane Spanning Receptors“: K. L. Pierce, R. T. Premont, R. J. Lefkowitz, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 639–650.
 - [2] „On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curare“: J. N. Langley, *J. Physiol.* **1905**, *33*, 374–413.
 - [3] „Modes of Drug Action. General Introductory Address“: H. H. Dale, *Trans. Faraday Soc.* **1943**, *39*, 319–322.
 - [4] „A study of the adrenotropic receptors“: R. P. Ahlquist, *Am. J. Physiol.* **1948**, *153*, 586–600.
 - [5] „Adrenergic receptors: a personal and practical view“: R. P. Ahlquist, *Perspect. Biol. Med.* **1973**, *17*, 119–122.
 - [6] „Identification of β -adrenergic receptors in frog erythrocyte membranes with $(-)$ -[3H]alprenolol“: C. Mukherjee, M. G. Caron, M. Coverstone, R. J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4869–4875.
 - [7] „Identification of α -adrenergic receptors by [3 H]dihydroergocryptine binding“: L. T. Williams, R. J. Lefkowitz, *Science* **1976**, *192*, 791–793.
 - [8] „The β -adrenergic receptor: Biochemical mechanisms of physiological regulation“: G. L. Stiles, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Physiol. Rev.* **1984**, *64*, 661–743.
 - [9] „Expression of three α -2 adrenergic receptor subtypes in rat tissues: Implications for α -2 receptor classification“: W. Lorenz, J. W. Lomasney, S. Collins, J. W. Regan, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Mol. Pharmacol.* **1990**, *38*, 599–603.
 - [10] „Regulation of β -adrenergic receptors by 5'-guanylylimidodiphosphate and other purine nucleotides“: R. J. Lefkowitz, D. Mullikin, M. G. Caron, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 4688–4692.
 - [11] „A quantitative analysis of β -adrenergic receptor interactions: Resolution of high and low affinity states of the receptor by computer modelling of ligand binding data“: R. S. Kent, A. De Lean, R. J. Lefkowitz, *Mol. Pharmacol.* **1980**, *17*, 14–23.
 - [12] „A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate-cyclase coupled β -adrenergic receptor“: A. De Lean, J. M. Stadel, R. J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 7108–7117.
 - [13] „Affinity chromatography of the β -adrenergic receptors“: M. G. Caron, Y. Srinivasan, J. Pitha, K. Kiolek, R. J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 2923–2927.
 - [14] „Affinity chromatography of human platelet α 2-adrenergic receptors“: J. Regan, N. Barden, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron, R. M. DeMarinis, A. J. Krog, K. G. Holden, W. D. Matthews, J. P. Hieble, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 7223–7227.
 - [15] „Mammalian α 1-adrenergic receptor: Purification and characterization of the native receptor ligand binding subunit“: J. W. Lomasney, L. M. F. Leeb-Lundberg, S. Cotecchia, J. W. Regan, J. F. DeBernardis, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 7710–7716.
 - [16] „Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors“: H. G. Dohlman, J. Thorner, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 653–688.
 - [17] „The pure β -adrenergic receptor: A single polypeptide confers catecholamine responsiveness to an adenylate cyclase system“: R. A. Cerione, B. Strulovici, J. L. Benovic, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron, *Nature* **1983**, *306*, 562–566.
 - [18] „Reconstitution of a hormone-sensitive adenylate cyclase system: The pure β -adrenergic receptor and guanine nucleotide regulatory protein confer hormone responsiveness on the resolved catalytic unit“: R. A. Cerione, D. R. Sibley, J. Codina, J. L. Benovic, J. Winslow, E. J. Neer, L. Birnbaumer, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 9979–9982.
 - [19] „Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin“: R. A. F. 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*, 75–79.
 - [20] „The structure of bovine rhodopsin“: P. A. Hargrave, J. H. McDowell, D. R. Curtis, J. K. Wang, E. Juszczak, S. L. Fong, J. K. Rao, P. Argos, *Biophys. Struct. Mech.* **1983**, *9*, 235–244.
 - [21] „Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships“: Y. A. Ovchinnikov, *FEBS Lett.* **1982**, *148*, 179–191.
 - [22] „Path of the polypeptide in bacteriorhodopsin“: D. M. Engelmann, R. Henderson, A. D. McLachlan, B. A. Wallace, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 2023–2027.
 - [23] „Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet α 2-adrenergic receptor“: B. K. Kobilka, H. Matsui, T. S. Kobilka, T. L. Yang-Feng, U. Francke, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, J. W. Regan, *Science* **1987**, *238*, 650–656.
 - [24] „The Adrenergic Receptors. Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research“: R. J. Lefkowitz, M. G. Caron in *The Biology and Medicine of Signal Transduction*, Vol. 24 (Hrsg.: Y. Nishizuka et al.), Raven, New York, **1990**, S. 1–8.
 - [25] „Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster α 1-adrenergic receptor“: S. Cotecchia, D. A. Schwinn, R. R. Randall, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron, B. K. Kobilka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 7159–7163.
 - [26] „The genomic clone G-21 encodes the serotonin (5-HT1A) receptor“: A. Fargin, R. J. Raymond, M. J. Lohse, B. K. Kobilka, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Nature* **1988**, *335*, 358–360.

- [27] „A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins“: H. G. Dohlman, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Biochemistry* **1987**, *26*, 2657–2664.
- [28] „Site directed mutagenesis of the cytoplasmic domains of the human β 2-adrenergic receptor. Localization of regions involved in G protein-receptor coupling“: B. F. O'Dowd, M. Hnatowich, J. W. Regan, W. M. Leader, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* **1998**, *263*, 15985–15992.
- [29] „Chimeric α 2- β 2-adrenergic receptors: Delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity“: B. K. Kobilka, T. S. Kobilka, K. Daniel, J. W. Regan, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Science* **1988**, *240*, 1310–1316.
- [30] „Mutagenesis of the β 2-adrenergic receptor: how structure elucidates function“: J. Ostrowski, M. A. Kjelsberg, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1992**, *32*, 167–183.
- [31] „Genetic Analysis of the β -adrenergic receptor“: C. D. Strader, R. A. Dixon, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1991**, *287*, 209–220.
- [32] „Regions of the α 1-adrenergic receptor implicated in coupling to phosphatidylinositol hydrolysis and enhanced sensitivity of biological function“: S. Cotecchia, S. Exum, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 2896–2900.
- [33] „Constitutive activation of the α 1B-adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site“: M. A. Kjelsberg, S. Cotecchia, J. Ostrowski, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1430–1433.
- [34] „A mutation-induced activated state of the β 2-adrenergic receptor-extending the ternary complex model“: P. Samama, S. Cotecchia, T. Costa, R. J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 4625–4636.
- [35] A. M. Spiegel in *G Proteins, Receptors and Disease* (Hrsg.: A. M. Spiegel), Humana, Totowa, **1998**, S. 1–21.
- [36] „ β 2-Adrenergic receptor signaling and desensitization elucidated by quantitative modeling of real-time cAMP dynamics“: J. D. Violin, L. M. DiPilato, N. Yildirim, T. C. Elston, J. Zhang, R. J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 2949–2961.
- [37] „Photoaffinity labelling of the β -adrenergic receptor“: T. N. Lavin, S. L. Heald, P. W. Jeffs, R. G. L. Shorr, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 11944–11950.
- [38] „Catecholamine-induced desensitization of turkey erythrocyte adenylate cyclase. Structural alterations in the β -adrenergic receptor revealed by photoaffinity labeling“: J. M. Stadel, P. Nambi, T. N. Lavin, S. L. Heald, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7242–9245.
- [39] „ β -adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor“: J. L. Benovic, R. H. Strasser, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 2797–2801.
- [40] „Purification and characterization of the β -adrenergic receptor kinase“: J. L. Benovic, F. Mayor, Jr., C. Staniszewski, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 9026–9032.
- [41] „ β -adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family“: J. L. Benovic, A. DeBlasi, W. C. Stone, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Science* **1989**, *246*, 235–240.
- [42] „The receptor kinase family: primary structure of rhodopsin kinase reveals similarities to the β -adrenergic receptor kinase“: W. Lorenz, J. Inglese, K. Palczewski, J. J. Onorato, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 8715–8719.
- [43] „G protein-coupled receptor kinases“: J. A. Pitcher, N. J. Freedman, R. J. Lefkowitz, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 653–692.
- [44] „Keeping G Proteins at Bay: A Complex Between G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 and G β γ “: D. T. Lodowski, J. A. Pitcher, W. D. Capel, R. J. Lefkowitz, J. J. G. Tesmer, *Science* **2003**, *300*, 1256–1262.
- [45] „Functional desensitization of the isolated β -adrenergic receptor by the β -adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48K protein)“: J. L. Benovic, H. Kuhn, I. Weyand, J. Codina, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 8879–8882.
- [46] „Deactivation of photoactivated rhodopsin by rhodopsin-kinase and arrestin“: H. Kuhn, U. Wilden, *J. Recept. Res.* **1987**, *7*, 283–298.
- [47] „Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48 kDa protein)“: T. Shinohara, B. Dietzschold, C. M. Craft, G. Wistow, J. J. Early, L. A. Donoso, J. Horwitz, R. Tao, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 6975–6979.
- [48] „ β -arrestin: a protein that regulates β -adrenergic receptor function“: M. J. Lohse, J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Science* **1990**, *248*, 1547–1550.
- [49] „ β -arrestin2, a novel member of the arrestin/ β -arrestin gene family“: H. Attramadal, J. L. Arriza, C. Aoki, T. M. Dawson, J. Codina, M. M. Kwatra, S. H. Snyder, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 17882–17890.
- [50] „Crystal structure of β -arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane translocation“: M. Han, V. V. Gurevich, S. A. Vishnivetskiy, P. B. Sigler, C. Schubert, *Structure* **2001**, *9*, 869–880.
- [51] „Turning off the signal: Desensitization of β -adrenergic receptor function“: W. P. Hausdorff, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *FASEB J.* **1990**, *4*, 2881–2889.
- [52] „Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation: Effects of agonist occupancy on phosphorylation of α 1- and β 2-adrenergic receptors by protein kinase C and the cyclic AMP-dependent protein kinase“: M. Bouvier, L. M. Leeb-Lundberg, J. L. Benovic, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 3106–3113.
- [53] „ β -arrestins and Cell Signaling“: S. M. DeWire, S. Ahn, R. J. Lefkowitz, S. K. Shenoy, *Annu. Rev. Physiol.* **2007**, *69*, 483–510.
- [54] „Emerging paradigms of β -arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling“: A. K. Shukla, K. Xiao, R. J. Lefkowitz, *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36*, 457–469.
- [55] „ β -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction“: S. K. Shenoy, R. J. Lefkowitz, *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32*, 521–533.
- [56] „ β -arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors“: J. D. Violin, R. J. Lefkowitz, *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28*, 416–422.
- [57] „Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors“: S. Rajagopal, K. Rajagopal, R. J. Lefkowitz, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 1–12.
- [58] „Selectively engaging β -arrestins at the angiotensin II type I receptor reduces blood pressure and increases cardiac performance“: J. D. Violin, S. M. Dewire, D. Yamashita, D. H. Rominger, L. Nguyen, K. Schiller, E. J. Whalen, M. Gowen, M. W. Lark, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2010**, *335*, 572–579.
- [59] „Global phosphorylation analysis of β -arrestin-mediated signaling downstream of seven transmembrane receptor (7TMR)“: K. Xiao, J. Sun, J. Kim, S. Rajagopal, B. Zhai, J. Villen, W. Haas, J. J. Kovacs, A. K. Shukla, M. R. Hara, M. Hernandez, A. Lachmann, S. Zhao, Y. Lin, Y. Cheng, K. Mizuno, A. Ma'ayan, S. P. Gygi, R. J. Lefkowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 15299–15304.
- [60] „ β -Arrestin-2 Mediates Anti-Apoptotic Signaling Through Regulation of BAD Phosphorylation“: S. Ahn, J. Kim, M. R. Hara, X.-R. Ren, R. J. Lefkowitz, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 8855–8865.
- [61] „Cardiorenal actions of TRV120027, a novel β -arrestin-biased ligand at the angiotensin II type I receptor, in healthy and heart failure canines: a novel therapeutic strategy for acute heart failure“: G. Boerrigter, M. W. Lark, E. J. Whalen, D. G. Soergel, J. D. Violin, J. C. Burnett, Jr., *Circ. Heart Failure* **2011**, *4*, 770–778.
- [62] „ β -arrestin-biased AT1R stimulation promotes cell survival during acute cardiac injury“: K. S. Kim, D. Abraham, B. Willi-

- ams, J. D. Violin, L. Mao, H. A. Rockman, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2012**, *303*, H1001–H1010.
- [63] „Morphine side effects in β -arrestin 2 knockout mice“: K. M. Raehal, J. K. Walker, L. M. Bohn, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *314*, 1195–1201.
- [64] „ μ -opioid receptor desensitization by β -arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence“: L. M. Bohn, R. R. Gainetdinov, F. T. Lin, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron, *Nature* **2000**, *408*, 720–723.
- [65] „Seven Transmembrane Receptors. A Brief Personal Retrospective“: R. J. Lefkowitz, *Biochem. Biophys. Acta Biomembr.* **2007**, *1768*, 748–755.